

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

LEONARDO OLIVEIRA TRIVILIN

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DE FÍGADOS DE
BOVINOS CRONICAMENTE INFECTADOS POR *Fasciola hepatica***

ALEGRE – ES

2010

LEONARDO OLIVEIRA TRIVILIN

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DE FÍGADOS DE BOVINOS CRONICAMENTE INFECTADOS POR *Fasciola hepatica*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de **Mestre em Ciências Veterinárias**, linha de pesquisa Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Isabella Vilhena Freire Martins

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Louisiane de Carvalho Nunes

ALEGRE – ES

2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Trivilin, Leonardo Oliveira, 1981-
T841a Avaliação histopatológica e imunoistoquímica de fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* / Leonardo Oliveira Trivilin. – 2010.
100 f. : il.

Orientadora: Isabella Vilhena Freire Martins.

Co-orientadora: Louisiane de Carvalho Nunes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Histopatologia veterinária. 2. Imunologia veterinária. 3. Bovino - Fígado - Doenças. 4. Distomatose. 5. Parasitologia veterinária. 6. Ruminante. I. Martins, Isabella Vilhena Freire. II. Nunes, Louisiane de Carvalho. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. IV. Título.

CDU: 619

LEONARDO OLIVEIRA TRIVILIN

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DE FÍGADOS DE
BOVINOS CRONICAMENTE INFECTADOS POR *Fasciola hepatica*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.

Aprovada em 10 de fevereiro de 2010.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Isabella Vilhena Freire Martins
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Louisiane de Carvalho Nunes
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientadora

Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Junior
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof.^a Dr.^a Teresa Cristina Goulart de Oliveira Sequeira
Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Sebastião Angelo Trivilin e Ilza Oliveira
Trivilin.*

*À minha querida avó Angelina Sfalsin
Trivilin.*

*À minha irmã Danieli Oliveira Trivilin.
Aos meus grandes amigos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por me conceder o dom da vida a cada dia.

Aos animais, peças fundamentais nesta obra. Muito obrigado.

Aos meus pais Sebastião Angelo Trivilin e Ilza Oliveira Trivilin pelo apoio e dedicação incondicionais para que hoje eu tenha orgulho de mim e seja orgulho para eles.

À minha irmã Danieli Oliveira Trivilin pelo afeto e confiança.

À minha avó Angelina Sfalsin Trivilin pelo amor incondicional, confiança carinho e respeito.

Aos meus familiares pelo apoio e incentivo.

À minha orientadora Professora Doutora Isabella Vilhena Freire Martins por acreditar no meu trabalho e pela confiança depositada na realização desta tarefa.

À minha co-orientadora Professora Doutora Louisiane de Carvalho Nunes pelos ensinamentos dispensados durante a minha vida acadêmica e também no andamento desta obra.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento e incentivo com a bolsa de estudos.

Aos meus mestres, sejam eles da vida pessoal ou da vida profissional. O conhecimento e sabedoria de vocês acrescentaram muito em minha vida. Agradecimento especial ao Professor Doutor Marcos Santos Zanini, o meu primeiro orientador, nesta caminhada científica. Obrigado pela oportunidade e por acreditar no meu trabalho.

À professora Lenir Cardoso Porfírio, por ser mãe, amiga, eterna orientadora e por me estimular a procurar sempre mais o conhecimento.

À aluna e amiga Dyeime Ribeiro de Sousa pelo apoio incondicional nas tarefas. Obrigado pela sua dedicação. Acredito no seu sucesso.

À Doutora Camila Dias Porto pela prontidão e dedicação no ensinamento dos testes imunoistoquímicos.

Ao grande amigo Weriton Azevedo Soroldoni pela amizade, carinho e pelos incentivos nas horas mais difíceis. Também por me agüentar nesses dois anos. Muito Obrigado.

Aos amigos Huezer Viganô Sperandio, Pompeu Paes Guimarães, Wesley Augusto Campagnaro “Monge” e Douglas Paganini de Oliveira “Mexicano” pela amizade e estadia na república. Vocês me salvaram muitas vezes.

Aos amigos do mestrado: Marcelo Carvalho dos Santos, Marilda Onchero Taffarel e Carlos Renato F. Guaitolini, Ana Elisa Pato Salgado, Fernando Borges Miranda, Daniele Porcari Alves e Jacques Douglas Coimbra Dias. Com certeza, vocês acrescentaram muito na minha vida.

Ao pessoal do Hospital Veterinário, pela amizade, paciência e incentivo.

Aos alunos do curso de Medicina Veterinária da UFES pelo respeito e atenção.

Aos meus amigos pelo carinho e atenção. Especialmente aos de Guaçuí, que escolhi como família.

Agradeço àqueles que se fizeram presentes em toda a minha vida e se esqueci de alguém, peço minhas desculpas...

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

RESUMO

A fasciolose é uma doença causada pelo parasito trematodeo *Fasciola hepatica* que acomete o fígado e vias biliares de muitas espécies de animais. Objetivou-se com esta proposta realizar uma avaliação microscópica de fígados bovinos com fasciolose crônica por meio de alterações histopatológicas causadas pela presença do parasito e realização da imunofenotipagem da resposta imune na espécie bovina, avaliando o grau de resposta e sua influência no desenvolvimento da lesão. Além disso, propôs-se uma classificação do grau da lesão crônica no parênquima hepático conforme a evolução da infecção. Utilizaram-se 100 fígados condenados por fasciolose no matadouro frigorífico de Atílio Vivácqua, ES. Coletou-se um fragmento de cada lobo hepático (direito e esquerdo) de cada fígado, que sofreu processamento histotécnico e coloração com hematoxilina-eosina e Tricômico de Masson, além da aplicação da imunoistoquímica com os anticorpos anti-CD3, anti-CD79 α e anti-IgG. Avaliaram-se diferentes graus e intensidade das lesões inflamatórias e fibróticas, sendo classificadas as amostras em Grau I, II e III. As lesões fibróticas se mostraram mais intensas em relação às inflamatórias e a proposta de categorização histopatológica das lesões hepáticas por fasciolose crônica em bovinos mostrou-se um método valioso de avaliação microscópica, uma vez que permite estabelecer o quadro evolutivo dessa enfermidade. Em relação à lesão fibrótica, no lobo direito e esquerdo as lesões foram mais importantes no espaço porta, sendo mais intensa no lobo esquerdo. Lesão fibrótica vascular foi marcante nas artérias que nas veias e sinusóides, principalmente no lobo esquerdo. Em relação à imunoistoquímica, houve marcação pelos anticorpos CD3⁺, CD79 α ⁺ e IgG⁺ tanto no lobo direito quanto no lobo esquerdo. A avaliação imunoistoquímica mostrou-se eficaz na caracterização do tipo celular presente na inflamação causada pela infecção por *Fasciola hepatica*, tornando-se importante no estudo da resposta inflamatória pelos bovinos.

Palavras-chave: histopatologia, categorização, imunofenotipagem, fasciolose, ruminantes

ABSTRACT

The fasciolosis is a disease caused by parasitic trematode *Fasciola hepatica* that affects the liver and biliary tract of many species of animals. The objective of this proposal was to perform a microscopic evaluation of liver cattle with chronic fascioliasis by histopathological changes caused by the presence of the parasite and performing the immunophenotyping of immune response in cattle by assessing the degree of response and its influence on lesion development. Furthermore, was proposed a classification of the degree of chronic lesions in the liver as the evolution of infection. Were used 100 livers condemned for fasciolosis in Atilio Vivacqua, ES slaughterhouse. Were collected a fragment of each liver lobe (right and left) of each liver, which has histotechnic processing and staining with hematoxylin-eosin and Masson's hematoxylin, and the application of immunohistochemistry for CD3 and CD79 α lymphocytes and plasma cells producing IgG. Were evaluated different degrees and intensity of the inflammatory and fibrotic lesions, and classified the samples as degree I, II and III. The fibrotic lesions were more intense in relation to the inflammatory and the proposed categorization of pathological liver injury in chronic fascioliasis in cattle proved to be a valuable method of microscopic evaluation, as for establishing the evolutionary picture of this disease. Regarding the fibrotic lesion in the right and left lobe fibrotic lesions were more important in the space port, being more intense in the left lobe. Fibrotic vascular lesion was more marked in the arteries than in veins and sinusoids, especially in the left lobe. Regarding immunohistochemistry, was marked by CD3⁺, CD79 α ⁺ and IgG⁺ both in the right lobe and the left lobe. The immunohistochemical assessment was effective in characterizing the cell type present in the inflammation caused by infection with *Fasciola hepatica*, making it important to study the inflammatory response of cattle.

Keywords: histopathology, classification, immunophenotyping, fasciolosis, ruminants

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 – Fotomicrografia de fígado de bovino cronicamente infectado por *Fasciola hepatica* revelando hiperplasia de ductos biliares (seta) em espaço porta, objetiva de 20x, coloração de Hematoxilina e Eosina.....41

FIGURA 2 – Fotomicrografia de fígado de bovino cronicamente infectado por *Fasciola hepatica* revelando infiltrado inflamatório mononuclear linfoplasmocitário distribuído difusamente pelo espaço porta (seta), objetiva de 20x, coloração de Hematoxilina e Eosina.....43

FIGURA 3 – Fotomicrografia de fígado de bovino cronicamente infectado por *Fasciola hepatica* revelando arteriosclerose (seta), objetiva de 20x, coloração de Hematoxilina e Eosina.....45

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 – Fotomicrografia de fígado bovino cronicamente infectado por *Fasciola hepatica* demonstrando extensa fibrose em espaço porta. Objetiva de 20x, coloração de Tricromico de Masson58

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 – Fotomicrografia de fígado bovino com lesão categoria I, lobo esquerdo. Espaço porta mostrando células IgG⁺ (seta). Objetiva de 40x76

FIGURA 2 – Fotomicrografia de fígado bovino com lesão categoria II, lobo esquerdo. Espaço porta mostrando linfócitos ocasionais imunorreativos para o anticorpo CD79α⁺ (seta). Objetiva de 40X.....80

FIGURA 3 – Fotomicrografia de fígado bovino com lesão categoria III, lobo esquerdo. Espaço porta mostrando linfócitos imunorreativos para o anticorpo CD3⁺ (seta). Objetiva de 40X.....82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 – Critérios morfológicos de evolução das lesões para a categorização histopatológica de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*.....39

TABELA 2 – Distribuição das 100 amostras de fígado bovino cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* em categorias de lesão crônica após classificação histopatológica.....47

TABELA 3 – Médias dos escores atribuídos à intensidade das principais alterações encontradas no exame histopatológico dentro de cada categoria estabelecida para a lesão crônica causada pela infecção por *Fasciola hepatica*.....48

CAPÍTULO 2

TABELA 1 – Critérios morfológicos de evolução das lesões para a categorização histopatológica de fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*..... 56

TABELA 2 – Médias dos escores da de intensidade da fibrose periportal, fibrose periductal e fibrose difusa no parênquima do lobo direito de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*.....59

TABELA 3 – Médias dos escores da de intensidade da fibrose periportal, fibrose periductal e fibrose difusa no parênquima do lobo esquerdo de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*.....60

TABELA 4 – Médias dos escores de intensidade da fibrose periportal, fibrose periductal e fibrose difusa no parênquima do lobo direito em comparação ao lobo esquerdo de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*.....61

TABELA 5 – Médias dos escores de intensidade da lesão fibrótica em artéria, veia e sinusóide do lobo direito de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*.....63

TABELA 6 – Médias dos escores de intensidade da lesão fibrótica em artéria, veia e sinusóide do lobo esquerdo de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*.....64

CAPÍTULO 3

TABELA 1 – Critérios morfológicos de evolução das lesões para a categorização histopatológica de fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*.....72

TABELA 2 – Anticorpos primários utilizados para a marcação imunoistoquímica em fígado bovino cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*.....74

TABELA 3 – Valores médios do número de células CD3⁺, CD79 α ⁺ e IgG⁺ em espaço porta de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* classificados na categoria I de lesão crônica.....75

TABELA 4 – Médias das células imunorreativas aos anticorpos anti-CD3, anti-CD79 e anti-IgG em espaço porta de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* classificados como categoria I de lesão crônica78

TABELA 5 – Valores médios do número de células CD3⁺, CD79 α ⁺ e IgG⁺ em espaço porta de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* classificados na categoria II de lesão crônica.....79

TABELA 6 – Médias das células imunorreativas aos anticorpos anti-CD3, anti-CD79 e anti-IgG em espaço porta de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* classificados como categoria II de lesão crônica.....81

TABELA 7 – Valores médios do número de células CD3⁺, CD79 α ⁺ e IgG⁺ em espaço porta de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* classificados na categoria III de lesão crônica.....82

TABELA 8 – Médias das células imunorreativas aos anticorpos anti-CD3, anti-CD79 e anti-IgG em espaço porta de fígados bovinos cronicamente infectados por <i>Fasciola hepatica</i> classificados como categoria III de lesão crônica.....	83
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 CARACTERÍSTICAS DO TREMATODA E CICLO DE VIDA	17
2.2 EPIDEMIOLOGIA DA FASCIIOLOSE	18
2.3 ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DA FASCIIOLOSE	22
2.3.1 Achados laboratoriais de animais infectados por <i>Fasciola</i> spp.	22
2.3.2 Resposta do hospedeiro frente à infecção por <i>Fasciola</i> spp.	24
2.3.3 Aspectos clínicos da fasciolose	27
2.3.4 Aspectos patológicos – macroscopia	28
2.3.5 Aspectos patológicos – microscopia	28
2.4 DIAGNÓSTICO DA FASCIIOLOSE	32
2.4.1 Diagnóstico clínico e laboratorial	32
2.4.1.1 Método diagnóstico direto e indireto	32
3 CAPÍTULO 1 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E PROPOSTA DE CATEGORIZAÇÃO DA LESÃO HEPÁTICA EM BOVINOS COM FASCIIOLOSE CRÔNICA.....	35
3.1 RESUMO	35
3.2 ABSTRACT.....	36
3.3 INTRODUÇÃO.....	37
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.4.1 Seleção e coleta da amostra.....	38
3.4.2 Processamento das amostras.....	38
3.4.3 Avaliação histopatológica.....	38
3.4.4 Análise estatística	40

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.5.1 Avaliação histopatológica.....	41
3.6 CONCLUSÕES.....	49
3.7 REFERENCIAS	50
4 CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA FIBROSE EM FÍGADOS DE BOVINOS CRONICAMENTE INFECTADOS POR <i>Fasciola hepatica</i>	53
4.1 RESUMO	53
4.2 ABSTRACT.....	54
4.3 INTRODUÇÃO.....	54
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.6 CONCLUSÕES.....	65
4.7 REFERENCIAS	65
5 CAPÍTULO 3 - ESTUDO IMUNOISTOQUIMICO DE FÍGADOS DE BOVINOS CRONICAMENTE INFECTADOS POR <i>Fasciola hepatica</i>	69
5.1 RESUMO	69
5.2 ABSTRACT.....	70
5.3 INTRODUÇÃO.....	70
5.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
5.4.1 Coleta e processamento das amostras.....	71
5.4.2 Técnica imunoistoquímica para os anticorpos anti-CD3, anti-CD79 α e anti-IgG	73
5.4.3 Contagem das células e Análise estatística.....	75
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.6 CONCLUSÕES.....	86
5.7 REFERÊNCIAS	87

6 CONCLUSÕES GERAIS.....	90
7 REFERENCIAS.....	91
8 ANEXOS	100

1 INTRODUÇÃO

A enfermidade fasciolose hepática é causada por um parasito trematodeo, *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). Este parasito acomete o fígado e vias biliares de muitas espécies de animais domésticos, selvagens e inclusive o homem. Os danos causados pela infecção levam a grandes prejuízos econômicos à pecuária mundial, devido às numerosas condenações de fígados em matadouros frigoríficos, bem como a queda na produção de leite, perda de peso, diminuição da fertilidade, atraso no crescimento, podendo verter à morte dos animais (LUZ et al., 1996).

Pode se tornar uma doença crônica causando fibrose e trauma severo no fígado, inflamação, edema e fibrose dos ductos biliares pela presença das formas adultas. A imunidade adquirida a este parasito difere entre as espécies. Ambas as imunidades humoral e celular parecem importantes para a resistência à infecção por *F. hepatica* (HAROUN e HITLYER, 1986). Porém, Pérez et al. (2002) sugerem que a resposta do hospedeiro à infecção pode agravar os danos hepáticos.

Avaliações imunoistoquímicas também são utilizadas para a verificação da resposta do hospedeiro em detrimento aos danos causados pelo parasito nos fígados dos bovinos. No entanto, pela grande importância que o processo inflamatório desempenha na infecção em ovinos e caprinos, a grande maioria dos testes imunoistoquímicos são direcionados à estas espécies animais (MARTÍNEZ-MORENO et al., 1999; MEEUSEN et al., 1999; PÉREZ et al., 2002).

A avaliação microscópica de fígados acometidos por *Fasciola hepatica*, por meio do comportamento da imunidade celular e humoral frente aos antígenos dos parasitas tornou-se um importante adjuvante na elucidação da resposta imunológica do hospedeiro. Além disso, a caracterização das lesões por meio de exames histopatológicos e imunoistoquímicos contribuirão para o diagnóstico diferencial de diversas doenças que acometem o fígado dos ruminantes.

Objetivou-se com esta proposta realizar uma avaliação microscópica de fígados bovinos com fasciolose crônica por meio de alterações histopatológicas causadas pela presença do parasito e realização da imunofenotipagem da resposta imune na espécie bovina, avaliando o grau de resposta e sua influência no desenvolvimento da lesão. Além disso, propõe-se uma classificação do grau da lesão crônica no parênquima hepático conforme a evolução da infecção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS DO TREMATODA E CICLO DE VIDA

A fasciolose é causada por *Fasciola hepatica*, um trematodeo digenético da família dos fasciolídeos pertencente ao filo Platyhelminthes e parasito dos canais biliares de diferentes hospedeiros. Macroscopicamente o trematodo jovem tem 1 a 2 mm de comprimento e formato de lanceta. Nos ductos biliares adquire formato de “folha” quando adulto, coloração castanho acinzentada e cerca de 3,5 cm de comprimento e 1 cm de largura. Microscopicamente o tegumento é recoberto de espinhos projetados para trás e observa-se facilmente uma ventosa oral e ventral. Seu ovo é oval, operculado, amarelo e grande (URQUHART et al., 1998). Medem cerca de 130 a 145 µm de comprimento por 70 a 90 µm de largura. Para a maturação dos ovos são necessárias condições adequadas de umidade e temperatura, sendo no verão, incubação curta emergindo o miracídio em poucas semanas (10 a 12 dias à 26°C), porém, em temperaturas baixas a eclosão pode demorar meses (NAHM, 1997).

Os ovos podem ser encontrados viáveis em material fecal por cerca de um ano, ao passo que os miracídios, extremamente frágeis, precisam de um hospedeiro apropriado em aproximadamente oito horas (ACHA e SZYFRES, 1986). Os miracídios liberados infectam os hospedeiros intermediários, moluscos do gênero *Lymnaea* (*L. collumela* e *L. viatrix* no sul e *L. collumela* e *L. cubensis* no Rio de Janeiro), neles se desenvolvendo e multiplicando em esporocistos, rédias e cercárias. De um miracídio podem ser produzidas cerca de 4.000 cercárias e condições climáticas favoráveis à sobrevivência dos moluscos e à produção de ovos pelos parasitos adultos irão determinar o grau de infecção das pastagens (ECHEVARRIA, 2004).

Após penetrar no molusco o miracídio perde os cílios e se transforma em esporocisto que cresce e origina em seu interior as rédias. Com o rompimento do esporocisto as rédias liberadas migram para a glândula digestiva do molusco onde irão se desenvolver e transformar-se em cercárias. As cercárias maduras vão para o tecido do molusco de onde emergirão. Condições de clima como frio e chuva, e mudanças bruscas na temperatura da água estimulam a emergência das cercárias. No ambiente aquático as cercárias nadam ativamente e se fixam a um substrato

onde perdem a cauda e encistam, originando as metacercárias que são as formas infectantes. O período após a penetração do miracídio até a formação de metacercárias infectantes varia entre 45 a 60 dias dependendo de condições favoráveis de temperatura e umidade (SILVA et al., 1980).

As folhas de capim ou mesmo do agrião contendo metacercárias encistadas tornam-se fonte de infecção e após a ingestão pelo hospedeiro definitivo, as metacercárias são liberadas na porção superior do intestino alcançando a cavidade peritoneal e penetrando no fígado através da cápsula de Glisson, onde atingirão os ductos biliares e se tornarão adultos (FARINAZZO et al., 2001). O período pré-patente dura aproximadamente dois meses, mas nem todos os parasitos alcançam a maturidade ao mesmo tempo, podendo o processo de maturação estender-se (SOULSBY, 1982). O reinício do ciclo começa com a oviposição dos exemplares adultos que podem sobreviver nos ductos biliares por vários anos (ACHA e SZYFRES, 1986).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DA FASCIULOSE

A dinâmica da fasciolose está ligada à ecologia dos moluscos (hospedeiros intermediários). Características como geografia, composição do solo, bem como fatores climáticos são determinantes na reprodução dos hospedeiros intermediários e, como consequência a epidemiologia da fasciolose (ACHA e SZYFRES, 1986).

Segundo Silva et al. (1980) e Beck (1993) as infecções por *F. hepatica* e os índices de prevalência que as acompanha são determinados pelas características próprias de cada região, variando de acordo com as condições climáticas, ocorrência de áreas alagadiças, presença de hospedeiro vertebrado e principalmente pela presença do molusco do gênero *Lymnaea*.

Os habitats dos moluscos podem ser divididos em dois grandes grupos, sob a ótica ecológica: os focos primários, também chamados de reservatórios; e aqueles denominados de áreas de disseminação. Os focos primários compreendem locais de umidade permanente, como rios de pouco curso, lagos, canais, campos alagadiços, onde os moluscos se reproduzem ativamente, mantendo uma população uniforme, em nível quase sempre baixo. Já as áreas de disseminação são aquelas onde se

alternam períodos de seca e inundação, considerados ambientes de disseminação dos focos primários originais e contém grande número de moluscos, tornando-se área de interesse epidemiológico (ACHA e SZYFRES, 1986).

Em períodos de chuva a presença do limneídeo facilita a disseminação e estabelecimento de novos criadouros. Em condições climáticas favoráveis (temperatura acima de 10°C), os ovos produzidos pelos moluscos eclodem formando uma nova geração em apenas um mês. Durante as estações de chuva, a população de moluscos aumenta, ao passo que em estações de seca e frio essa população diminui. Nos períodos em que as condições climáticas são desfavoráveis os moluscos podem sobreviver entrando em estivação por vários meses (SILVA et al., 1980).

Nem sempre há uniformidade na ecologia do molusco. Em uma pesquisa desenvolvida nos municípios de Piquete e Redenção da Serra, estado de São Paulo, foi estudada a dinâmica populacional do molusco *Lymnaea columella* por um período de seis anos na pastagem de fazendas de exploração leiteira infectadas por *Fasciola hepatica*. Constatou-se que a dinâmica da população de moluscos está estreitamente relacionada a fatores ecológicos e climáticos, sendo encontrados uma população maior de moluscos no período seco do ano (maio-outubro) no município de Piquete, e no município de Redenção da Serra a população de moluscos foi maior no período de altas temperaturas e alta densidade pluviométrica (janeiro-março) (MAURE et al., 1998).

Em estudo utilizando *L. columella* da região do Vale do Paraíba e região serrana do Rio de Janeiro, Gomes (1985) avaliou experimentalmente a suscetibilidade dos moluscos à infecção por miracídios provindos de *Fasciola hepatica* de ovinos. Verificou-se sobrevivência maior e, conseqüente produção maior, de metacercária em moluscos submetidos à infecção com três miracídios em comparação aos infectados com cinco miracídios.

Dacal et al. (1988) compararam a suscetibilidade de *L. columella* provenientes de quatro diferentes regiões de Minas Gerais com amostras oriundas do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, verificando que a suscetibilidade à infecção por miracídios originados de ovos de *Fasciola hepatica* provenientes de ovinos era semelhante.

No que tange a fasciolose, além da importância dos moluscos está o papel do hospedeiro definitivo, o qual elimina ovos em ambientes favoráveis ao desenvolvimento do parasito. Jimenez-Albarran et al. (1977) coletaram ovos da vesícula biliar de ovelhas, vacas e cabras para a obtenção de miracídios e comparação do desenvolvimento dos ovos de cada um dos hospedeiros. Os ovos provenientes de vaca foram capazes de formar maior número de miracídios, no entanto, o maior número de ovos viáveis (com miracídios liberados) foram os de ovelhas. Com isso, estes autores concluíram que a suscetibilidade do hospedeiro definitivo contribui para a transmissão da doença.

O ovino é o hospedeiro definitivo mais importante desta parasitose. O animal que padece de uma infecção subclínica leve pode contaminar o campo diariamente com mais de meio milhão de ovos. Já nos casos de infecção moderada, com 2,5 milhões de ovos por dia (BORAY, 1969).

Na investigação da influência do hospedeiro definitivo sobre a prevalência da infecção de *L. truncatula* exposta a miracídios oriundos de ovos de diferentes hospedeiros, Rondelaud e Dreyfuss (1995) demonstraram que os ovos oriundos de bovinos ou ovinos foram mais eficazes na transmissão da doença do que os ovos obtidos de coelhos. A prevalência da infecção dos moluscos neste caso foi de 35%, 66% e 86% para coelho, ovino e bovino, respectivamente.

Outras espécies de herbívoros, dentre eles os lagomorfos, podem servir como hospedeiros definitivos. Na Austrália, alguns desses animais podem ser considerados como hospedeiros temporários, e por essa razão, não matêm o ciclo por muito tempo, como no caso dos coelhos silvestres, que contaminam de forma insignificante as pastagens onde vivem (BORAY, 1969).

Abrous et al. (1998) investigaram a partir de dados encontrados na literatura de alguns países europeus as evidências sobre a viabilidade morfológica de ovos de *Fasciola hepatica* relacionando a espécie de hospedeiro e sua região de origem, mostrando que os ovos encontrados em roedores e lagomorfos eram menores se comparados aqueles encontrados em ruminantes. Os resultados permitiram aos autores concluir que a espécie de hospedeiro é o principal componente da variabilidade morfológica de ovos de *Fasciola hepatica*, e que a distribuição geográfica parece não ser um fator contribuinte para essa variabilidade. Mendes (2006) encontrou diferença significativa na morfologia dos ovos (comprimento) de

Fasciola hepatica oriundos de bovinos naturalmente infectados após passagem em *Callithrix penicillata* (sagüi) e *Meriones unguiculatus* (gerbil).

Na Europa, a suscetibilidade de hospedeiros lagomorfos *Oryctolagus cuniculus* e roedores *Myocastor coypus* foi demonstrada por Ménard et al. (2000), encontrando taxa de infecção natural de 34% para o *Oryctolagus cuniculus* e 55% para o *Myocastor coypus*. Costa et al (1987) apontaram o *Myocastor coypus*, no Brasil, como um dos principais reservatórios e provável disseminador de *Fasciola hepatica* na Estação Experimental Zootécnica de Dom Pedrito, no estado do Rio Grande do Sul.

Ainda no Brasil, Mendes (2006) estudou a dinâmica da infecção em *Callithrix penicillata* e *Meriones unguiculatus*, concluindo que o *Callithrix penicillata* pode ser usado como modelo na manutenção do ciclo biológico de *Fasciola hepatica* produzindo ovos viáveis capazes de infectar *Meriones unguiculatus*, porém, estes produzem ovos inviáveis.

Na região do Altiplano Boliviano os principais hospedeiros são os ovinos e bovinos, no entanto, asininos e suínos são considerados hospedeiros secundários (VALERO et al., 2000). No continente europeu, os suínos são considerados reservatórios ocasionais (HURTREZ-BOUSSÈS et al., 2001).

Na América do Sul, principalmente na Bolívia e Peru, a fasciolose é um sério problema de saúde pública. Na região denominada Altiplano Boliviano, a prevalência da fasciolose humana varia de 72 a 100% (HURTREZ-BOUSSÈS et al., 2001). Segundo Faiguenbaun et al. (1962) o homem se infecta pela ingestão de saladas de agrião que contem metacercárias aderidas à superfície da planta, no entanto, em algumas ocasiões, o alface e outras plantas contaminadas quando consumidas cruas e água de canais de irrigação e de outros receptáculos onde existam metacercárias podem se tornar fontes de infecção.

Fraga (2008) avaliou a incidência de *Fasciola hepatica* em bovinos da região Sul do Espírito Santo encontrando uma crescente anual dos casos, sendo 4,9% em 2005, 15,2% em 2006 e 20% em 2007, o que permitiu concluir que a fasciolose é um problema econômico na região e preocupa pela possibilidade de infecção humana.

2.3 ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DA FASCIULOSE

Fatores como carga parasitária, fase de desenvolvimento do parasito, tipo e idade do hospedeiro, localização e condição das pastagens e época do ano influenciam na variabilidade da patogenia e sintomatologia provocadas pela infecção por *Fasciola hepatica*. A presença de parasitos jovens no parênquima hepático caracteriza o desenvolvimento da fase aguda da doença, ao passo que a fase crônica é caracterizada pela presença dos parasitos adultos nos ductos biliares (BORAY, 1969).

As metacercárias desencistam no intestino delgado após sua ingestão liberando as formas imaturas que logo iniciam sua migração abrindo caminhos no intuito de alcançarem a cavidade peritoneal e o fígado. Durante seu trajeto as formas imaturas provocam lesões características, como escavações na área central das vilosidades, corrosões na camada mucosa, submucosa e muscular e destruição da camada serosa da parede intestinal. Quando chegam ao fígado os parasitos jovens continuam sua migração pelo parênquima hepático, destruindo-o e provocando hemorragias e áreas de necrose devido ao traumatismo ocasionado. Os parasitos adultos penetram nos ductos biliares e iniciam suas migrações através do epitélio ductal, alimentando-se de sangue e ocasionando extensas áreas de erosão e necrose da mucosa ductal associada a reações inflamatórias (SILVA et al., 1980; BECK, 1993; BERNE, 1994).

2.3.1 Achados laboratoriais de animais infectados por *Fasciola* spp.

As lesões causadas no parênquima hepático, juntamente com hemorragias, causam alterações bioquímicas significativas em grandes ruminantes, no entanto, não são tão severas quanto em ovinos. Anemia devido à hemorragia pode se desenvolver quando os parasitos adultos se estabelecem nos ductos biliares e sua gravidade é diretamente proporcional à carga parasitária em bovinos, embora não seja o caso de búfalos, indicando que os bovinos são menos resistentes à infecção (WIEDOSARI et al. 2006).

Lotfollahzadeh et al. (2008) estudando o tipo de anemia e o grau de danos hepáticos causados por *Fasciola hepatica* em bovinos encontraram redução dos

níveis de hematócrito, concentração de hemoglobina, hemoglobina corpuscular média (CHM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e níveis reduzidos da concentração de ferro sérico, concluindo que a anemia observada em bovinos infectados por *F. hepatica* é normocítica e hipocrômica, e que a etiologia dessa anemia é a diminuição crônica de sangue pela atividade hematófaga dos parasitos adultos.

Alterações celulares no sangue periférico de ratos e camundongos infectados por *F. hepatica* inclui aumento no número de eosinófilos durante a infecção. Nos ratos, no início da infecção o número de eosinófilos não apresentou alterações significativas, somente um aumento acentuado aos 21 dias pós-infecção. Já em camundongos encontrou-se um aumento significativo no número de eosinófilos logo após o início da infecção com um pico aos sete dias pós-infecção (MILBOURNE e HOWELL, 1990). Keegan e Trudgett (1992) demonstraram que na fasciolose ocorre durante a infecção o aumento de células polimorfonucleadas e profunda eosinofilia.

Zhang et al. (2005) comparando a resposta celular de ovinos experimentalmente infectados com *F. hepatica* e *F. gigantica* encontraram um aumento da leucometria total da terceira à quinta semana pós-infecção para *F. hepatica* e da segunda à quarta semana para *F. gigantica*. No entanto, nenhuma mudança significativa foi observada nos valores de linfócito, neutrófilo, basófilo e monócito. Porém, a contagem de eosinófilos aumentou significativamente tanto para a infecção com *F. hepatica*, quanto para *F. gigantica* em relação aos grupos controle.

Yang et al. (1998) avaliaram os níveis de AST, GLDH e GGT em búfalos com fasciolose subclínica experimental. Obtiveram aumento dos níveis de AST na sexta semana pós-infecção com pico máximo na décima quarta semana e manutenção dos níveis elevados até a vigésima terceira semana pós-infecção. O valor de GLDH foi significativamente elevado da sexta até a vigésima primeira semana pós-infecção. Aumento significativo de GGT ocorreu da oitava a vigésima sexta semana com o máximo do valor na décima quinta semana.

Wiedosari et al. (2006) observaram um aumento significativo das enzimas hepáticas em búfalos e bovinos infectados com 15 metacercárias de *Fasciola gigantica* semanalmente durante 32 semanas, sendo que os búfalos mostraram menor nível de GLDH e GGT em relação aos bovinos. Proteínas séricas totais e

bilirrubina estiveram aumentadas após o dano hepático, enquanto a bilirrubina urinária foi igualmente aumentada em proporção ao número de *F. gigantica* em búfalos.

Lotfollahzadeh et al. (2008) encontraram aumento significativo nos níveis de aspartato amino transferase (AST), GGT e fosfatase alcalina (FA) quando estudaram o grau de danos hepáticos causados por *Fasciola hepatica* em bovinos, concluindo que o aumento da atividade enzimática indica injúria crônica ao tecido hepático e ducto biliar associado à infecção crônica com *Fasciola hepatica*.

2.3.2 Resposta do hospedeiro frente à infecção por *Fasciola* spp

A suscetibilidade ou resistência relativa do hospedeiro frente à infecção por *Fasciola* sp. está associada a características bioquímicas do parasito e também da resposta imune do hospedeiro durante o curso da doença (MEEUSEN e PIEDRAFITA, 2003). É preciso aumentar o conhecimento a respeito do mecanismo de suscetibilidade ou resistência a *Fasciola* spp. para controlar a doença (ZHANG et al., 2005).

A falta de resistência dos ovinos para fasciolose aguda contrasta com a alta resistência dos bovinos e conduz a uma suposição geral de que estes têm a capacidade imunológica de eliminação dos parasitos no fígado. Bovinos mostraram-se resistentes a infecções subseqüentes quando comparados com animais não infectados e demonstrou-se que essa resistência se dava pela extensa fibrose causada pela infecção primária do que propriamente pela resposta imunológica (MULCAHY e DALTON, 2001).

Ferre et al. (1997) estudaram a resposta de ovinos com fasciolose subclínica através da dosagem dos anticorpos IgG e IgA do soro e da bile. Foi observado que os títulos de IgG e IgA anti *Fasciola hepatica* do soro aumentaram a partir da segunda semana pós-infecção e os valores máximos foram observados na oitava semana tendendo a um pequeno decréscimo após. Os títulos de IgG e IgA específicos para a fasciolose detectaram a infecção precocemente, antes da eliminação dos ovos nas fezes.

Com o objetivo de comparar as mudanças imunológicas e bioquímicas séricas na pré-infecção de ovinos da raça Merino infectados com *F. hepatica* e *F. gigantica*, Raadsma et al. (2007) observaram que todos os grupos infectados, seja com *F. gigantica* ou *F. hepatica* apresentaram elevação nos níveis de IgA, IgG1 e IgG2 anti-fasciola e posteriormente declinaram a medida em que a infecção se tornava crônica.

Bovinos produzem IgG1 específica, mas pouca ou não específica IgG2 com o seguimento da infecção por *F. hepatica*. Com o progresso da mesma e a cronicidade da doença, os níveis séricos de IgG1 cessam e lentamente declinam. A produção de IgG1 em bovinos é controlada por citocinas liberadas por células Th2, ao passo que IgG2 tem produção controlada por citocinas liberadas por células Th1 (MULCAHY e DALTON, 2001).

Um estudo da proliferação de células mononucleares do sangue periférico de ovinos também foi conduzido por Zhang et al. (2005). Estas células foram cultivadas em meio contendo antígenos de secreção/excreção de *F. hepatica* (FhESP) e *F. gigantica* (FgESP), observando proliferação celular semelhante nas duas culturas, sendo mais intensa na primeira semana pós-infecção para *F. gigantica*. A partir da quarta semana pós-infecção houve um decréscimo na proliferação celular sem diferença significativa entre os grupos, sugerindo que em infecções por *F. gigantica* há a indução mais rápida da resposta mediada por célula do que nas infecções por *F. hepatica*.

Prowse et al. (2002) procuraram identificar moléculas imunossupressoras em produtos de secreção-excreção (ES) de *F. hepatica* com o intuito de estudar o potencial supressivo utilizado por essas moléculas para diminuir a resposta imune do hospedeiro. Observaram que o maior componente do ES que causou a supressão da proliferação dos linfócitos apresentava peso molecular de 28 kDa e que a mesma representava a proteína Catepsina L. Em análise utilizando *Western Blotting* da fração supressiva com anticorpos anti-Catepsina L de *F. hepatica* confirmaram o potencial desta molécula em suprimir a proliferação de linfócitos.

Raina et al. (2004) avaliando a resposta imune humoral contra o antígeno protéico de fixação dos ácidos graxos em ovinos, bovinos e bubalinos, observaram após testes ELISA e *Western Blotting* não haver resposta imune humoral significativa com esse antígeno de *F. gigantica*. Uma explicação para a falha na resposta contra

este antígeno é que o mesmo não seja expresso na superfície do parasito, não produzindo, portanto, resposta antigênica.

Zhang et al. (2005) estudaram a produção de interferon-gama (INF γ) e de interleucina 10 (IL-10) por células mononucleares de sangue periférico de ovinos cultivadas na presença de antígeno de excreção/secreção de *F. hepatica* (FhESP) e *F. gigantica* (FgESP) e observaram que a produção desses fatores mostrou-se similar tanto para o cultivo com FhESP, quanto para FgESP, e que ocorreu aumento na primeira semana pós-infecção, decrescendo em seguida. A IL-10 produzida em meio contendo FhESP variou individualmente, sendo maior neste grupo que naquele cultivado com FgESP.

Avaliações imunoistoquímicas também são utilizadas para a verificação da resposta do hospedeiro em detrimento aos danos causados pelo parasito nos fígados dos bovinos. Pérez et al. (2002) realizaram um estudo imunoistoquímico de fígado de ovinos, encontrando uma resposta imune intensa, celular e humoral, representada pela infiltração de linfócitos T CD3⁺, células B CD79 α ⁺ e células plasmáticas IgG⁺. No entanto, quando tratados com triclabendazole às 12 semanas pós-infecção, observou-se uma redução significativa na infiltração de células T e B, a qual pode ter ocorrido pela eliminação da estimulação antigênica parasitária. Porém, os animais tratados e infectados mostraram forte infiltração com células T CD3⁺, células B CD79 α ⁺ e células plasmáticas IgG⁺.

Molina e Skerratt (2005) estudaram por meio da imunoistoquímica hepática, a resposta humoral e celular de bovinos e búfalos infectados com *F. gigantica*. Encontraram uma resposta imune elevada às três semanas pós-infecção. No entanto, o número de linfócitos T declinou continuamente até a décima sexta semana. Em búfalos, o aumento das células T foi observado a partir da sétima semana pós-infecção. A partir da sétima semana, bovinos e búfalos infectados apresentaram um alto número de células B CD79b⁺ nas lesões hepáticas, aumentando de acordo com a progressão da infecção. Eosinófilos e mastócitos também estiveram presentes nas lesões a partir da terceira semana. Essas diferenças entre as respostas de bovinos e búfalos podem ter um importante papel sobre as diferenças na resistência e resiliência à infecção entre bovinos e bubalinos.

2.3.3 Aspectos clínicos da fasciolose

Normalmente, a fasciolose nos animais assume uma forma aguda ou uma forma crônica. Tem a forma aguda quando ocorre a ingestão de uma grande quantidade de metacercárias em um curto período de tempo, com sintomatologia ocasionada pelas lesões provocadas pela migração maciça das larvas através do intestino, pelo peritônio e no parênquima hepático (SOULSBY, 1987; URQUHART et al., 1998). Em decorrência disso, observam-se diarreia, febre, anemia, podendo em alguns casos, como acontece em cordeiros ocasionar até uma alta mortalidade em 12 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas (CORDERO et al., 1999). Em geral, nesta fase os animais podem se apresentar fracos, com mucosas pálidas, dispnéicos e em alguns casos com fígado dilatado e palpável associado à dor abdominal e ascite (SILVA et al., 1980; BECK, 1993; BERNE, 1994).

Quando os animais ingerem poucas metacercárias durante um longo período de tempo, caracterizando a forma crônica da doença, podem assim reagir e reacionarem à infecção. Clinicamente os sintomas decorrem da migração das larvas e são mais brandos, com predominância de sintomas causados pela disfunção hepática, como emagrecimento, atraso no crescimento, diminuição da fertilidade, queda de produção (carne, leite e lã), ascite e icterícia. Normalmente encontra-se diarreia e anemia, que geralmente é moderada (GONZÁLEZ, 1982).

Além das alterações hepáticas, outros órgãos podem ser afetados de forma não totalmente compreendida. Um estudo indicou que a infecção por *Fasciola gigantica* pode reduzir o ganho de peso no crescimento sobreano de zebus (SEWELL, 1966). Porém, o nível de infecção, raça, espécie, idade, sexo e, em particular, o nível de nutrição, podem influenciar o efeito deletério da fasciolose. Existem evidências de que o tipo de alimentação e o nível, especialmente de proteínas, podem dar alguma proteção contra esse efeito (GRABER, 1971).

Estudos demonstraram que os animais adultos são menos suscetíveis à mudança de peso. E está provado que animais anêmicos têm desempenho reduzido. O efeito adverso da anemia na fertilidade relatado na Índia (KUMA e SHARMA, 1991) e Indonésia (SPITHILL et al., 1999) é expresso no intervalo de tempo entre partos. Sabe-se que o retardo no ganho de peso do animal pode levar a um atraso na maturidade e fertilidade (ENTWISTLE, 1978).

2.3.4 Aspectos patológicos – macroscopia

Durante a fase aguda da fasciolose em ovinos o fígado pode apresentar-se dilatado e com cápsula espessada, coberto por um exudato fibrinoso e lobo ventral hemorrágico. Hemoperitônio também é visto. Ao corte, o fígado apresenta focos hemorrágicos difusos e presença de parasitos jovens. Trajetos hemorrágicos formados por parênquima hepático necrótico causados pela migração das formas jovens de *Fasciola hepatica* são também vistos e se apresentam macroscopicamente como vermelho-escuros. Porém, com o passar do tempo tornam-se pálidos em relação ao parênquima adjacente. As migrações podem causar várias seqüelas como peritonite aguda, abscessos hepáticos, proliferação de esporos de *Clostridium haemolyticum* ou *C.novyi* tipo B no tecido necrótico com subsequente desenvolvimento de hemoglobinúria bacilar ou hepatite infecciosa necrosante, respectivamente. Morte do hospedeiro em consequência da necrose hepática aguda e disseminada pode ocorrer em casos de infecções massivas (RIET-CORREA et al., 2001; CARLTON e McGAVIN, 1998).

A fase crônica da fasciolose caracteriza-se macroscopicamente por um fígado pálido, com o lobo ventral reduzido de tamanho. Parasitos adultos estão presentes nos grandes ductos biliares causando colangite e colangiohepatite. A colangite crônica juntamente com a obstrução dos ductos biliares causam ectasia e estenose dos ductos e, conseqüentemente, fibrose periductal que espessa as paredes dos ductos que se tornam progressivamente evidentes. O conteúdo no interior dos ductos distendidos é marrom (RIET-CORREA et al., 2001; CARLTON e McGAVIN, 1998). Os ductos biliares aumentam de volume e frequentemente ocorre hiperplasia das paredes e também calcificação das lesões tissulares, estas mais evidentes em bovinos que em ovinos (SILVA et al., 1980; BECK, 1993 e BERNE, 1994).

2.3.5 Aspectos patológicos – microscopia

Na fase aguda, os parasitos infectam o fígado e iniciam sua migração pelo parênquima hepático destruindo-o e provocando hemorragia e surgimento de áreas

de necrose, devido ao traumatismo mecânico ocasionado pela ingestão de sangue e tecidos, formando túneis (SILVA et al., 1980; BECK, 1993; BERNE, 1994). Microscopicamente, os túneis formados pela migração da forma jovem do parasito mostram hepatócitos degenerados e preenchidos com sangue e detritos, além de pigmentos sanguíneos e eosinófilos (BORDIN, 1995). Em cortes histológicos, Keegan e Trudgett (1992) relataram a presença de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e monócitos circundando o parasito durante a migração pelo parênquima hepático.

De acordo com Riet-Correa et al. (2001), na fase crônica da fasciolose observa-se colangite ulcerativa com exuberância fibrosa na parede dos ductos. Há também infiltrado inflamatório polimorfonuclear e mononuclear. Em bovinos o processo patológico é semelhante ao de ovinos, no entanto, o espessamento com calcificação dos ductos biliares com dilatação da vesícula biliar são as lesões mais características.

Em bovinos infectados por *F. gigantica*, Molina (2005) observou em estudo histopatológico pequena área de necrose no fígado com reação leucocitária consistindo de eosinófilos, linfócitos e macrófagos em três semanas pós-infecção. Sete semanas pós-infecção houve a presença de infiltrado linfocítico em espaço porta, ao passo que na décima segunda semana pós-infecção uma reação portal marcada pelo aumento de tecido conjuntivo, vasos linfáticos dilatados, hiperplasia de ductos biliares e cirrose severa estava presente. Também se observou extensa área de necrose preenchida com material fibrinoso e eosinófilos. Na décima sexta semana pós-infecção observou-se presença de ducto biliar necrótico e fibrose dos ductos menores com inflamação. Também se observou hiperplasia de ducto biliar com linfócitos, macrófagos e células plasmáticas, com áreas de necrose e hemorragia.

Bostelmann et al. (2000) observaram em cortes histológicos de fígados de bovinos infectados por *F. hepatica*, dilatação dos ductos biliares com fibrose de parede e presença de cortes do parasito adulto, além de detritos celulares na luz. As paredes dos ductos mais calibrosos estavam espessadas demonstrando formações acinares irregulares composta por epitélio colunar alto e distribuídas pelo terço médio da parede com infiltração de linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos. Áreas de necrose foram observadas no epitélio de revestimento ductal, ou mesmo áreas focais de ausência de epitélio. Hiperplasia de ductos biliares em espaço porta

foi encontrada em todos os fígados estudados associado a proliferação de tecido conjuntivo fibroso. A infiltração por linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos variava de moderada a intensa com presença de mastócitos. Necrose focal antiga com tecido de granulação e hemossiderófagos foram encontradas em dois fígados analisados. Fibrose difusa também foi observada.

Nos búfalos, Molina (2005) não observou áreas de necrose focal na terceira semana de infecção, apenas um pequeno infiltrado inflamatório periportal composto por linfócitos. Na sétima semana pós-infecção foi encontrado somente pequeno infiltrado inflamatório em espaço porta e aumento pouco significativo do tecido conjuntivo conduzindo à cirrose. Na décima segunda semana pós-infecção houve aumento moderado no tecido conjuntivo causando cirrose moderada, juntamente com reação celular forte em área portal composta por muitos linfócitos. Já na décima sexta semana pós-infecção, o ducto biliar foi recoberto por infiltrado inflamatório composto predominantemente por linfócitos. No espaço porta houve aumento no tecido conjuntivo e desenvolvimento de cirrose moderada e recente. Intensa hiperplasia de ductos biliares esteve presente.

Bostelmann et al. (2000) avaliaram cortes histológicos de fígado de bubalinos infectados por *F. hepatica* e encontraram ductos dilatados com parasito em seu interior em todos os fígados estudados. As paredes eram espessadas e apresentavam formações acinares a partir da porção média interna revestidas por epitélio colunar alto e infiltradas por linfócitos, plasmócitos e eosinófilos. Adjacente aos ductos havia necrose moderada do parênquima hepático. O revestimento interno dos ductos estava ausente na maioria dos cortes. Nos ductos onde se encontravam parasitos havia infiltração linfoplasmocitária periductal variando de moderada a severa. A hiperplasia de ductos biliares em espaço porta era discreta. Já o infiltrado inflamatório periportal era leve a moderado composto por linfócitos, plasmócitos e eosinófilos. O grau de fibrose neste local também variava de leve a moderado. Havia edema e arteriosclerose sendo que fibrose difusa não foi observada nos fígados estudados.

Em ovinos, Pérez et al. (2002) encontraram fibrose periportal extensa, proliferação de ducto biliar e severo infiltrado inflamatório composto por linfócitos T CD3⁺, linfócitos B CD79⁺ e células produtoras de IgG. Há também perda da arquitetura lobular e cirrose moderada. Grandes ductos continham debris celulares e

ovos de parasito que eram cercados por numerosos leucócitos. Hemossiderófagos em quantidade significativa eram muitas vezes vistos. Granulomas com centros necróticos ou mineralizados cercado por macrófagos, células gigantes, eosinófilos e linfócitos estiveram presentes nas amostras avaliadas.

Bostelmann et al. (2000) encontraram em três fígados de ovino infectados por *F. hepatica*, cortes do parasito adulto na luz dos ductos biliares. A parede dos ductos era espessada por tecido conjuntivo fibroso e isenta de epitélio. Em alguns ductos obervou-se hiperplasia do epitélio com formação de pregas. Necrose de hepatócitos esteve presente em áreas adjacentes aos ductos afetados. Em todos os fígados estudados áreas irregulares de necrose com hemorragia estiveram presentes. Em áreas de necrose antiga havia reação granulomatosa com presença de células gigantes multinucleadas e macrófagos com hemossiderina. Em um dos fígados havia ovo do parasito envolto pelo tecido de granulação. A fibrose e hiperplasia de ductos biliares em espaços porta variava de leve a moderada. Em alguns fígados foi observada estenose de vasos portais. Nos espaços porta havia intensa infiltração eosinofílica com arterite e flebite em um dos fígados estudados. Foi observado edema no espaço porta e presença de focos linforreticulares distribuídos difusamente no parênquima.

Estudos imunoistoquímicos são conduzidos com a finalidade de se entender a dinâmica da infecção e reação do hospedeiro com a marcação de diferentes células em diferentes espécies. Pérez et al. (1998) estudaram a marcação de linfócitos T CD2⁺, CD4⁺, CD8⁺, γ/δ , células produtoras de IgM e λ IgG e linfócito B CD79⁺ em cabras. Pérez et al. (1999) estudaram a marcação de linfócito T CD3⁺ e célula produtora de IgG em cabras. Pérez et al. (2002) avaliaram a marcação de linfócitos CD3⁺, linfócito B CD79⁺ e célula produtora de IgG em ovinos. Molina e Skerratt (2005) estudaram a marcação de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e linfócito B CD79b⁺ e células plasmáticas em bovinos e búfalos. Timoteo et al. (2005) avaliaram a marcação do antígeno *Fas2* presente no produto de excreção/secreção (E/S) de *Fasciola* sp em alpacas. Zafra et al. (2009) estudaram a marcação de linfócitos T CD2⁺, CD4⁺, CD8⁺, γ/δ , células produtoras de IgM em fígado de cabras infectadas com *F. hepatica* e imunizadas com peptídeo Sm14 e encontraram uma redução do infiltrado inflamatório local de CD2⁺, CD4⁺, CD8⁺ nas lesões hepáticas.

2.4 DIAGNÓSTICO DA FASCIULOSE

2.4.1 Diagnóstico clínico e laboratorial

O fato dos sinais clínicos da fasciolose não serem específicos, e por consequência serem confundidos com os de outras enfermidades, o diagnóstico clínico torna-se difícil, sendo necessário o diagnóstico laboratorial (ECHEVARRIA, 1985). Quando há causas de anemia, perda da condição corporal ou mortalidade dos animais que pastejam em áreas favoráveis à ocorrência de *F. hepatica*, a fasciolose deve ser considerada e investigada (ECHEVARRIA, 2004).

Testes laboratoriais podem ser empregados na fase aguda ou subaguda da infecção, os quais irão aferir o nível plasmático de enzimas como a glutamato desidrogenase e glutamato oxalacetato aminotransferase (início da infecção até fase no parênquima) e também a gama-glutamil transferase (lesão dos ductos biliares) que são liberadas em maior quantidade na corrente sanguínea conforme a fase de evolução dos parasitos (BEHN, 1994). Níveis plasmáticos de Glutamato Desidrogenase (GLDH) estão aumentados sete a 14 dias pós-infecção, ao passo que a Gama Glutamil Transpeptidase (GGT) encontra-se aumentada seis a oito semanas pós-infecção, devido às lesões celulares causados no epitélio dos canais biliares (ACOSTA, 1994; URQUART *et al.*, 1998).

No caso de animais mortos, a presença dos parasitos adultos ou imaturos pode ser facilmente detectada no fígado e a necropsia poderá também identificar qualquer outra causa (ECHEVARRIA, 2004). Em geral, formas jovens do parasito são encontradas no parênquima hepático durante a fase aguda da infecção, sendo a fase crônica caracterizada pela presença das formas adultas dos parasitos nos ductos biliares (BORAY, 1969).

2.4.1.1 Método diagnóstico direto e indireto

Os meios de diagnóstico diretos envolvem a detecção dos ovos da *Fasciola* por meio de exames coproparasitológicos. Destes, o mais comum é o de sedimentação, cujo princípio se baseia na suspensão das fezes com água e sedimentação dos ovos do parasito em cálice de sedimentação, com posterior

avaliação do sedimento por microscopia. A técnica de sedimentação possui uma sensibilidade de 78% e, uma especificidade de 100% desde que o técnico seja bem treinado (QUEIROZ, 2005).

A sorologia tem sido a ferramenta de eleição como método de diagnóstico indireto para fasciolose, onde se pesquisam no soro dos animais doentes, anticorpos contra o parasito. Porém, a reatividade com outros parasitos tem limitado o seu valor diagnóstico. Uma das ferramentas mais empregadas e aplicáveis em grande escala é a prova de ELISA, cuja sensibilidade e especificidade dependem da fonte do antígeno utilizado (QUEIROZ, 2005).

O diagnóstico sorológico também ganha importância por auxiliar em estudos epidemiológicos e também por ser capaz de detectar estádios iniciais das infecções, sendo sensíveis e detectando a infecção com apenas duas semanas de idade do parasito (ECHEVARRIA, 2004). No entanto, pelo teste de pesquisa de anticorpos, a ocorrência de falsa positividade pode estar presente quando da reação positiva de soros de indivíduos já curados (FREDES, 2004).

CAPÍTULO 1

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E PROPOSTA DE CATEGORIZAÇÃO DA
LESÃO HEPÁTICA EM BOVINOS COM FASCIULOSE CRÔNICA**

3 CAPÍTULO 1 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E PROPOSTA DE CATEGORIZAÇÃO DA LESÃO HEPÁTICA EM BOVINOS COM FASCIULOSE CRÔNICA

3.1 RESUMO: Avaliação histopatológica e proposta de categorização da lesão hepática em bovinos com fasciolose crônica. Objetivou-se com esta proposta realizar uma avaliação histopatológica de fígados bovinos com fasciolose crônica, considerando o grau de resposta e sua influência no desenvolvimento da lesão. Além disso, propôs-se uma classificação da lesão crônica no parênquima hepático baseada nas lesões inflamatórias e fibróticas. Utilizaram-se 100 fígados condenados por fasciolose no matadouro frigorífico de Atilio Vivácqua, ES. Coletou-se um fragmento de cada lobo hepático (direito e esquerdo) de cada fígado, que sofreu processamento histotécnico e coloração com hematoxilina-eosina. A categorização das lesões foi feita atribuindo-se gradação progressiva de I a III, de acordo com a intensidade das lesões inflamatórias e fibróticas. Em 89 amostras observou-se proliferação de canálculos biliares. Observou-se presença de infiltrado mononuclear linfoplasmocitário em 95 amostras avaliadas. Eosinófilos foram encontrados em 85 amostras. Áreas de necrose estiveram presentes em apenas quatro amostras, formações acinares em 18 amostras e degeneração hepática microgoticular em oito amostras. Arteriosclerose foi encontrada em 96% das amostras avaliadas. A fibrose periportal esteve presente em todas as amostras avaliadas, tanto no lobo direito quanto esquerdo. A fibrose periductal foi discreta em 10% das amostras, moderada em 29% e severa em 14%. A distribuição da fibrose foi difusa e discreta em 46% amostras, moderada em 37% e severa em 9%. Os resultados revelaram uma frequência de 45% das amostras para a categoria II, seguido da categoria I (39%) e 16% das amostras avaliadas foram classificadas como categoria III. As lesões fibróticas se mostraram mais intensas em relação às inflamatórias. A proposta de categorização histopatológica das lesões hepáticas por fasciolose crônica em bovinos mostrou-se um método valioso de avaliação microscópica, uma vez que permite estabelecer o quadro evolutivo dessa enfermidade.

PALAVRAS CHAVE: histopatologia, classificação, fasciolose, ruminantes

3.2 ABSTRACT: Histopathologic evaluation and proposal for categorization of liver damage in cattle with chronic fascioliasis. The objective of this proposal was perform a histopathological evaluation of liver cattle with chronic fascioliasis, considering the degree of response and its influence on the development of the lesion. It also proposed a classification of chronic lesions in the liver based on the inflammatory and fibrotic. A total of 100 livers condemned for fasciolosis in slaughterhouse from Atilio Vivacqua, ES. Were collected a fragment of each liver lobe (right and left) of each liver, which has histotechnic processing and staining with hematoxylin-eosin. The categorization of lesions was made by assigning progressive grading from I to III, according to the intensity of the inflammatory and fibrotic. In 89 samples showed proliferation of bile canaliculi. Observed the presence of mononuclear lymphocytic infiltrate in 95 samples. Eosinophils were found in 85 samples. Areas of necrosis were present in only four samples, acinar formations in 18 samples and liver degeneration microgoticular in eight samples. Atherosclerosis was found in 96% of the samples. Periportal fibrosis was present in all samples, both right and left lobe. Periductal fibrosis was mild in 10% of the samples, moderate in 29% and severe in 14%. The distribution of fibrosis was diffuse and mild in 46% samples, moderate in 37% and severe in 9%. The results revealed a frequency of 45% of the samples for class II, followed by category I (39%) and 16% of the isolates were classified as category III. The fibrotic lesions were more intense in relation to inflammatory diseases. The proposed categorization of pathological liver injury in chronic fascioliasis in cattle proved to be a valuable method of microscopic evaluation, since it allows for establishing the evolution of this disease.

KEYWORDS: Histopathology, classification, fasciolosis, ruminants

3.3 INTRODUÇÃO

A fasciolose é causada pelo *Fasciola hepatica*, um trematodeo digenético da família dos fasciolídeos pertencente ao filo Platyhelminthes e parasito dos canais biliares de diferentes hospedeiros (URQUHART et al., 1998).

Durante a fase aguda da fasciolose em ovinos o fígado pode apresentar-se dilatado e com cápsula espessada, coberto por um exudato fibrinoso e lobo ventral hemorrágico. Já na fase crônica, caracteriza-se macroscopicamente como um fígado pálido, com o lobo ventral reduzido de tamanho. Parasitos adultos estão presentes nos grandes ductos biliares causando colangite e colangiohepatite (RIET-CORREA et al., 2001; CARLTON e McGAVIN, 1998).

Microscopicamente, na fase aguda, túneis são formados pela migração da forma jovem do parasito com degeneração de hepatócitos, sendo a luz preenchida por sangue e detritos, além de pigmentos sanguíneos e eosinófilos (BORDIN, 1995). Em cortes histológicos, Keegan e Trudgett (1992) relataram a presença de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e monócitos circundando o parasito durante a migração pelo parênquima hepático. Na fase crônica, Riet-Correa et al. (2001) observaram colangite ulcerativa com exuberância fibrosa na parede dos ductos. Há também infiltrado inflamatório polimorfonuclear e mononuclear. Em bovinos o processo patológico é semelhante ao de ovinos, no entanto, o espessamento com calcificação dos ductos biliares com dilatação da vesícula biliar são as lesões mais características (RIET-CORREA et al., 2001).

Sendo as lesões hepáticas causadas pelo parasito, na infecção crônica muito severa, torna-se importante avaliar o grau de lesão, pois assim, é possível estabelecer um parâmetro de acometimento e, a partir disso, estabelecer novas formas de diagnóstico ou mesmo apurar, em associação às técnicas convencionadas de diagnóstico, a infecção pelo parasito, de forma precoce e eficiente.

Objetivou-se com esta proposta realizar uma avaliação histopatológica de fígados bovinos com fasciolose crônica, considerando o grau de resposta e sua influência no desenvolvimento da lesão. Além disso, propôs-se uma classificação da lesão crônica no parênquima hepático baseada nas lesões inflamatórias e fibróticas.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Seleção e coleta da amostra

As amostras para a realização do experimento foram oriundas de fígados de bovinos, de várias idades, de ambos os sexos e de regime alimentar variado, com peso vivo aproximado de 450 Kg, sendo todos os animais provenientes do Sul do Estado do Espírito Santo e condenados no matadouro frigorífico de Atilio Vivácqua, Espírito Santo, macroscopicamente positivos para fasciolose.

Sob autorização e fiscalização do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF-ES) foram acompanhados quatro abates de animais entre março a julho de 2008, com observação macroscópica dos fígados para a presença de exemplares de *Fasciola* sp. Coletou-se um fragmento de cada lobo (direito e esquerdo) de 100 amostras, totalizando 200 fragmentos. Estes fragmentos eram de aproximadamente 6 cm² e coletados da superfície visceral, sendo utilizada a forma retangular para o lobo direito e a forma triangular para o lobo esquerdo. O material para exame foi acondicionado em frascos contendo formalina 10% e direcionado ao Laboratório de Histopatologia do Setor de Patologia Animal do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (HOVET/CCA-UFES) para processamento e avaliação histopatológica.

3.4.2 Processamento das amostras

Amostras previamente fixadas foram submetidas ao processamento histológico que consistiu na desidratação (álcool absoluto), diafanização (xilol absoluto) e inclusão em parafina histológica derretida a 60°C. Em seguida, as amostras foram submetidas à microtomia para a secção de cortes histológicos de cinco micrômetros de espessura que foram depositados em lâminas histológicas e coradas pelo método Hematoxilina-Eosina (LUNA, 1968).

3.4.3 Avaliação histopatológica

As lâminas contendo os cortes corados pelo método Hematoxilina-Eosina (HE) foram submetidas a uma avaliação microscópica geral das alterações morfológicas.

Foram avaliadas as seguintes alterações morfológicas quanto à presença ou ausência e intensidade (leve = +, moderada = ++ ou severa = +++): fibrose do espaço porta, hiperplasia dos ductos biliares (dados em quantidade de ductos proliferados em espaço porta), fibrose de parede de ducto biliar, infiltração inflamatória, infiltração por eosinófilos, estenose de vasos, áreas de necrose, fibrose difusa e lesão de ductos biliares calibrosos (formação acinar, necrose do epitélio e infiltração por células inflamatórias).

Um sistema de classificação foi proposto para padronizar a descrição das lesões. Foi feita uma tentativa para relacionar as alterações patológicas à cronicidade da infecção. Dividiram-se as lesões hepáticas em três categorias, variando de grau I a III, com base em graus crescentes de amplitude e gravidade das alterações fibróticas e inflamatórias. No grau I predominam lesões discretas, no grau II lesões moderadas e no grau III lesões severas. As amostras que se enquadravam em mais de uma categoria, as lesões fibróticas foram consideradas as alterações mais importantes para a definição da classificação. As características de cada categoria estão dispostas abaixo (Tabela 1).

TABELA 1 – Critérios morfológicos de evolução das lesões para a categorização histopatológica de fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*.

CATEGORIA DE LESÃO CRÔNICA	ACHADOS MORFOLÓGICOS
Categoria I	Fibrose periportal (ausente ou até 5 camadas); Fibrose difusa ausente a discreta Hiperplasia de ductos biliares em espaço porta (ausente ou 2-3 ductos); Infiltrado inflamatório mononuclear ausente ou focal discreto (associado ou não à presença de eosinófilo); Arteriosclerose ausente ou presente
Categoria II	Fibrose periportal (até 6 camadas) Fibrose periductal (Quando presente na amostra) (até 6 camadas); Fibrose difusa discreta a moderada Infiltrado inflamatório mononuclear difuso discreto a moderado associado à presença de eosinófilo; Hiperplasia de ductos biliares em espaço porta (até 4 ductos); Arteriosclerose presente
Categoria III	Fibrose periportal (> 6 camadas) Fibrose periductal (Quando presente na amostra) (> 6 camadas); Fibrose difusa moderada a severa Infiltrado inflamatório mononuclear difuso severo; Hiperplasia de ductos biliares em espaço porta (>4 ductos); Formação acinar em ducto principal (quando presente na amostra); Atrofia e/ou degeneração hepática (presente ou não) Arteriosclerose presente

3.4.4 Análise estatística

A análise estatística incluiu uma análise descritiva das frequências dos achados histopatológicos encontrados. Utilizou-se a Correlação de Spearman (BioEstat 5.0) e nível de 5% de significância. Os dados foram dispostos em tabela e conferidos valores aos escores encontrados, sendo 0 para ausência; 1 para discreto; 2 para moderado e 3 para severo. No caso da proliferação de ductos biliares os escores foram: 0 para ausente; 1 para proliferação de 2 a 3 ductos e 3 para a proliferação de mais de quatro ductos. Para a avaliação das variáveis encontradas no exame histopatológico entre e dentro de cada categoria de lesão crônica proposta utilizou-se as médias dos escores obtidos e aplicação do Teste Não-Paramétrico de Kruskal Wallis ($\alpha=5\%$) seguido pelo Teste de Dunn ($\alpha=5\%$).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as amostras selecionadas foi observada a presença do parasito adulto nos ductos biliares, espessamento das paredes dos ductos com proliferação e calcificação, caracterizando segundo Riet-Correa et al. (2001); Carlton e McGavin (1998) uma infecção crônica. Para Boray (1969), fatores como carga parasitária, fase de desenvolvimento do parasito, tipo e idade do hospedeiro, localização e condição das pastagens e época do ano influenciam na variabilidade da patogenia e sintomatologia provocadas pela infecção por *Fasciola hepatica*. No entanto, como as amostras eram provenientes de matadouro frigorífico de fluxo intenso, e oriundas de animais de diferentes idades, ambos os sexos, peso variado e de diferentes municípios da região Sul do Espírito Santo não foi possível a determinação dessas condições.

Segundo Fraga (2008), a fasciolose tem apresentado uma evolução crescente no Sul do Espírito Santo, com prevalência anual em 2007 de 20%. Essa crescente nos casos de fasciolose está relacionada à epidemiologia da enfermidade, que para Echevarria (2004) está no hábito alimentar dos bovinos que preferem pastejar em áreas de banhados, mananciais e pequenos córregos, onde se localizam os hospedeiros intermediários. Na região Sul do Espírito Santo a presença de áreas

alagadiças semelhantes às descritas por Echevarria (2004) são freqüentes tendo em vista a localização destas próximas à bacia do rio Itapemirim.

3.5.1 Avaliação histopatológica

Em relação à proliferação de ductos biliares, das 100 amostras avaliadas neste estudo, em 89 (89%) observou-se proliferação de canalículos biliares, sendo que deste total, 48 amostras (53,93%) apresentaram proliferação de dois a três canalículos e em 41 (46,07%) foram observados mais que quatro canalículos proliferados (Figura 1).

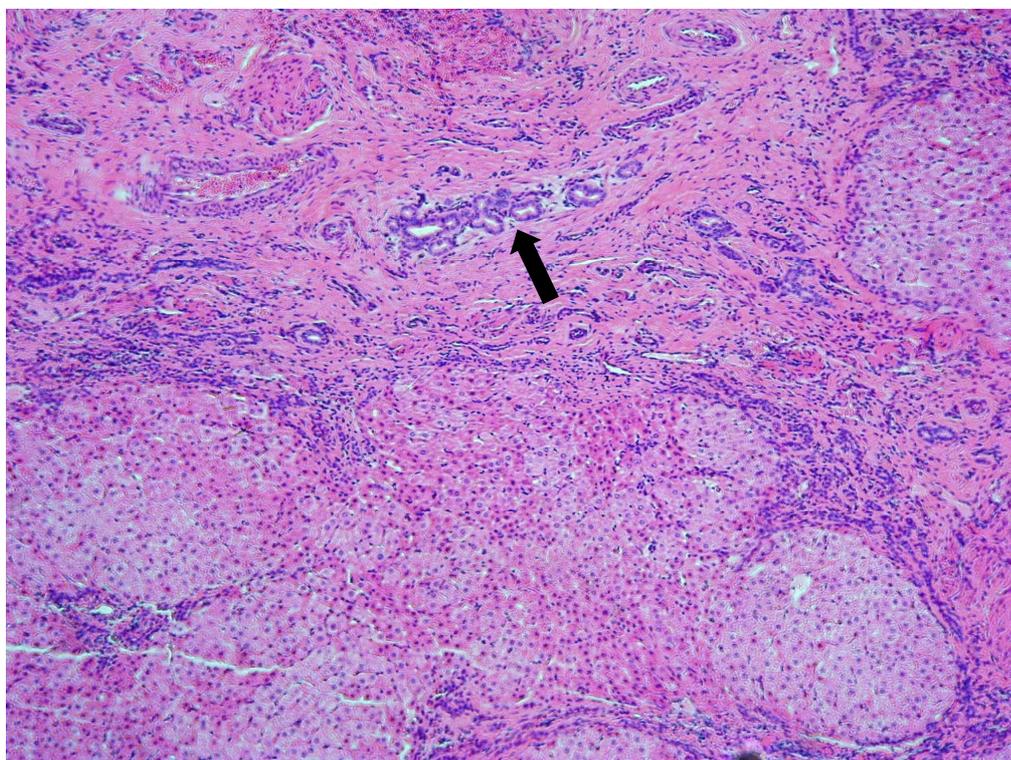


FIGURA 1 – Fotomicrografia de fígado de bovino cronicamente infectado por *Fasciola hepatica* revelando hiperplasia de ductos biliares (seta) em espaço porta, objetiva de 20x, coloração de Hematoxilina e Eosina.

Segundo Sadjjadi et al. (1997), na fasciolose crônica a alteração predominante nos espaços porta é a hiperplasia de ductos biliares. Molina (2005) estudando a relação hospedeiro-parasito em bovinos e búfalos encontrou hiperplasia de ductos biliares a partir da 12^a semana até a 16^a semana pós-infecção com metacercárias de *Fasciola gigantica*. Ross et al. (1966) relatam que em bovinos a

hiperplasia de ductos biliares é mais evidente a partir da oitava semana pós-infecção.

Bostelmann et al. (2000) avaliaram amostras de fígados de bovinos provenientes de abatedouro no Paraná e condenados por fasciolose, encontrando hiperplasia de ductos biliares numa intensidade moderada em todas as amostras avaliadas. Marcos et al. (2007) analisaram amostras de fígados de bovinos condenados por fasciolose ao abate, encontrando proliferação de ductos biliares em todas as amostras avaliadas, sendo a intensidade considerada em 37% discreta, 47% moderada e 13% severa.

Neste estudo, encontrou-se proliferação de ductos biliares, o que respalda, segundo bibliografia consultada, a cronicidade da infecção nas amostras utilizadas. No entanto, apesar de outros estudos evidenciarem a intensidade desta lesão em fígados de bovinos infectados, até o presente momento nenhuma avaliação levando em consideração a quantidade de canalículos biliares foi conduzida. Desta forma, a determinação da quantidade de ductos proliferados auxilia na determinação do tempo de infecção pelo parasito e também torna-se importante nas avaliações histopatológicas.

Quanto ao infiltrado inflamatório, observou-se a presença de infiltrado mononuclear linfoplasmocitário em 95 amostras avaliadas (95%), sendo esta presença graduada quanto a intensidade em discreta, moderada e severa. Das amostras que apresentaram inflamação, a predominância foi de infiltração discreta, correspondendo a 50,53% (48 amostras), seguido de infiltração moderada com 32,63% (31 amostras) e 16,84% de infiltração severa (16 amostras). Nas outras cinco amostras avaliadas (5%) não foi encontrado infiltrado inflamatório. Os focos de infiltração inflamatória foram observados, principalmente, nos espaços porta e perivascular (em veias centrolobulares), no entanto, em algumas amostras, principalmente as consideradas severas, a distribuição da inflamação estendia-se por grande parte do parênquima hepático (Figura 2).

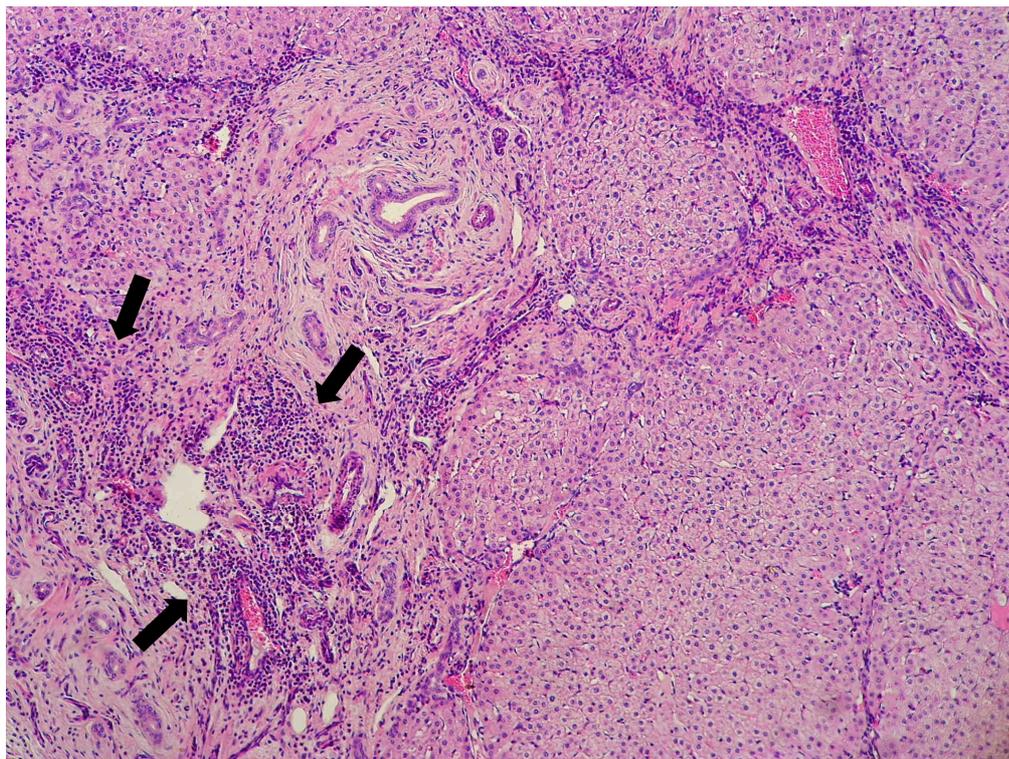


FIGURA 2 – Fotomicrografia de fígado de bovino cronicamente infectado por *Fasciola hepatica* revelando infiltrado inflamatório mononuclear linfoplasmocitário distribuído difusamente pelo espaço porta (seta), objetiva de 20x, coloração de Hematoxilina e Eosina.

Bostelmann et al. (2000) avaliaram a infiltração inflamatória em fígados de bovinos infectados por *Fasciola hepatica*, encontrando infiltração por linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos distribuídos no terço médio da parede dos ductos mais calibrosos, além de infiltração linfoplasmocitária e neutrofílica escassa no terço externo da parede dos ductos. A infiltração linfoplasmocitária nesse caso apresentou-se moderada.

Em nosso estudo, a predominância de infiltração se caracterizou como discreta seguida de moderada. Já nos estudos conduzidos por Marcos et al. (2007) a frequência maior encontrada foi de infiltração moderada. Em geral, as avaliações microscópicas são realizadas de forma subjetiva, sendo as intensidades de acometimento atribuídas pelos observadores, o que pode explicar a diferença entre a bibliografia consultada e nossos resultados, porém, percebe-se que em bovinos apresentando fasciolose crônica, a infiltração inflamatória mostra-se variável e dependente da resposta do hospedeiro.

De acordo com Ross et al. (1966) a predominância no espaço porta de tipos celulares como linfócitos e plasmócitos, com menor quantidade de neutrófilos e

eosinófilos caracterizam um período pós-infecção entre sete e onze semanas. Em seu estudo, Molina (2005) encontrou presença de infiltrado linfocítico periportal na sétima semana pós-infecção, com *Fasciola gigantica*, caracterizado como infiltração discreta. No entanto, a partir da 12^a semana até a 16^a semana, a infiltração inflamatória foi descrita como severa e caracterizada pela presença de linfócitos, macrófagos e células plasmáticas.

Independente da intensidade de inflamação observada no parênquima hepático de bovinos infectados há uma variedade de tipos celulares envolvidos na resposta pelo hospedeiro e, à medida que a infecção se torna crônica, a heterogenicidade celular diminui, predominando células mononucleadas, principalmente linfócitos e células produtoras de anticorpos. Além disso, a presença, intensidade e tipificação das células inflamatórias contribuem para o processo de categorização, dando importância ao fato da mesma indicar até mesmo o período de infecção pelo parasito.

A presença e intensidade dos eosinófilos também foram avaliadas encontrando ausência de infiltração em 15 amostras (15%). No entanto, nas 85 amostras onde foi encontrada a presença de eosinófilos observou-se 61,18% (52 amostras) de infiltração discreta, 21,18% (18 amostras) moderada e 17,64% (15 amostras) severa. Bostelmann et al. (2000) também encontraram infiltração discreta de eosinófilos em fígados de bovinos com fasciolose. No entanto, nas amostras avaliadas por Marcos et al. (2007) a predominância foi de infiltração moderada de eosinófilos.

Dentre o papel dos eosinófilos, está a destruição de complexos antígeno-anticorpo, principalmente nas reações de hipersensibilidade. Porém, também desempenham função importante nas inflamações de fase tardia, bem como nas infecções parasitárias (MONTENEGRO e FRANCO, 2004). Por ser a fasciolose uma infecção parasitária é natural que seja encontrada infiltração por eosinófilos no parênquima hepático, mas, se observa que a cronicidade da enfermidade revela uma infiltração discreta, talvez pelo fato dos parasitos se encontrarem nos ductos biliares e não mais no parênquima hepático conforme observado no início da infecção, onde a migração e a consequente liberação de produtos de excreção/secreção funcionam como agentes ativadores da resposta imune do hospedeiro.

Áreas de necrose estiveram presentes em apenas quatro amostras, correspondendo a 4% do total de amostras avaliadas. Formações acinares em ductos biliares de médio calibre foram observadas em 18 lâminas (18%). Áreas de atrofia hepática não foram observadas, porém degeneração hepática microgoticular esteve presente em 8% das amostras avaliadas. A baixa frequência encontrada neste estudo para estas alterações pode estar relacionada ao local de retirada da amostra, bem como seu tamanho e quantidade (no caso, apenas uma amostra por lobo hepático).

Molina (2005) descreveu em seu estudo áreas de necrose focal com presença de eosinófilos, linfócitos e macrófagos, sendo discreta até a sétima semana, tornando-se severa a partir da 12^a semana. As amostras avaliadas por Bostelmann et al. (2000) revelaram áreas de necrose e formações acinares em ductos biliares em 100% dos fígados analisados.

A arteriosclerose foi encontrada em 96% das amostras avaliadas, sendo discreta em 42% dos fígados avaliados, moderada em 44% e severa em 10% das amostras (Figura 3).

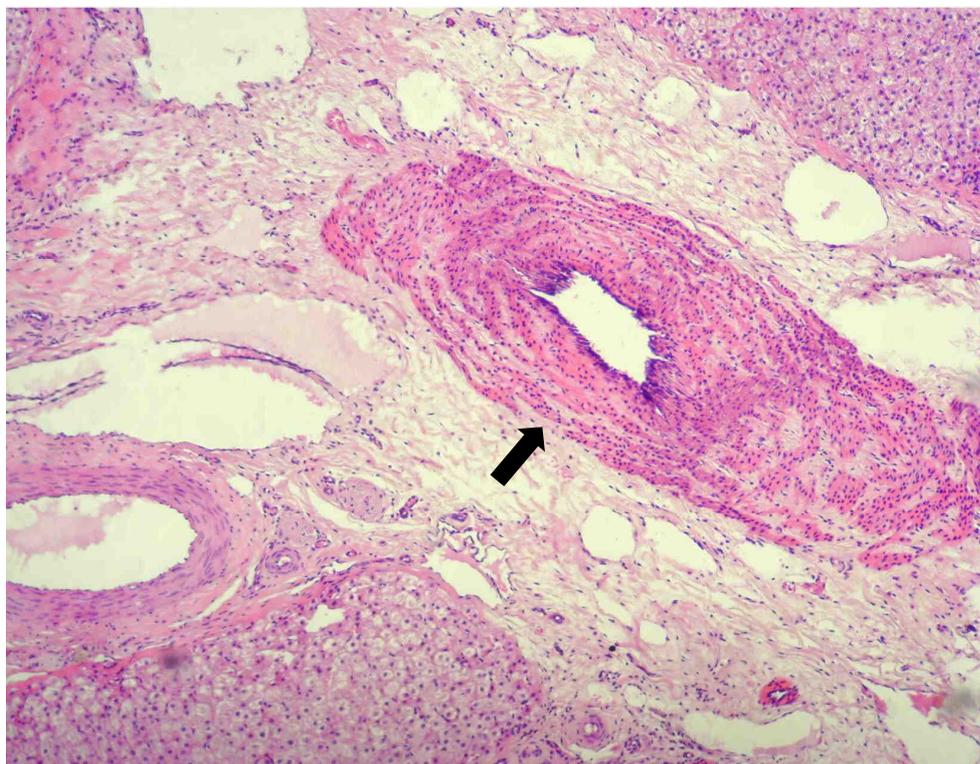


FIGURA 3 – Fotomicrografia de fígado de bovino cronicamente infectado por *Fasciola hepatica* revelando arteriosclerose (seta), objetiva de 20x, coloração de Hematoxilina e Eosina.

Os resultados apresentados neste estudo discordam daqueles encontrados por Bostelmann et al. (2000) quando avaliaram amostras de fígados bovinos condenados ao abate por fasciolose e não encontraram alterações vasculares. Estudos prévios conduzidos por Trivilin et al. (2008) utilizando fígado de bovinos cronicamente infectados e condenados ao abate revelaram lesões vasculares discretas e severas no lobo esquerdo e ausência de lesão no lobo direito. Em seu estudo piloto também utilizando fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*, Trivilin et al. (2009) encontraram arteriosclerose discreta em 19 amostras (37,9%), moderada em 24 (47,4%) e severa em sete (14,7%), resultados semelhantes ao deste estudo.

A fibrose periportal esteve presente em todas as amostras avaliadas, tanto no lobo direito quanto esquerdo, sendo encontrada fibrose discreta em 23% das amostras avaliadas, moderada em 61% e severa em 16%. A fibrose periductal foi avaliada quando a amostra continha ducto biliar de médio ou grosso calibre. Encontrou-se ausência dos ductos calibrosos em 47% das amostras avaliadas. Quando presentes, os ductos de médio e grosso calibre, fibrose discreta foi observada em 10% das amostras, enquanto a fibrose moderada esteve presente em 29% e severa em 14% dos fígados avaliados. A distribuição da fibrose pelo parênquima hepático foi avaliada, encontrando-se ausência em 8% das amostras coletadas. Quando presente, a fibrose foi difusa, sendo discreta em 46% dos fígados analisados, moderada em 37% e severa em 9%.

A intensidade da fibrose periportal e periductal predominante neste estudo foi moderada seguido de severa, discordando dos resultados encontrados por Bostelmann et al. (2000) que encontraram fibrose periportal severa em 50% das amostras avaliadas, seguido de 25% moderada e 25% leve. Já a fibrose periductal mostrou-se discreta em 75% das amostras avaliadas e moderada em 25%, com fibrose difusa presente em todas as amostras.

Nos estudos de Marcos et al. (2007) a fibrose periductal encontrada em fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* foi 13% discreta, 27% moderada e 33% severa. Em seu estudo com fígado de bovino condenados ao abate, Trivilin et al. (2008) observaram fibrose periductal e periportal discreta no lobo direito e fibrose discreta a moderada no lobo esquerdo. Segundo Echevarria (2004), ocorre deposição de colágeno em torno dos túneis migratórios das formas jovens de

Fasciola por volta da 6ª semana pós-infecção e formando cicatrizes tissulares que se aderem ao sistema portal, cápsula e veias hepáticas.

Conforme citado anteriormente, o fator observador é um grande contribuinte na discordância entre resultados quando da avaliação microscópica. Isso porque, a cada avaliação, estabelecem-se parâmetros que melhor definam a imagem analisada. Dessa forma, divergências entre resultados podem acontecer e de forma natural, porém, baseado em conhecimentos científicos.

Neste estudo, as lesões consideradas moderadas e severas foram observadas com maior frequência no lobo hepático esquerdo. O fato deste lobo ser mais acometido com as lesões crônicas pode sugerir que este lobo seja a possível porta de entrada dos parasitos e por estar anatomicamente mais próximo do intestino delgado. Associado a isso, a maior porção de ductos biliares estão dispostos nessa região do fígado.

Após a observação e avaliação histopatológica das amostras oriundas de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* encontrou-se os seguintes resultados para a categorização da lesão crônica (Tabela 2)

TABELA 2 – Distribuição das 100 amostras de fígado bovino cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* em categorias de lesão crônica após classificação histopatológica

	FREQUENCIA (%)
CATEGORIA I	39
CATEGORIA II	45
CATEGORIA III	16
TOTAL	100

Os resultados revelaram uma frequência de 45% para a categoria II, seguido da categoria I (39%) e por último 16% das amostras avaliadas eram compatíveis com a categoria III. Até o presente momento nenhuma proposta de classificação da lesão crônica correlacionando alterações inflamatórias e fibróticas foi publicada. No

entanto, Marcos et al. (2007) propuseram em seu estudo apenas a classificação das lesões fibróticas em grau I, II e III.

Importante ressaltar que a variação na categorização está condicionada ao grau de acometimento do fígado pela fasciolose e também que os animais estão sujeitos a reinfecções o que pode mudar o quadro de lesões encontradas.

Após a categorização da lesão crônica por meio da avaliação histopatológica, um estudo envolvendo as principais alterações encontradas foi conduzido para avaliar seu comportamento em cada categoria estabelecida e também entre as categorias. Os resultados estão dispostos na Tabela 3.

TABELA 3 – Médias dos escores atribuídos à intensidade das principais alterações encontradas no exame histopatológico dentro de cada categoria estabelecida para a lesão crônica causada pela infecção por *Fasciola hepatica*.

	CATEGORIA I	CATEGORIA II	CATEGORIA III
Proliferação de Ductos Biliares	0,744aA	1,556bA	2bA*
Infiltrado Inflamatório Mononuclear	0,872aB	1,689bB	3cB
Infiltrado Eosinofílico	0,795aC	1,489bC	2,125bA

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si estatisticamente. Teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade, seguido pelo teste de média de Dunn.

Avaliar cada variável entre as categorias propostas permite estudar o comportamento de cada uma à medida que a infecção se torna agravada, ou seja, espera-se que em lesões crônicas e nos seus diferentes estadiamentos haja maior comprometimento dessas variáveis facilitando a diferenciação da categoria e seu papel influenciador na aplicação da classificação. Observou-se, por exemplo, que em relação à proliferação de ductos biliares, não houve diferença significativa entre as categorias II e III. Com isso, essa variável teve um comportamento praticamente estável com o agravamento da lesão. O mesmo se aplicou à variável infiltrado eosinofílico. Já a variável infiltrado inflamatório demonstrou ser mais severa na Categoria III, no entanto, estatisticamente, mostrou-se não significativo entre as categorias propostas.

No entanto, como citado anteriormente, somente as principais lesões encontradas na avaliação histopatológica foram utilizadas para realizar o estudo da influência destas variáveis na categorização da lesão crônica. Porém, a verificação do papel destas lesões dentro da categoria a qual pertence auxilia o estabelecimento da sua importância, e assim estabelecer a influência exercida de cada uma lesão sobre a outra na sua categoria correspondente.

Então, quando avaliadas as três variáveis dentro de cada categoria, se observa a influência entre as variáveis nas categorias I e II, sendo o infiltrado inflamatório a variável que se destaca dentro das categorias por apresentar maior média de escore, ao passo que na categoria III somente a proliferação de ductos biliares e infiltrado eosinofílico pertencentes não foram significativos à análise estatística. Isso permite dizer que, nesta categoria, com o agravamento da lesão a quantidade de ductos proliferados não está na dependência do infiltrado eosinofílico, mas sim da inflamação por células mononucleadas presentes.

Diante disso, um teste de correlação foi estabelecido entre a proliferação de ductos biliares e o infiltrado inflamatório, encontrando assim, uma associação moderada entre essas variáveis ($r_s=0,5508$; $p<0,0001$). Com isso, à medida que se aumenta a intensidade da inflamação ocorre de forma moderada a proliferação de ductos biliares.

3.6 CONCLUSÕES

Em fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*, as lesões que mais prevaleceram foram proliferação de ductos biliares, infiltrado inflamatório mononuclear, arteriosclerose e fibrose periportal e periductal. As lesões fibróticas se mostraram muito mais intensas que as inflamatórias.

A presença de arteriosclerose é um achado importante no caso da fasciolose em bovinos, uma vez que pode evoluir para lesões isquêmicas e posterior necrose tecidual.

A proposta de categorização histopatológica das lesões hepáticas por fasciolose crônica em bovinos mostrou-se um método valioso de avaliação microscópica, uma vez que permite estabelecer o quadro evolutivo dessa enfermidade.

Neste contexto, novos estudos devem ser conduzidos levando em consideração o controle da infecção em semanas para aplicação da categorização histopatológica.

3.7 REFERENCIAS

BORAY, J.C. Experimental fascioliasis in Australia. **Advances in Parasitology**, 1969.

BORDIN, E. L. Revisão da anatomia patológica da fasciolose bovina. **A Hora Veterinária**. Edição extra, n. 1, 1995.

BOSTELMANN, S. C. W. et al. Histopatologia comparativa em fígados de bovinos, bubalinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*. **Archives of Veterinary Science**, v. 5, p. 95-100, 2000.

CARLTON, W.W. e McGAVIN, M.D. **Patologia veterinária especial de Thomson**, Porto Alegre: Artmed, 2 ed. 1998.

ECHEVARRIA, F. Fasciolose. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 13., Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, 1. 2004, Ouro Preto. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, 2004.

FRAGA, J. C. L. Incidência de fasciolose hepática bovina no sul do Espírito Santo. Monografia (Pós-graduação em Defesa e Vigilância Sanitária Animal). Universidade Castelo Branco. Instituto Brasileiro de Pós-graduação Qualittas, 29p., 2008.

KEEGAN, P. S. e TRUDGETT, A. *Fasciola hepatica* in rat: immune responses associated with the development of resistance to infection. **Parasite Immunology**. v. 14, p. 657-669, 1992.

LUNA, L. G. **Manual of Histological Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology**. Washington: MacGraw Hill, 1968, 258p.

MARCOS, L. A. et al. Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle. **Journal of Helminthology**, v. 81, p. 381–386, 2007.

MOLINA, E. C. Comparison of host-parasite relationships of *Fasciola gigantica* infection in cattle (*Bos indicus*) and swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Thesis (Doctor of Philosophy) – School of Tropical Veterinary and Biomedical Sciences, James Cook University, 2005.*

MONTENEGRO, M. R. e FRANCO, M. **Patologia Processos Gerais**, 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**, v. 2. São Paulo: Varela. 2001.

ROSS, J. C.; TODD, J. R.; DOW, C. Single experimental infections of calves with the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). **Journal of Comparative Pathology**. n. 76, p. 67-81, 1966.

SADJJADI, S.M.; TAKI, T.M.; ORYAN, A. Quantitative histopathology of liver and portal lymphnode in chronic bovine fascioliasis. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.67, n.4, p.270- 274, 1997.

TRIVILIN, L. O. et al. Avaliação microscópica comparativa de fígados de bovinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*: estudos preliminares. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 15.; Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul, 2., 2008, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CBPV, 2008. 1 CD. Resumos_Apresentação ORAL.doc.

TRIVILIN, L. O. et al. Avaliação histopatológica de fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*: estudos preliminares. In: Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 14, 2009, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: ABPV, 2009. 1 CD. Resumo217.doc.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA FIBROSE EM FÍGADOS DE BOVINOS CRONICAMENTE
INFECTADOS POR *Fasciola hepatica*

4 CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA FIBROSE EM FÍGADOS DE BOVINOS CRONICAMENTE INFECTADOS POR *Fasciola hepatica*

4.1 RESUMO: Avaliação da fibrose em fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*. Objetivou-se com este estudo avaliar a fibrose presente em fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*, bem como sua distribuição no parênquima hepático. Além disso, evidenciar comparativamente as lesões fibróticas no lobo direito e esquerdo. Avaliaram-se 100 amostras de cada lobo hepático (direito e esquerdo), coradas pelo método de HE. Após avaliação histopatológica e categorização, os cortes foram submetidos à coloração de Tricrômico de Masson. No lobo direito a fibrose periportal mostrou-se evidente nas amostras categoria III em relação às outras categorias. A significância de fibrose periductal independe da categoria. A fibrose difusa pelo lobo direito mostrou-se bastante importante nas amostras categoria III. No lobo direito, dentro de todas as categorias, a fibrose periportal foi a variável mais importante em relação à fibrose periductal e fibrose difusa. No lobo esquerdo a fibrose periportal no lobo esquerdo mostrou-se importante na categoria III em relação às demais categorias. A fibrose periductal foi diferente em todas as categorias e mais grave na categoria III. A fibrose difusa foi mais severa na categoria III. A fibrose periportal mostrou-se importante no lobo esquerdo na categoria I. A comparação entre as lesões fibróticas do lobo direito com o lobo esquerdo mostrou diferença entre a fibrose periductal e a fibrose difusa. A fibrose difusa foi mais grave no lobo esquerdo. No lobo direito, a arteriosclerose foi importante na categoria III. A comparação entre a arteriosclerose do lobo direito com a do lobo esquerdo mostrou diferença. As lesões fibróticas foram mais importantes no espaço porta de bovinos cronicamente infectados. Quanto maior o grau de lesão crônica, maior será a distribuição da fibrose pelo parênquima hepático. O lobo esquerdo foi mais acometido pelas lesões fibróticas e vasculares que o lobo direito na região periductal e em relação à fibrose difusa. Lesão fibrótica vascular é mais marcante nas artérias que nas veias e sinusóides, principalmente nas amostras pertencentes à categoria III.

PALAVRAS-CHAVE: fibrose hepática, fasciolose, ruminante

4.2 ABSTRACT: Evaluation of liver fibrosis in cattle chronically infected with *Fasciola hepatica*. The objective of this study to evaluate liver fibrosis present in cattle chronically infected with *Fasciola hepatica*, as well as their distribution in the liver. Moreover, evidence compared fibrotic lesions in the right lobe and left. We evaluated 100 samples from each lobe (right and left), stained with HE. After histopathological evaluation and categorization, the sections were stained in Masson's Trichrome. In the right lobe, fibrosis was evident in samples category III compared to other categories. The significance of periductal fibrosis is independent of the category. The diffuse fibrosis by the right lobe proved to be very important in the samples category III. In the right lobe, within all categories, the fibrosis was the most important variable in relation to periductal fibrosis and diffuse fibrosis. In the left lobe, fibrosis in the left lobe was an important factor in category III compared to the other categories. Periductal fibrosis was different in all categories and more severe in group III. The diffuse fibrosis was more severe in group III. The fibrosis was considered important in the left lobe in Class I. The comparison between the fibrotic lesions of the right lobe of the left lobe showed difference between the periductal fibrosis and diffuse fibrosis. The diffuse fibrosis was more severe in the left lobe. In the right lobe, arteriosclerosis was important in category III. The comparison between atherosclerosis of the right lobe of the left lobe showed difference. The fibrotic lesions were more important in the space port of cattle chronically infected. The greater the degree of chronic injury, the greater the distribution of fibrosis by liver parenchyma. The left lobe was most affected by the fibrotic lesions and vascular right lobe in the periductal region and in relation to diffuse fibrosis. Fibrotic vascular injury is more pronounced in arteries than in veins and sinusoids, especially in samples belonging to category III.

KEYWORDS: Liver fibrosis, fasciolosis, ruminant

4.3 INTRODUÇÃO

A fasciolose é uma enfermidade de caráter zoonótico causada por um trematoda digenético que acomete diferentes espécies animais, principalmente os ruminantes (WHO, 1995).

De acordo com Haroun e Hitlyer (1986) a enfermidade pode se agravar tornando-se crônica com fibrose e trauma severo ao fígado, além de fibrose dos ductos biliares pela presença das formas adultas de *Fasciola* spp. Para Leitão (1980), a forma mais vulgar é a cirrose biliar progressiva com distensão e espessamento dos ductos biliares, fibrose e calcificação.

Para Jones et al. (2000), os casos de fibrose hepática em ruminantes estão relacionados principalmente às intoxicações por plantas que contém alcalóides pirrolizidínicos. Porém, a infecção por *Fasciola hepatica* e a quantidade de parasitos presentes no fígado estão relacionados a casos de fibrose hepática em ruminantes, principalmente em bovinos, levando a graus diferentes de deposição do tecido conjuntivo em todo o parênquima hepático (MARCOS et. al., 2007).

Nos processos patológicos progressivos, como a fibrose hepática, há excesso de deposição de proteínas da matriz no espaço extracelular podendo resultar em cirrose. Esse processo está relacionado a regulação da síntese e degradação de matriz. Nestas lesões ocorre deposição de uma rede de matriz fibrilar, constituída principalmente por colágenos tipo I e III, relativamente resistentes à atividade das proteases (ARTHUR, 2000).

Pelo fato das lesões fibróticas serem evidentes e marcadamente graves em fígados de bovinos infectados por *Fasciola hepatica*, objetivou-se com este estudo avaliar a fibrose presente em fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*, bem como sua distribuição no parênquima hepático. Além disso, evidenciar comparativamente as lesões fibróticas no lobo direito e esquerdo.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo foram utilizadas amostras de fígados de bovinos, de várias idades, de ambos os sexos e de regime alimentar variado, com peso vivo aproximado de 450 Kg, sendo todos os animais provenientes do Sul do Estado do Espírito Santo e condenados no matadouro frigorífico de Atilio Vivácqua, Espírito Santo, macroscopicamente positivos para fasciolose. Foram acompanhados quatro abates de animais entre março a julho de 2008, com observação macroscópica dos fígados para a presença de exemplares de *Fasicola* sp. sob autorização e fiscalização do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF-ES). Coletou-se um fragmento de cada lobo (direito e esquerdo) de 100

amostras, totalizando 200 fragmentos. Estes fragmentos eram de aproximadamente 6 cm² e coletados da superfície visceral, sendo utilizada a forma retangular para o lobo direito e a forma triangular para o lobo esquerdo. O material para exame foi acondicionado em frascos contendo formalina 10% e direcionado ao Laboratório de Histopatologia do Setor de Patologia Animal do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (HOVET/CCA-UFES) para processamento e avaliação histopatológica.

As amostras fixadas foram submetidas ao processamento histológico que consistiu na desidratação (álcool absoluto), diafanização (xilol absoluto) e inclusão em parafina histológica derretida a 60°C. Em seguida, as amostras foram submetidas à microtomia para a secção de cortes histológicos de cinco micrômetros de espessura que foram depositados em lâminas histológicas e coradas pelo método Hematoxilina-Eosina (HE) (LUNA, 1968).

As lâminas coradas com HE foram avaliadas e submetidas à categorização conforme Tabela 1 abaixo.

TABELA 1 – Critérios morfológicos de evolução das lesões para a categorização histopatológica de fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*.

CATEGORIA DE LESÃO CRÔNICA	ACHADOS MORFOLÓGICOS
Categoria I	Fibrose periportal (ausente ou até 5 camadas); Fibrose difusa ausente a discreta Hiperplasia de ductos biliares em espaço porta (ausente ou 2-3 ductos); Infiltrado inflamatório mononuclear ausente ou focal discreto (associado ou não à eosinófilo); Arteriosclerose ausente ou presente
Categoria II	Fibrose periportal (até 6 camadas) Fibrose periductal (Quando presente na amostra) (até 6 camadas); Fibrose difusa discreta a moderada Infiltrado inflamatório mononuclear difuso discreto a moderado associado à eosinófilo; Hiperplasia de ductos biliares em espaço porta (até 4 ductos); Arteriosclerose presente
Categoria III	Fibrose periportal (> 6 camadas) Fibrose periductal (Quando presente na amostra) (> 6 camadas); Fibrose difusa moderada a severa Infiltrado inflamatório mononuclear difuso severo; Hiperplasia de ductos biliares em espaço porta (>4 ductos); Formação acinar em ducto principal (quando presente na amostra); Atrofia e/ou degeneração hepática (presente ou não) Arteriosclerose presente

FONTE: TRIVILIN (dados não publicados)

Após a categorização da lesão crônica por fasciolose, os cortes foram submetidos à coloração específica para tecido conjuntivo para a avaliação da fibrose periportal, periductal e fibrose difusa no parênquima hepático. Além disso, avaliou-se a arteriosclerose juntamente à deposição de tecido conjuntivo em veias e sinusóides. Utilizou-se para este propósito a coloração Tricrômico de Masson descrita por Luna (1968).

Os critérios avaliados foram: fibrose periportal e periductal, onde foram observadas as seguintes alterações em relação a quantidade de camadas de tecido conjuntivo presente: ausência de fibrose; 1-2 camadas de fibrose; 3-5 camadas e >6 camadas de fibrose. Para a fibrose difusa no parênquima hepático, arteriosclerose e fibrose ao redor de veias e sinusóides utilizou-se a intensidade (leve=+; moderada=++ e severa=+++).

Para a análise estatística atribuiu-se valores aos escores encontrados para a fibrose periportal e periductal, a saber: 0 ausência de fibrose; 1 para 1-2 camadas; 2 para 3-5 camadas e 3 para >6 camadas. Já a fibrose difusa, arteriosclerose e fibrose ao redor de veias e sinusóides foram atribuídos os seguintes valores: 0 para ausente; 1 para leve; 2 para moderada e 3 para severa.

Utilizou-se o Teste Não-Paramétrico de Kruskal Wallis ($\alpha=5\%$), seguido pelo Teste de Dunn para as médias quando significativo pela análise de variância (BioEstat 5.0) a nível de 5% de significância. Para a comparação das variáveis entre lobos hepáticos foi utilizado o teste de média Mann Whitney para amostras independentes.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das lâminas coradas pelo método HE revelou a fibrose como sendo uma importante lesão presente nos fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*, estando a fibrose periportal presente em 100% das amostras analisadas, ao passo que a fibrose difusa foi encontrada em 92% das amostras. Em relação à fibrose periductal, apenas as amostras que continham ductos de médio ou grosso calibre foram analisadas. Com isso, essa alteração foi encontrada em apenas 53% das amostras.

De acordo com Echevarria (2004), ocorre deposição de colágeno ao redor dos túneis migratórios causados pelas formas jovens do parasito em torno da sexta semana pós-infecção com formação de cicatrizes tissulares que se aderem ao sistema portal, cápsula e veias hepáticas. Em infecção por *Fasciola gigantica* nos bovinos, as lesões fibróticas em espaço porta foram observadas a partir da décima segunda semana pós-infecção com aspectos cirróticos. Na décima sexta semana, ductos biliares menores apresentavam-se fibrosados (MOLINA, 2005).

Segundo Bostelmann et al. (2000), em geral as lesões observadas no espaço porta dos fígados de bovinos foram mais acentuadas em relação ao fígado bubalino e ovino. Nesse contexto, no espaço porta do fígado de bovinos, a fibrose periportal variou de moderada a severa. Em nosso estudo, a proposta de avaliar a fibrose hepática não levou em consideração a intensidade da mesma, mas sim, o número de camadas de tecido conjuntivo depositadas, as quais serviram como auxiliar no processo de categorização da lesão crônica. A Figura 1 mostra a fibrose presente no espaço porta.

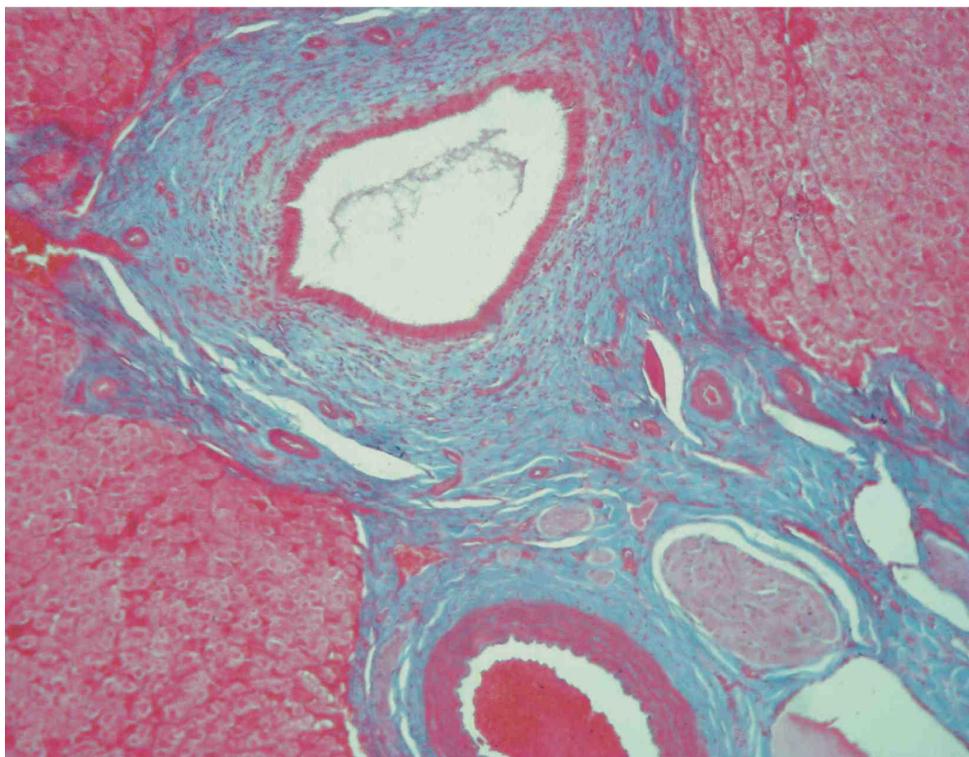


FIGURA 1 – Fotomicrografia de fígado bovino cronicamente infectado por *Fasciola hepatica* demonstrando extensa fibrose em espaço porta. Objetiva de 20x, coloração de Tricromico de Masson.

Marcos et al. (2007) estudaram a distribuição da fibrose pelo parênquima hepático propondo três estádios, a saber: *estádio I* – fibrose em espaço porta com poucas áreas focais algumas vezes próximas as lesões causadas pelo parasito; *estádio II* – fibrose observada ao longo do parênquima hepático com longos septos separados uns dos outros e *estádio III* – fibrose proeminente e longos septos amplamente distribuídos pelo parênquima com nódulos de regeneração. Optou-se por não utilizar essa classificação neste estudo por referir-se apenas a lesão fibrótica sem levar em consideração as demais alterações envolvidas, como por exemplo, a infiltração por células inflamatórias.

Após a classificação da lesão crônica avaliando as lâminas coradas pelo método HE, procurou-se estudar o papel da fibrose dentro e entre as categorias permitindo então analisar o seu comportamento diante do agravamento da lesão, bem como a sua influência na diferenciação da categoria. Já dentro de cada categoria, o estudo da fibrose nas diferentes estruturas do parênquima hepático permite averiguar o papel que cada tipo de fibrose exerce sobre a outra. Os resultados da avaliação estatística da fibrose periportal, periductal e a sua distribuição pelo parênquima hepático estão dispostos na Tabela 2 para o lobo direito.

TABELA 2 – Médias dos escores de intensidade da fibrose periportal, fibrose periductal e fibrose difusa no parênquima do lobo direito de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*

	CATEGORIA I	CATEGORIA II	CATEGORIA III
Fibrose Periportal	1,462aA	1,80aA	2,938bA
Fibrose Periductal	0,385aB	0,733aB	1,375aB
Fibrose Difusa	0,795aC	1,40bC	2,188cB

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si estatisticamente. Teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade, seguido pelo teste de média de Dunn.

No lobo direito a fibrose periportal mostrou ser evidente nas amostras consideradas como categoria III em relação às outras categorias, ou seja, quanto

mais grave a lesão crônica, maior é a quantidade de tecido conjuntivo depositado no espaço porta, respaldando assim, a pressuposição de que quanto mais grave a lesão, maior será a fibrose periportal. No que tange a fibrose periductal, os escores obtidos independem da categoria na qual as amostras avaliadas estavam inseridas. Porém, em muitas amostras não havia a presença dos ductos de médio ou grosso calibre, nos quais foram avaliados a fibrose. Isto justifica a baixa média de escore e também sua independência em relação às categorias. A fibrose difusa do lobo direito mostrou ser bastante importante, sendo mais severa nas amostras pertencentes à categoria III. No estudo de Marcos et al. (2007), após aplicação do estadiamento da fibrose pelo parênquima hepático, os autores concluíram que o agravamento da lesão provoca uma distribuição severa da fibrose pelo parênquima hepático, o que também foi observado neste estudo.

Quando avaliadas essas alterações fibróticas dentro de cada categoria de lesão crônica observou-se haver diferença nos escores obtidos nas categorias I e II, ao passo que na categoria III, fibrose periductal e fibrose difusa não diferiram. Porém, dentro de todas as categorias, a fibrose periportal foi a variável mais importante em relação à fibrose periductal e fibrose difusa.

Os resultados da análise estatística da fibrose periportal, periductal e fibrose difusa pelo parênquima hepático do lobo esquerdo estão dispostos na Tabela 3.

TABELA 3 – Médias dos escores de intensidade da fibrose periportal, fibrose periductal e fibrose difusa no parênquima do lobo esquerdo de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*

	CATEGORIA I	CATEGORIA II	CATEGORIA III
Fibrose Periportal	1,667aA	2,0aB*	2,938bC
Fibrose Periductal	0,769aB	1,756bB	2,688cC
Fibrose Difusa	0,821aB	1,867bB	2,875cC

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si estatisticamente. Teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade, seguido pelo teste de média de Dunn.

A fibrose periportal no lobo esquerdo mostrou-se importante na categoria III em relação às demais categorias. Estes resultados mostraram que o número de

camadas de tecido conjuntivo depositadas no espaço porta aumenta conforme o grau de lesão crônica. Isto foi observado tanto no lobo esquerdo quanto no direito. A presença de fibrose periductal foi diferente em todas as categorias, no entanto, mostrou-se mais grave na categoria III. Importante ressaltar que as análises para esta variável ocorreram somente em ductos de médio e grosso calibre quando presentes na amostra. Em relação à fibrose difusa, a análise estatística demonstrou haver diferença para esta variável entre as categorias de lesão crônica por fasciolose, no entanto, foi mais grave naquelas incluídas na categoria III, corroborando a cronicidade da lesão e a importância que a deposição de colágeno no parênquima hepático tem na fasciolose crônica.

Quando estudadas as variáveis fibrose periportal, fibrose periductal e fibrose difusa dentro de cada categoria do lobo esquerdo, somente a fibrose periportal mostrou ser importante na categoria I, ou seja, nas lesões crônicas recentes a fibrose periportal é a principal alteração fibrótica observada nos fígados com fasciolose.

Uma comparação entre as lesões fibróticas do lobo direito e esquerdo foi conduzida e os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 4.

TABELA 4 – Médias dos escores de intensidade da fibrose periportal, fibrose periductal e fibrose difusa no parênquima do lobo direito em comparação ao lobo esquerdo de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*

	LOBO DIREITO	LOBO ESQUERDO
Fibrose Periportal	1,85a	2,02a*
Fibrose Periductal	0,70a	1,52b
Fibrose Difusa	1,29a	1,62b

* Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si estatisticamente. Teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade.

Pelos resultados, observou-se que somente a fibrose periductal e a fibrose difusa mostraram ser diferente, ou seja, nos ductos de médio e grosso calibre do lobo direito a quantidade de camadas de tecido conjuntivo depositada é menor que nos ductos presentes no lobo esquerdo. No entanto, a baixa média obtida na

avaliação da fibrose periductal do lobo direito pode estar sob influência da ausência de ductos nas amostras avaliadas. Phiri et al. (2006) relatam a relação entre a infecção por *Fasciola* e a calcificação e fibrose em bovinos, sendo as lesões fibróticas importantes encontradas ao redor dos ductos biliares.

Porém, em relação à fibrose difusa, o lobo esquerdo é acometido de forma mais grave com a deposição de tecido conjuntivo muitas vezes fazendo ligações entre os espaços porta, denotando fígados cirróticos.

Marcos et al. (2007) encontraram 16 fígados cirróticos dentre 24 analisados anatomo-patologicamente. Encontraram haver relação entre a associação da cirrose e o número de parasitos, quando existiu mais que 40 exemplares. A correlação também indicou que o número de parasitos foi relacionado ao grau de fibrose hepática. No entanto, os autores descrevem como ponto de corte sensível para o diagnóstico de cirrose, 38 parasitos, com sensibilidade de 94% e especificidade de 75%. Para Marcos e Terashima (2007) o número de parasitos parece ser um agravante dos danos hepáticos e conseqüentemente da fibrose hepática. Neste estudo, a contagem de parasitos não foi realizada por se tratar de amostras provenientes de matadouro frigorífico com fluxo intenso, não sendo possível a contagem ou mesmo coleta dos exemplares, no entanto, observou-se a evolução da lesão fibrótica com o agravamento da lesão crônica.

Modelos experimentais com roedores estão sendo utilizados para estudar a patogênese da fibrose hepática associada a infecção por *F. hepatica*. Tem-se observado que a intensidade da infecção pode ser um determinante na progressão da fibrose (MARCOS e TERASHIMA, 2007).

A forma como *Fasciola hepatica* produz a fibrose hepática ainda não é totalmente compreendida. Segundo Friedman (2000) para que ocorra fibrose hepática deve haver injúria por meses ou ano. Ainda, a formação de fibrose significativa é reversível enquanto o estado cirrótico (o último estágio como conseqüência da fibrose), é geralmente irreversível, mas para que o fígado inicie o processo fibrótico deve haver mudanças quantitativas e qualitativas na composição da matriz extracelular. Ainda, há o aumento de 3-5 vezes no conteúdo total de componentes colágenos e não colágenos e uma mudança no tipo de matriz extracelular no espaço subendotelial para uma matriz contendo colágenos formando fibras. As mudanças que ocorrem na composição do colágeno ao redor dos ductos

biliares são semelhantes àsquelas produzidas na cirrose hepática ou em outras condições patológicas.

O parasito libera proteínas que parecem interagir com os hepatócitos, matriz extracelular, bem como células estreladas, que são células reguladoras da fibrose hepática a partir de qualquer lesão (MARCOS e TERASHIMA, 2007).

As lesões em vasos sanguíneos também foram estudadas entre as amostras e suas correspondentes categorias e os resultados estão dispostos na Tabela 5 para o lobo direito.

TABELA 5 – Médias dos escores de intensidade da lesão fibrótica em artéria, veia e sinusóide do lobo direito de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*.

	CATEGORIA I	CATEGORIA II	CATEGORIA III
Artéria	1,179aA	1,511abA*	1,813bA
Veia	0,872aA	1,111aA	1,25aAB
Sinusóide	0,179aB	0,333aB	0,563aB

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si estatisticamente. Teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade, seguido pelo teste de média de Dunn.

No lobo direito, quando avaliada a lesão fibrótica em artéria houve diferença das amostras pertencentes à categoria III em relação à categoria I, no entanto, quando comparado à categoria II não houve diferença significativa, permitindo concluir que à medida que a lesão crônica se torna mais grave, há uma importante deposição de tecido conjuntivo na camada média de artérias localizadas no espaço porta, no entanto, essas lesões não são tão evidentes em lesões crônicas recentes como observado pela análise estatística. Para as lesões fibróticas em veia e sinusóide não houve diferença destas variáveis entre as categorias, no entanto, possuem sua importância por se tratar de vasos importantes no metabolismo hepático.

Nas categorias I e II, a lesão fibrótica em sinusóide diferiu significativamente daquelas da artéria e veia, isso porque possui escore menor, sendo a lesão na artéria a mais importante. Na categoria III, não houve diferença entre a lesão em artéria e veia e também entre veia e sinusóide. Com isto, verificou-se que a lesão

em artéria foi mais grave, pois apresentou maior escore de acometimento pela deposição de tecido conjuntivo. No lobo direito de fígados de bovinos com fasciolose crônica a arteriosclerose é a lesão vascular mais grave, e a estenose de vasos importantes como artérias podem agravar os danos hepáticos, principalmente pela hipóxia tecidual.

Os resultados da análise estatística das lesões em vasos sanguíneos entre as amostras e também dentro de cada categoria correspondente para o lobo hepático esquerdo estão dispostos na Tabela 6.

TABELA 6 – Médias dos escores de intensidade da lesão fibrótica em artéria, veia e sinusóide do lobo esquerdo de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*.

	CATEGORIA I	CATEGORIA II	CATEGORIA III
Artéria	1,41bA	1,933aA	2,313aA*
Veia	0,897bB	1,356aB	1,75aA
Sinusóide	0,205aC	0,511abC	0,938bB

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si estatisticamente. Teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade, seguido pelo teste de média de Dunn.

Não houve diferença significativa entre as amostras da categoria II e III para lesão fibrótica arterial do lobo esquerdo. O mesmo foi observado para as lesões nas veias. As lesões nos sinusóides não mostraram diferença entre as categorias I e II e entre as categorias II e III, porém esta lesão foi mais acentuada nas amostras que pertencem à categoria III, isto porque, nesta categoria, as lesões encontradas são mais graves que nas demais categorias, o que justifica a média de escore maior em relação às outras. Dentro das categorias I e II as lesões em artéria, veia e sinusóide apresentaram-se diferentes entre si. Nestas categorias, a arteriosclerose foi a lesão mais importante, pois apresentou maior escore quando avaliado a intensidade de fibrose presente na camada média destes vasos. No entanto, para a categoria III, não houve diferença entre a lesão em artéria e veia, mas existiu diferença entre artéria e sinusóide e também entre veia e sinusóide.

A comparação entre a arteriosclerose do lobo direito com a do lobo esquerdo mostrou-se diferente estatisticamente ($p=0,0021$), revelando que no lobo esquerdo a

lesão arterial é mais grave que no lobo direito. Pode-se atribuir o fenômeno ao fato da proximidade do lobo esquerdo com o intestino delgado e também à cavidade abdominal, lugar de provável entrada das formas jovens do parasito e início da migração. Conseqüentemente há o envolvimento de diversos fatores que somados desencadeiam a formação de fibrose e, pelo visto, as artérias do lobo esquerdo também recebem os estímulos para a proliferação de colágeno em sua túnica média, levando assim, ao espessamento da parede e estenose da luz arterial.

Para Caramori et al. (1997), em sua revisão de literatura sobre o papel da célula muscular lisa presente na camada médias das artérias nas estenoses, o fenótipo ativo ou proliferativo dessas células caracteriza-se pelo aspecto poliédrico das mesmas, grandes núcleos e abundante citoplasma, e pela capacidade de migração, proliferação e síntese protéica grandemente aumentada, associados à perda da contratilidade. Ainda, essas células são extremamente difíceis de se diferenciar de fibroblastos, sendo algumas vezes referidas como miofibroblastos. Em resposta a injúria as células musculares lisas são parcialmente responsáveis pela formação da neo-íntima. Completando, Wilcox (1993) descreve que a célula muscular lisa vascular ativada possui grande capacidade de produzir proteínas e assim formar matriz extracelular, sendo a participação da matriz no espessamento da camada íntima da artéria correspondendo a 50-60% do volume tecidual total.

4.6 CONCLUSÕES

As lesões fibróticas foram as mais importantes alterações patológicas encontradas no espaço porta de bovinos cronicamente infectados. Quanto maior o grau de lesão crônica, maior será a distribuição da fibrose pelo parênquima hepático.

O lobo esquerdo foi mais acometido pelas lesões fibróticas e vasculares que o lobo direito na região periductal e em relação à fibrose difusa.

Lesão fibrótica vascular é mais marcante nas artérias que nas veias e sinusóides, principalmente nas amostras pertencentes à categoria III.

4.7 REFERENCIAS

ARTHUR, M. J. P. MMPs and TIMPs in liver fibrosis. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, G245-G249, 2000.

BOSTELMANN, S. C. W. et al. Histopatologia comparativa em fígados de bovinos, bubalinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*. **Archives of Veterinary Science**, v. 5, p. 95-100, 2000.

CARAMORI, P. R. A.; YAMAMOTO, G. I.; ZAGO, A. J. Reestenose pós-angioplastia. Fisiopatogenia. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v. 69, n. 2, p. 141-150, 1997.

ECHEVARRIA, F. Fasciolose. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 13., Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, 1. 2004, Ouro Preto. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, 2004.

FRIEDMAN, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated celular response to tissue injury. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, n. 4, p.2247-2250, 2000.

HAROUN, E. T. M e HITLYER, G. V. Resistance to fascioliasis – a review. **Veterinary Parasitology**, v. 20, p. 63-93, 1986.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6ª ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415 p.

LEITÃO, J. S. **Parasitologia Veterinária**, vol.II. 3º ed, 1980, p. 18-24.

LUNA, L. G. **Manual of Histological Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology**. Washington: MacGraw Hill, 1968, 258p.

MARCOS, L. A. et al. Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle. **Journal of Helminthology**, v. 81, p. 381–386, 2007.

MARCOS, L. A. e TERASHIMA, A. Update on human fascioliasis in Peru: diagnosis, treatment and clinical classification proposal. **Neotropical Helminthology**, v. 1, n. 2, p. 85-103, 2007.

MOLINA, E. C. Comparison of host-parasite relationships of *Fasciola gigantica* infection in cattle (*Bos indicus*) and swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Thesis (Doctor of Philosophy) – School of Tropical Veterinary and Biomedical Sciences, James Cook University, 2005.*

PHIRI, A. M. et al. Comparative fluke burden and pathology in condemned and noncondemned cattle livers from selected abattoirs in Zambia. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 73, p. 275-281, 2006.

TRIVILIN, L. O. et al. Avaliação histopatológica de fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*: estudos preliminares. In: Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 14, 2009, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: ABPV, 2009. 1 CD. Resumo217.doc.

WHO. Study group on the control of foodborne trematode infections. Control of foodborne trematode infections: report of a WHO study group. **Report Technical Series**, Geneva, 1995. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_849_\(part1\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_849_(part1).pdf)>. Acesso em: Maio, 2009.

WILCOX, J. N. Molecular biology: insight into the causes and prevention of restenosis after arterial intervention. **American Journal of Cardiology**. v. 72, 88E-95E, 1993.

CAPÍTULO 3

ESTUDO IMUNOISTOQUIMICO DE FÍGADOS DE BOVINOS CRONICAMENTE
INFECTADOS POR *Fasciola hepatica*

5 CAPÍTULO 3 - ESTUDO IMUNOISTOQUIMICO DE FÍGADOS DE BOVINOS CRONICAMENTE INFECTADOS POR *Fasciola hepatica*

5.1 RESUMO: Estudo imunoistoquímico de fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*. Objetivou-se com este estudo evidenciar a presença dos linfócitos T e B no parênquima hepático, bem como as células produtoras de IgG e estabelecer estudo comparativo entre as células observadas no lobo hepático direito e esquerdo dentro em diferentes estágios de lesão crônica, afim de traçar o comportamento da resposta imunológica do hospedeiro frente ao parasito. Foram selecionadas aleatoriamente seis amostras de cada categoria de lesão hepática crônica causada por fasciolose, as quais foram submetidas à avaliação imunoistoquímica para os anticorpos CD3⁺, CD79α⁺ e IgG⁺ e processadas 18 lâminas por categoria. As células marcadas pela imunoistoquímica foram contadas em dez espaços porta aleatoriamente de cada lobo hepático (direito e esquerdo). Foram calculadas as médias do número de células por lobo hepático e por categoria. Em todas as amostras avaliadas houve imunorreação com os anticorpos CD3⁺, CD79α⁺ e IgG⁺. Na categoria I, II e III não houve diferença na marcação das células do lobo direito e também no lobo esquerdo. Para a categoria I, no lobo esquerdo, a presença dos componentes celulares T e B é maior que no lobo direito. Na categoria II e III, linfócitos B e células produtoras de IgG são mais freqüentes no lobo esquerdo. Em todas as categorias, houve a correlação positiva entre as células marcadas pelos anticorpos CD3⁺, CD79α⁺ e IgG⁺ tanto no lobo direito quanto no lobo esquerdo. Independente do tipo celular envolvido na resposta imune, as lesões foram mais evidentes no lobo esquerdo. Em todas as categorias de lesão crônica por fasciolose há interrelação entre os tipos celulares de forma que a ocorrência de uma célula implica na presença de outra. A avaliação imunoistoquímica mostrou-se eficaz na caracterização do tipo celular presente na inflamação causada pela infecção por *Fasciola hepatica*, tornando-se importante no estudo da resposta inflamatória pelos bovinos.

PALAVRAS CHAVE: anticorpo, imunoistoquímica, fasciolose, ruminantes

5.2 ABSTRACT: Immunohistochemical study of liver of cattle chronically infected with *Fasciola hepatica*. The objective of this study highlight the presence of T and B lymphocytes in the liver and the cells producing IgG and establish a comparative study of the cells observed in the right lobe and left in different stages of chronic injury in order to draw the behavior of the host immune response against the parasite. Were randomly selected six samples of each category of chronic liver injury caused by fasciolosis, which were subjected to immunohistochemistry for the evaluation CD3⁺, CD79 α ⁺ and IgG⁺ and processed 18 slides in each category. The stained cells by immunohistochemistry were counted in ten tracts at random from each lobe (right and left). Were calculated the mean number of cells per lobe in each category. In all samples there was immunoreaction with the CD3⁺, CD79 α ⁺ and IgG⁺. In category I, II and III there was no difference in labeling cells of the right lobe and also in the left lobe. For the category I in the left lobe, the presence of cellular components T and B is greater than the right lobe. Category II and III, B lymphocytes and producing cells IgG are more frequent in the left lobe. In all categories, there was a positive correlation between the cells marked by CD3⁺, CD79 α ⁺ and IgG⁺ both in the right lobe and the left lobe. Regardless of the type of cell involved in immune response, the lesions were more evident in the left lobe. In all categories of injury is chronic fasciolosis interrelation between the cell types so that the occurrence of a cell implies the presence of another. The immunohistochemical evaluation was effective in the characterization of cell type present in the inflammation caused by infection with *Fasciola hepatica*, making it important to study the inflammatory response by the cattle.

KEYWORDS: antibody, immunohistochemistry, fasciolosis, ruminants

5.3 INTRODUÇÃO

A fasciolose é causada por *Fasciola hepatica*, um trematodeo digenético da família dos fasciolídeos pertencente ao filo Platyhelminthes e parasito dos canais biliares de diferentes hospedeiros (URQUHART et al., 1998). Fatores como carga parasitária, fase de desenvolvimento do parasito, tipo e idade do hospedeiro, localização e condição das pastagens e época do ano influenciam na variabilidade

da patogenia e sintomatologia provocada pela infecção por este parasito (BORAY, 1969).

De acordo com Meeusen et al. (1999), nas infecções por *Fasciola hepatica* a resposta mediada por células tem sido descrita *in vitro*, e em termos de resposta proliferativa de linfócitos em sangue periférico contra antígenos do parasito, e com resposta celular ocorrendo no parênquima hepático.

Deste modo, diversos estudos foram conduzidos no intuito de avaliar a resposta imune à *Fasciola hepatica* em ovinos (MEEUSEN et al. 1999; CHAUVIN e BOULARD, 1996). A resposta imune no parênquima hepático de caprinos com fasciolose também tem sido estudada pela técnica de imunistoquímica (MARTÍNEZ-MORENO et al 1999; PÉREZ et al., 2002).

Molina e Skerratt (2005) conduziram um estudo imunistoquímico em fígados de bovinos e bubalinos infectados por *Fasciola gigantica* para a marcação de células envolvidas na resposta imune celular e humoral. Porém, raros são os testes imunistoquímicos em fígados de bovinos infectados com *Fasciola hepatica*.

Diante do exposto, objetivou-se com este estudo evidenciar a presença dos linfócitos T e B no parênquima hepático, bem como as células produtoras de IgG e estabelecer estudo comparativo entre as células observadas no lobo hepático direito e esquerdo dentro em diferentes estágios de lesão crônica, afim de traçar o comportamento da resposta imunológica do hospedeiro frente ao parasito.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Coleta e processamento das amostras

As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas de fígados de bovinos de fígados de bovinos, de várias idades, de ambos os sexos e de regime alimentar variado, com peso vivo aproximado de 450 Kg, sendo todos os animais provenientes do Sul do Estado do Espírito Santo e condenados no matadouro frigorífico de Atílio Vivácqua, Espírito Santo, macroscopicamente positivos para fasciolose. Foram acompanhados quatro abates de animais entre março a julho de 2008, com observação macroscópica dos fígados para a presença de exemplares de *Fasciola* sp. sob autorização e fiscalização do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF-ES). Coletou-se um fragmento de cada lobo (direito e

esquerdo) de 100 amostras, totalizando 200 fragmentos. Estes fragmentos eram de aproximadamente 6 cm² e coletados da superfície visceral, sendo utilizada a forma retangular para o lobo direito e a forma triangular para o lobo esquerdo. O material para exame foi acondicionado em frascos contendo formalina 10% e direcionado ao Laboratório de Histopatologia do Setor de Patologia Animal do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (HOVET/CCA-UFES) para processamento e avaliação histopatológica. As amostras foram processadas para a histologia e submetidas à microtomia para a secção de cortes histológicos de cinco micrômetros de espessura que foram depositados em lâminas histológicas e coradas pelo método Hematoxilina-Eosina (HE) (LUNA, 1968).

As lâminas coradas com HE foram avaliadas e submetidas à categorização conforme Tabela 1 abaixo.

TABELA 1 – Critérios morfológicos de evolução das lesões para a categorização histopatológica de fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*.

CATEGORIA DE LESÃO CRÔNICA	ACHADOS MORFOLÓGICOS
Categoria I	Fibrose periportal (ausente ou até 5 camadas); Fibrose difusa ausente a discreta Hiperplasia de ductos biliares em espaço porta (ausente ou 2-3 ductos); Infiltrado inflamatório mononuclear ausente ou focal discreto (associado ou não à eosinófilo); Arteriosclerose ausente ou presente
Categoria II	Fibrose periportal (até 6 camadas) Fibrose periductal (Quando presente na amostra) (até 6 camadas); Fibrose difusa discreta a moderada Infiltrado inflamatório mononuclear difuso discreto a moderado associado à eosinófilo; Hiperplasia de ductos biliares em espaço porta (até 4 ductos); Arteriosclerose presente
Categoria III	Fibrose periportal (> 6 camadas) Fibrose periductal (Quando presente na amostra) (> 6 camadas); Fibrose difusa moderada a severa Infiltrado inflamatório mononuclear difuso severo; Hiperplasia de ductos biliares em espaço porta (>4 ductos); Formação acinar em ducto principal (quando presente na amostra); Atrofia e/ou degeneração hepática (presente ou não) Arteriosclerose presente

FONTE: TRIVILIN (dados não publicados)

Após coloração pelo método Hematoxilina-Eosina, as lâminas foram avaliadas e classificadas em categoria I, II e III.

Foram selecionadas aleatoriamente seis amostras de cada categoria de lesão hepática crônica causada por fasciolose, as quais foram submetidas a avaliação imunohistoquímica.

5.4.2 Técnica imunohistoquímica para os anticorpos anti-CD3, anti-CD79 α e anti-IgG

Seis amostras de fígado cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* de cada categoria foram selecionadas, totalizando 18 reações por categoria. As amostras foram submetidas à microtomia e obtidos cortes de 3 μ m de espessura, os quais foram depositados sobre lâminas pré-tratadas com adesivo (Poli-L-lisina, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e mantidos em estufa a 60°C por 18 horas.

Em seguida, as lâminas foram submetidas ao processo de desparafinização com duas passagens em xilol absoluto de dez minutos cada, à temperatura ambiente, reidratação em álcool etílico absoluto com três passagens de três minutos cada e três banhos em água destilada de cinco minutos cada. Posteriormente, houve o bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio a 30% em metanol na proporção 1:9 por dez minutos. Para a remoção do peróxido do tecido lavaram-se as lâminas em três banhos de água destilada com cinco minutos cada.

Seguiu-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio a 10mM, pH 6,0, em forno microondas a 750 watts (potência máxima) em cinco ciclos de três minutos cada, totalizando 15 minutos. As lâminas foram então submetidas ao resfriamento à temperatura ambiente por 20 minutos, lavadas em água destilada (três banhos de cinco minutos cada) e imersas em solução tampão TRIS pH 7,5 durante cinco minutos.

Passou-se ao bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com a imersão das lâminas em solução de leite em pó desnatado (MOLICO[®], Nestlé) a 3% em

tampão TRIS por uma hora. Em seguida, as lâminas foram lavadas em solução TRIS durante cinco minutos.

As amostras e as respectivas diluições dos anticorpos primários em solução de BSA (Albumina Bovina Sérica) estão descritas na Tabela 2. A incubação ocorreu em bandeja com tampa por 18 horas a 4°C.

TABELA 2 – Anticorpos primários utilizados para a marcação imunoistoquímica em fígado bovino cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*.

ANTICORPO	CLONE	PRODUÇÃO	DILUIÇÃO	FABRICANTE
Anti-CD3 (NCL-CD3-PS1)	PS1	Camundong	1:100	Novocastra Laboratories
Anti-CD 79 α (NCL-CD79a-192)	11D10	Camundongo	1:50	Novocastra Laboratories
Anti- Immunoglobulina G (NCL-IgGP)	-	Coelho	1:1500	Novocastra Laboratories

Seguiu-se a lavagem dos cortes com tampão TRIS e incubação com o anticorpo secundário e sistema de visualização. Utilizou-se *kit* Super ABC EasyPath (Erviagas) com anticorpo secundário biotilado anti-imunoglobulina de camundongo e coelho, na diluição 1:100 e aplicação do Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase, ambos incubados por 45 minutos cada em temperatura ambiente. O sistema foi aplicado segundo normas do fabricante.

A visualização da marcação imune foi feita pelo tratamento das lâminas com solução de 3,3' diaminobenzidina (Liquid DAB – K3466, DakoCytomation) durante sete minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris, por 35 segundos e, posteriormente, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas com resina sintética.

Para o controle positivo das reações, utilizou-se fragmento de linfonodo de bovino com hiperplasia linfóide. Os cortes de linfonodo foram submetidos ao mesmo processamento que as demais amostras. Como controle negativo foi utilizado amostras de fígado bovino sem alterações, sendo submetido ao mesmo

processamento que as demais amostras, porém, com supressão do anticorpo primário.

5.4.3 Contagem das células e Análise estatística

As células imunomarcadas foram contadas em dez espaços porta escolhidos aleatoriamente, de cada lobo hepático. Após a contagem foi calculado a média total de células por lobo hepático e por categoria.

A análise estatística incluiu Análise de Variância (ANOVA) para fator único ($\alpha=5\%$) para avaliação da diferença entre as células positivamente marcadas para cada anticorpo e em cada lobo hepático. O teste *t* de *Student* ($\alpha=5\%$) foi usado para comparar a positividade das células entre os lobos direito e esquerdo. Para a correlação entre anticorpo anti-CD3, anti-CD79 α e anti-IgG em cada categoria utilizou-se a Correlação de Pearson. Para todos os testes os valores encontrados de células marcadas foram distribuídos normalmente.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da contagem das células imunorreativas nos espaços porta aos anticorpos utilizados nas amostras pertencentes à categoria I está disposto na Tabela 3.

TABELA 3 – Valores médios do número de células CD3⁺, CD79 α ⁺ e IgG⁺ em espaço porta de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* classificados na categoria I de lesão crônica.

AMOSTRA	CATEGORIA I					
	CD3 ⁺		CD79 α ⁺		IgG ⁺	
	DIREITO	ESQUERDO	DIREITO	ESQUERDO	DIREITO	ESQUERDO
A	5	12	9	25	13	34
B	6	16	7	11	6	11
C	13	12	5	11	6	10
D	4	11	8	15	10	14
E	13	12	9	27	10	16
F	8	12	8	12	8	19
MÉDIA	8,17	12,5	7,7	16,83	8,83	17,33

A Figura 1 mostra a marcação do anticorpo anti-IgG no espaço porta de fígado categoria I.

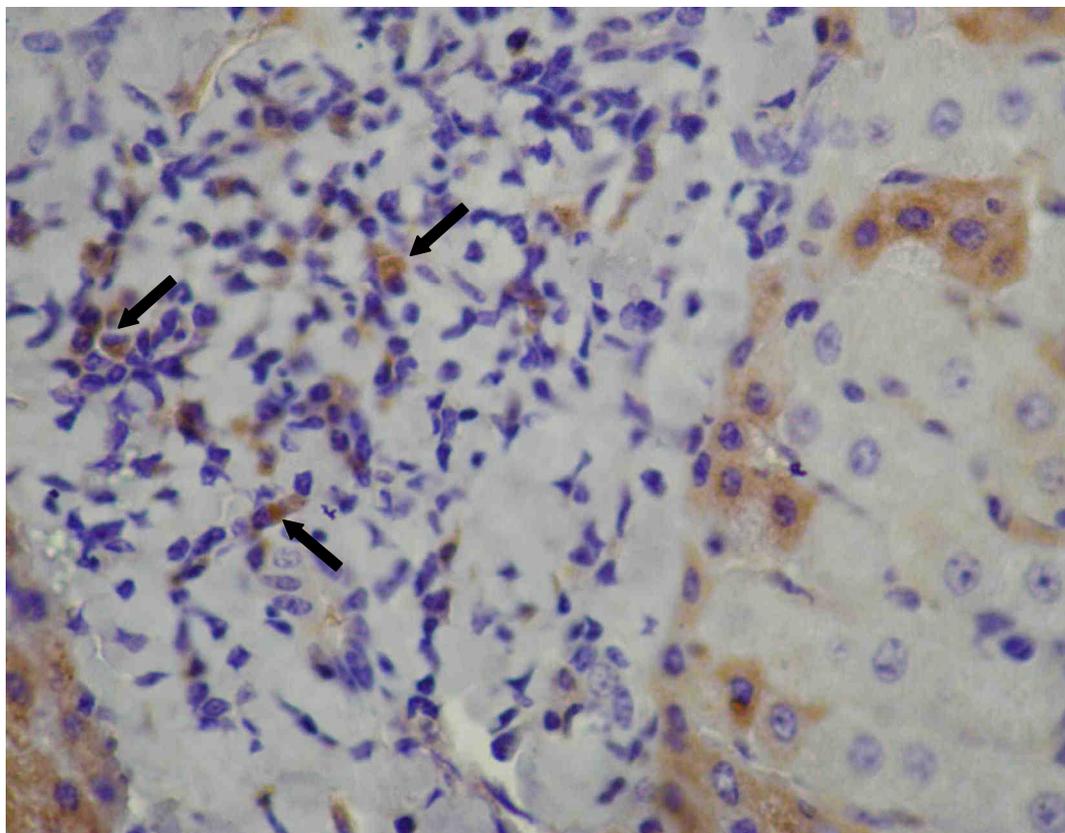


FIGURA 1 – Fotomicrografia de fígado bovino com lesão categoria I, lobo esquerdo. Espaço porta mostrando células IgG⁺ (seta). Objetiva de 40x.

De acordo com Bostelmann et al. (2000) na fasciolose em bovinos os tipos celulares predominantes nos espaços porta são linfócitos e plasmócitos. Nestas células, a molécula CD3 está presente em linfócitos T maduros, compondo o complexo TCR-CD3. Da mesma forma, a molécula CD79 compõe o complexo receptor em linfócitos B. Para este estudo utilizou-se os anticorpos anti-CD3, anti-CD79 α e anti-IgG. Em outros experimentos nos quais se procurou avaliar o tipo de resposta e a dinâmica da resposta em ovinos e caprinos os mesmos anticorpos foram utilizados (PÉREZ et al., 1999; PÉREZ et al., 2002).

A presença de linfócitos T (CD3⁺) e linfócitos B (CD79 α ⁺) no infiltrado inflamatório de fígado de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* reflete o envolvimento destas células na resposta imune durante a infecção. De

acordo com Molina (2005), os linfócitos T estão envolvidos provavelmente, na seleção e ajuda da resposta de anticorpos específicos nas respostas que são mediadas por células, e também, na ativação e recrutamento de macrófagos e granulócitos em bovinos e bubalinos infectados por *Fasciola gigantica*. No entanto, Trivilin et al. (2009) ressaltam que em bovinos a resposta à infecção é mais fibrótica que inflamatória e que nas lesões crônicas a fibrose é uma resposta significativa, principalmente no lobo esquerdo.

Acredita-se que parasitos podem diminuir a resposta imune do hospedeiro. Segundo Gomez-Munoz et al. (2004), a habilidade do parasito em diminuir a resposta do hospedeiro pode induzir doença crônica pelo prolongamento da presença do parasito no local da infecção. Molina (2005) relata que *Fasciola gigantica* pode tanto inibir a proliferação de linfócitos T como suprimir a resposta celular local em bovinos facilitando sua migração no parênquima hepático.

No critério de classificação de fígados cronicamente infectados como categoria I, a infiltração inflamatória está ausente ou presente, porém de forma discreta e focal. No entanto, na avaliação histopatológica das amostras coletadas, foi possível a observação de infiltrado mononuclear, porém, sem a distinção entre os tipos celulares pertencentes aos mononucleados. Com isso, o estudo imunoistoquímico para a marcação de células inflamatórias foi um grande aliado na determinação dessas células.

Quando avaliada a média do número de células imunorreativas para os três anticorpos testados neste estudo, presentes no lobo direito, não foi observada diferença significativa entre a expressão destes tipos celulares ($p=0,7875$). O mesmo foi observado no lobo esquerdo ($p=0,5897$).

Quando avaliada a contagem de células imunorreativas entre os lobos hepáticos, os resultados revelaram que a média de linfócitos T ($CD3^+$) do lobo direito é menor que do lobo esquerdo ($p=0,0445$). O mesmo foi observado na comparação da média de linfócitos B ($CD79\alpha^+$) ($p=0,0293$). Portanto, no lobo esquerdo a presença dos componentes celulares T e B é maior que no lobo direito. Estes resultados podem ser observados na Tabela 4.

TABELA 4 – Médias das células imunorreativas aos anticorpos anti-CD3, anti-CD79 e anti-IgG em espaço porta de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* classificados como categoria I de lesão crônica.

LOBO HEPÁTICO	CATEGORIA I		
	CD3 ⁺	CD79α ⁺	IgG ⁺
DIREITO	8,17aA	7,7aA	8,83aA*
ESQUERDO	12,5aB	16,83aB	17,33aA

* médias seguidas de letra minúscula na linha não diferem entre si pela ANOVA ($\alpha=5\%$). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste *t de Student* ($\alpha=5\%$).

Trivilin et al (2008) encontraram lesões inflamatórias mais intensas no lobo esquerdo de fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*. Isso pode justificar a diferença encontrada neste estudo, em que a média de linfócitos T (CD3⁺) e linfócitos B (CD79α⁺) foi significativamente maiores no lobo esquerdo que no direito.

No lobo direito houve correlação forte e positiva entre os linfócitos T (CD3⁺) e linfócitos B (CD79α⁺) ($r=0,8475$; $p=0,0331$) e entre o linfócito T (CD3⁺) e células IgG⁺ ($r=0,8939$; $p=0,0213$). A correlação existente entre linfócitos B (CD79α⁺) e células IgG⁺ do lobo direito também foi forte e positiva ($r=0,8157$; $p=0,0478$).

Já no lobo esquerdo, houve correlação positiva entre linfócitos T (CD3⁺) e linfócitos B (CD79α⁺) ($r=0,7258$; $p=0,1024$), linfócitos T (CD3⁺) e células IgG⁺ ($r=0,9550$; $p=0,003$) e entre linfócitos B (CD79α⁺) e células IgG⁺ ($r=0,8784$; $p=0,0213$).

Como todas as correlações foram fortes e positivas, indicam que à medida que aumenta o número de um determinado tipo celular envolvido na resposta imune, outra célula também aumentará e de forma significativa. Isso é importante, pois, segundo Molina e Skerratt (2005) na fasciolose bovina há o envolvimento da resposta celular e humoral na tentativa de debelar a infecção. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, nos fígados considerados categoria I de lesão crônica ocorre correlação positiva entre esses tipos celulares.

Martínez-Moreno et al. (1999) avaliaram a resposta imune de caprinos primariamente e secundariamente infectados com *Fasciola hepatica*, encontrando a presença de linfócitos T (CD3⁺) e células λ-IgG e o número médio de células T encontrado variou de 13,5 a 32,3, enquanto células produtoras de IgG variaram de 9,1 a 22,6 células. Molina e Skerratt (2005) encontraram que em bovinos o número de linfócitos T (CD3⁺) foi significativamente maior na terceira semana pós-infecção, entre 170 e 180 células em média, porém, o número de células declinou até a sexta semana pós-infecção quando cessou o experimento. Já o número de linfócitos B (CD79b⁺) foi maior que o controle a partir da sétima semana pós-infecção, aumentando progressivamente até o final do experimento. Isso denota o envolvimento da resposta imune celular e humoral na fasciolose crônica, sendo que a resposta por linfócitos T apresenta-se mais intensa nas primeiras semanas pós-infecção, e à medida que declina em quantidade, há o aumento considerável dos linfócitos B.

Vale ressaltar que as amostras utilizadas neste experimento foram oriundas de matadouro frigorífico e que, por isso, não se tem o controle em dias da infecção e também se há reinfeção presente. Isso pode explicar a discrepância dos números encontrados, visto que, infecções recentes ou reinfeções culminam com uma nova reação inflamatória e, por conseguinte, presença de tipos celulares típicos de infecções recentes.

Para as amostras classificadas como categoria II a contagem média das células no espaço porta de cada amostra está disposta na Tabela 5.

TABELA 5 – Valores médios do número de células CD3⁺, CD79α⁺ e IgG⁺ em espaço porta de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* classificados na categoria II de lesão crônica.

CATEGORIA II						
AMOSTRA	CD3 ⁺		CD79α ⁺		IgG ⁺	
	DIREITO	ESQUERDO	DIREITO	ESQUERDO	DIREITO	ESQUERDO
G	7	7	7	8	8	28
H	6	16	8	16	8	13
I	21	31	16	22	5	17
J	15	21	9	18	9	29
K	17	22	14	17	7	11
L	5	13	7	22	6	9
MÉDIA	11,83	18,33	10,17	17,17	7,17	17,83

Na Figura 2 são observadas células marcadas com anticorpo anti-CD79 α no espaço porta hepático do lobo esquerdo.

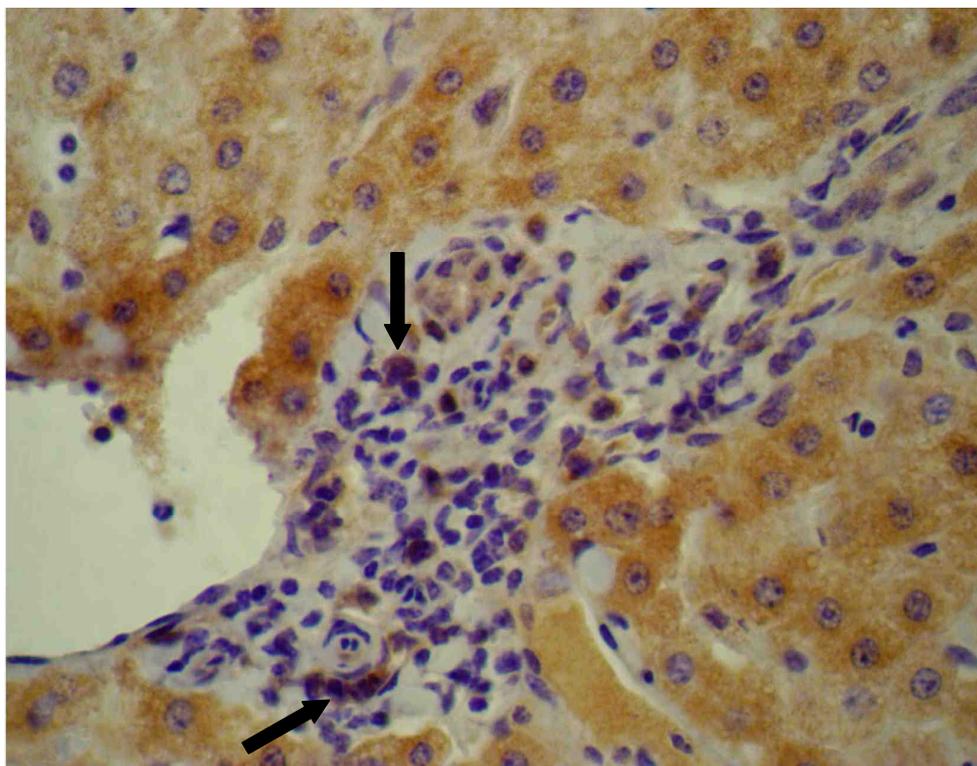


FIGURA 2 – Fotomicrografia de fígado bovino com lesão categoria II, lobo esquerdo. Espaço porta mostrando linfócitos ocasionais imunorreativos para o anticorpo CD79 α ⁺ (seta). Objetiva de 40X.

Pela contagem de células marcadas nos espaços porta nos fígados pertencentes à categoria II de lesão crônica não foi observado diferença entre o número de linfócitos T (CD3⁺), células plasmáticas produtoras de IgG e de linfócitos B (CD79 α ⁺), no lobo direito ($p=0,2305$) e também no lobo esquerdo ($p=0,9646$). Com isso, nas lesões crônicas tidas como moderadas, ou seja, aquelas pertencentes à categoria II, os tipos celulares envolvidos na resposta imune na fasciolose não apresentam diferença em número.

Pelo teste de média, a comparação entre a quantidade de células imunomarcadas no lobo direito em relação ao esquerdo mostrou haver diferença no número de linfócitos B (CD79 α ⁺) ($p=0,02602$) e células IgG⁺ ($p=0,03125$), indicando que estas células são mais frequentes no lobo esquerdo (Tabela 6).

TABELA 6 – Médias das células imunorreativas aos anticorpos anti-CD3, anti-CD79 e anti-IgG em espaço porta de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* classificados como categoria II de lesão crônica.

LOBO HEPÁTICO	CATEGORIA II		
	CD3 ⁺	CD79α ⁺	IgG ⁺
DIREITO	11,83aA*	10,17aA	7,17aA
ESQUERDO	18,33aA	17,17aB	17,83aB

* médias seguidas de letra minúscula na linha não diferem entre si pela ANOVA ($\alpha=5\%$). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste *t de Student* ($\alpha=5\%$).

No lobo direito a correlação entre linfócitos T (CD3⁺) e linfócitos B (CD79α⁺) mostrou-se fortemente positiva ($r=0,9264$; $p=0,0079$). O mesmo foi observado na correlação entre linfócitos T (CD3⁺) e células IgG⁺ ($r=0,9354$; $p=0,0061$). Seguindo o mesmo contexto, a correlação entre linfócitos B (CD79α⁺) e células IgG⁺ mostrou-se positiva ($r=0,8371$; $p=0,0376$).

No lobo esquerdo, as amostras consideradas categoria II, as correlações entre linfócitos T (CD3⁺) e linfócitos B (CD79α⁺) ($r=0,8975$; $p=0,0152$); linfócitos T (CD3⁺) e células IgG⁺ ($r=0,9017$; $p=0,0140$) e linfócitos B (CD79α⁺) e células IgG⁺ ($r=0,8589$; $p=0,0284$) foram forte e positivas.

Portanto, entende-se que na fasciolose crônica, especialmente em lesões moderadas, o número de células B e células IgG⁺ está sob influencia do número de células T presentes tanto no lobo direito, como no esquerdo.

Os resultados da contagem média das células marcadas pelos anticorpos anti-CD3, anti-CD79 e anti-IgG para as amostras pertencentes à categoria III, estão dispostos na Tabela 7.

TABELA 7 – Valores médios do número de células CD3⁺, CD79α⁺ e IgG⁺ em espaço porta de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* classificados na categoria III de lesão crônica.

CATEGORIA II						
AMOSTRA	CD3 ⁺		CD79α ⁺		IgG ⁺	
	DIREITO	ESQUERDO	DIREITO	ESQUERDO	DIREITO	ESQUERDO
M	18	47	15	35	22	32
N	14	28	11	19	5	18
O	16	24	10	15	20	34
P	5	20	13	21	15	17
Q	12	23	14	19	6	29
R	34	19	18	28	9	16
MÉDIA	16,5	26,83	13,5	22,83	12,83	24,33

A marcação de células pelo anticorpo anti-CD3 no espaço porta de fígados cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* pode ser observada na figura 3.

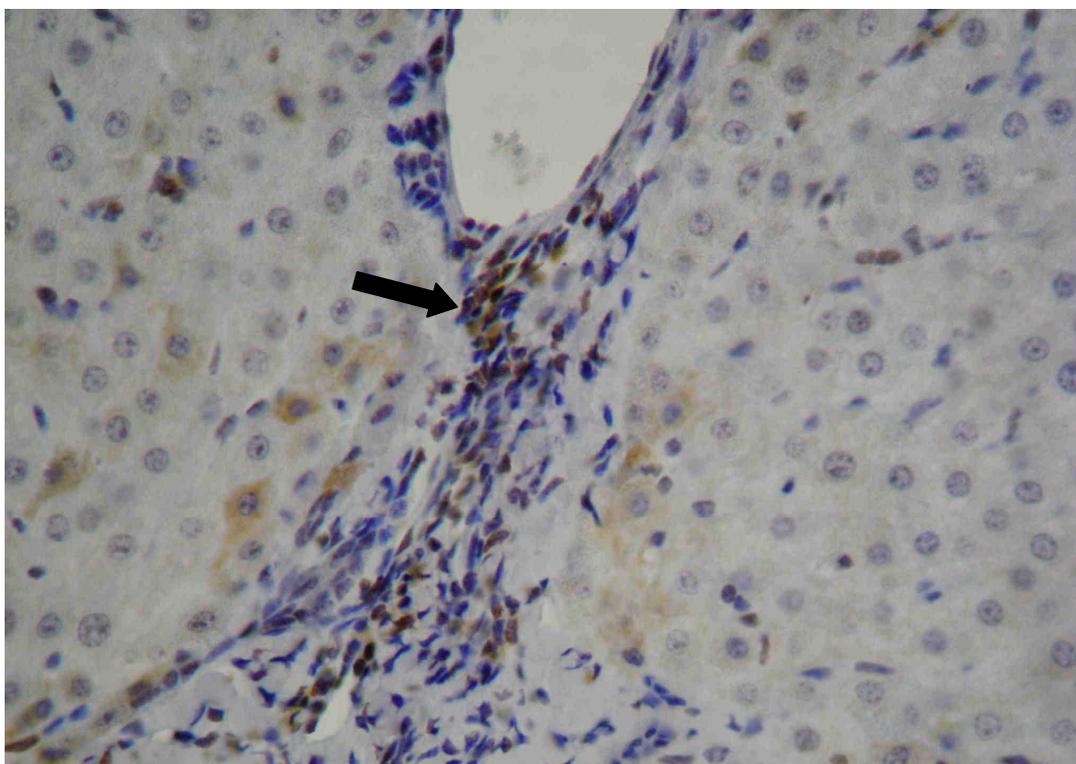


FIGURA 3 – Fotomicrografia de fígado bovino com lesão categoria III, lobo esquerdo. Espaço porta mostrando linfócitos imunorreativos para o anticorpo CD3⁺ (seta). Objetiva de 20X.

Quando avaliados os tipos celulares marcados pelos anticorpos nos lobos hepáticos direito e esquerdo verificou-se não haver diferença entre linfócitos T (CD3⁺), linfócitos B (CD79α⁺) e células IgG⁺ no lobo direito (p=0,6491) ou lobo esquerdo (p=0,7303). Observou-se que independente do lobo hepático no qual a contagem foi realizada, o número de células imunorreativas para os três diferentes anticorpos não se sobressaiu em relação ao outro. Isto denota que na lesão crônica tipo III, ou seja, mais severa, os linfócitos T, linfócitos B e células plasmáticas produtoras de IgG continuam desempenhando suas funções independente da presença de outros tipos celulares envolvidos na resposta inflamatória.

Pelo teste de média, houve diferença entre o número de linfócitos B (CD79α⁺) do lobo direito em relação ao esquerdo (p=0,0229) e entre células produtoras de IgG do lobo direito em relação ao esquerdo (p=0,02783). Os resultados dos testes estatísticos estão resumidos na Tabela 8.

TABELA 8 – Médias das células imunorreativas aos anticorpos anti-CD3, anti-CD79 e anti-IgG em espaço porta de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* classificados como categoria III de lesão crônica.

LOBO HEPÁTICO	CATEGORIA III		
	CD3 ⁺	CD79α ⁺	IgG ⁺
DIREITO	16,5aA*	13,5aA	12,83aA
ESQUERDO	26,83aA	22,83aB	24,33aB

* médias seguidas de letra minúscula na linha não diferem entre si pela ANOVA (α=5%). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste *t* de Student (α=5%).

Os resultados revelaram uma correlação forte e positiva entre linfócitos T (CD3⁺) e linfócitos B (CD79α⁺) do lobo direito (r=0,9584; p=0,0025) e do lobo esquerdo (r=0,9428; p=0,0048). A correlação entre linfócitos T (CD3⁺) e células IgG⁺ também foi forte e positiva no lobo direito (r=0,8573; p=0,0291) e no lobo esquerdo (r=0,7748; p=0,0703). Para linfócitos B (CD79α⁺) e células IgG⁺ seguiu-se o mesmo observado anteriormente no lobo direito (r=0,9527; p=0,0033) e no lobo esquerdo (r=0,8844; p=0,0192).

Esta análise revela que linfócitos T e B mantêm uma relação na resposta imune frente à infecção e que o aumento ou a diminuição de uma dessas células influencia na ocorrência da outra. O mesmo se aplica à relação entre linfócito T e célula IgG⁺ e entre linfócito B e célula IgG⁺. No entanto, linfócitos T tornam-se importantes na resposta inflamatória na fasciolose, pois influenciam de forma significativa a presença de outros tipos celulares. Isso porque o papel do linfócito T na resposta imune celular está na ligação entre a detecção do antígeno e a produção de anticorpos pelos linfócitos B. De acordo com Tizard (2008) nos processos infecciosos crônicos, os diferentes subtipos de linfócitos T são recrutados para o local de acometimento como forma de debelar a infecção. No caso dos bovinos, a produção de IgG₁ é controlada por citocinas liberadas por células Th2, ao passo que IgG₂ tem produção controlada por citocinas liberadas por células Th1 (MULCAHY e DALTON, 2001). Neste estudo, estes subtipos de células T não foram avaliados.

A produção de imunoglobulina G é realizada por linfócitos B maduros e reativos. Uma correlação positiva entre plasmócitos e linfócitos B revela a interligação dessas células na resposta inflamatória. Segundo Molina e Sekerratt (2005), a produção de anticorpos específicos por animais infectados também podem ser influenciadas pela ativação de células T durante a infecção. Isso porque linfócitos T são vistos no fígado de animais infectados durante a infecção por *F. hepatica* (MARTINEZ-MORENO et al., 1999; PEREZ et al. 1999). Neste estudo, tanto células produtoras de IgG e linfócitos T foram imunomarcados com os anticorpos utilizados, além disso, os testes estatísticos revelaram a relação existente entre esses dois tipos celulares corroborando os estudos já realizados com estas células para a espécie bovina durante a fasciolose.

A utilização de anticorpos específicos para determinados tipos celulares envolvidos na resposta inflamatória frente à fasciolose é uma grande ferramenta no entendimento do papel dos mesmos. Baseado nisso, diversos pesquisadores fizeram estudos para a verificação da presença de linfócitos T, linfócitos B ou mesmo células plasmáticas produtoras de IgG. Em ovinos, Pérez et al. (2002) descreveram que a resposta imune celular e humoral representada pela infiltração com linfócitos T (CD3⁺), B (CD79α⁺) e células produtoras de IgG foi intensa em todos os grupos infectados experimentalmente com *Fasciola* durante sete dias. Neste

estudo estes tipos celulares também foram marcados, evidenciando a presença de uma resposta imune e celular também nos bovinos, semelhante a dos ovinos.

Em relação ao local onde as células imunorreativas estavam localizadas, este estudo revelou maior presença dos tipos celulares nos espaços porta e próximo aos vasos sanguíneos. No estudo conduzido por Pérez et al. (1998), o anticorpo CD79 mAb reagiu com células plasmáticas e linfócitos localizados principalmente nas zonas fibrosas da lesão hepática e vesícula biliar de caprinos. O anticorpo IgG reagiu com células plasmáticas associadas à lesão hepática crônica, principalmente nos espaços porta. Apesar de serem espécies diferentes, o que se percebe neste estudo é a predileção das células inflamatórias pelas regiões onde as lesões fibróticas tornam-se evidentes, como é o caso do espaço porta. Por este motivo, a contagem das células imunorreativas foi realizada nos espaços porta escolhidos aleatoriamente de cada lobo hepático.

Embora os testes estatísticos não tenham revelado diferença entre os tipos celulares envolvidos na resposta imune nos lobos hepáticos direito e esquerdo, de forma geral, em todas as categorias avaliadas notou-se maior acometimento do lobo hepático esquerdo, revelando que na fasciolose crônica, nos fígados bovinos, as lesões mais significativas concentram-se nesse lobo hepático.

Partindo do princípio de que nas infecções recentes ocorre maior produção de anticorpos contra antígenos de secreção/excreção liberados durante a migração feita pelo parasito no parênquima hepático, Molina e Skerratt (2005) relataram que a infiltração de linfócitos T e B, células plasmáticas, eosinófilos e mastócitos em lesões hepáticas causadas por *F. gigantica* indica o desenvolvimento de uma resposta imune local.

De acordo com estes mesmos autores, provavelmente, esta resposta seja induzida pelo aumento de antígenos liberados pelos parasitos na medida em que crescem, ou seja, o envolvimento da resposta do hospedeiro se dá desde o início da infecção persistindo até o momento em que os parasitos alcancem os ductos biliares. Porém, em relação à produção de anticorpos, células de memórias contra os antígenos do parasito continuam sua produção.

O aparecimento de IgG contra proteínas do produto de secreção e excreção dos parasitos em alpacas infectadas com *F. hepatica* culminou com níveis mais

elevados na oitava semana pós-infecção quando houve o aparecimento de ovos nas fezes, porém, à medida em que a infecção se tornava crônica houve um leve declínio do nível de IgG (TIMOTEO et al., 2005). O estudo de Mulcahy e Dalton (2001) com bovinos revelaram que com o progresso a cronicidade da doença, os níveis séricos de IgG₁ cessaram e lentamente declinam. Deste modo, o declínio do número de células IgG⁺ observado neste estudo, pode ser justificado pela evolução crônica da lesão conforme observado por outros autores e em diferentes espécies.

Ferre et al. (1997) estudaram a resposta de IgG e IgA na fasciolose em ovinos e encontraram uma cinética semelhante para essas duas classes de imunoglobulina, ou seja, ocorreu o aumento progressivo de imunoglobulinas específicas durante o período pré-patente, tendendo a diminuir quando os parasitos adultos se estabelecem nos ductos biliares, ainda, os níveis de IgG aumentaram até a décima quarta semana pós-infecção estabilizando até a décima sexta semana.

Neste estudo, durante o processo de categorização da lesão crônica, a inflamação observada variou de discreta a moderada e sempre esteve associada à presença dos parasitos nos ductos biliares. Isto demonstra a existência da reação do hospedeiro frente à invasão parasitária com resposta inflamatória não tão intensa quanto nas observadas em outras espécies animais, mesmo sendo essa infecção crônica, onde espera-se para bovinos, uma presença menor de células inflamatórias e evidência maior de lesões fibróticas.

5.6 CONCLUSÕES

Linfócitos T e B, e células plasmáticas produtoras de IgG estiveram presentes em fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*, independente da categoria nas quais as amostras haviam sido classificadas.

Em todas as categorias avaliadas, independente do tipo celular envolvido na resposta imune, as lesões foram mais evidentes no lobo esquerdo.

Em todas as categorias de lesão crônica por fasciolose há interrelação entre os tipos celulares de forma que a ocorrência de uma célula implica na presença de outra.

A avaliação imunoistoquímica mostrou-se eficaz na caracterização do tipo celular presente na inflamação causada pela infecção por *Fasciola hepatica*, tornando-se importante no estudo da resposta inflamatória pelos bovinos.

5.7 REFERÊNCIAS

BORAY, J.C. Experimental fascioliasis in Australia. **Advances in Parasitology**, 1969.

BOSTELMANN, S. C. W. et al. Histopatologia comparativa em fígados de bovinos, bubalinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*. **Archives of Veterinary Science**, v. 5, p. 95-100, 2000.

CHAUVIN, A. e BOULARD, C. Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. **Parasite**, v. 3, p. 209–215, 1996.

FERRE, I.; ORTEGA-MORA, L. M.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A. Serum and bile antibody responses (IgG and IgA) during subclinical *Fasciola hepatica* infection in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 68, p. 261-267, 1997.

GOMEZ-MUNOZ, M. T. et al. Inhibition of bovine T lymphocyte responses by extracts of the stomach worm *Ostertagia ostertagi*. **Veterinary Parasitology**, v. 120, p. 199-214, 2004.

LUNA, L. G. **Manual of Histological Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology**. Washington: MacGraw Hill, 1968, 258p.

MARTÍNEZ-MORENO, A. et al. Liver pathology and immune response experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. **Veterinary Parasitology**. v.82, p. 19-33, 1999.

MEEUSEN, E. et al. Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. **Parasite Immunology**, v. 17, p.537–45, 1999.

MOLINA, E. C. Comparison of host-parasite relationships of *Fasciola gigantica* infection in cattle (*Bos indicus*) and swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Thesis*

(Doctor of Philosophy) – School of Tropical Veterinary and Biomedical Sciences, James Cook University, 2005.

MOLINA, E. C. e SKERRATT, L. F. Cellular and humoral responses in liver of cattle and buffaloes infected with a single dose of *Fasciola gigantica*. **Veterinary Parasitology**. v. 131, p. 157-163, 2005.

MULCAHY, G. e DALTON, J. P. Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. **Research in Veterinary Science**, v. 70, p. 83-86, 2001.

PÉREZ, J. et al. Immunohistochemical study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in primary and secondary infected goats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, p. 337-348, 1998.

PÉREZ, J. et al. 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, p. 199-210, 1999.

PÉREZ, J. et al. Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without triclabendazole treatment. **Journal of Comparative Pathology**, v. 127, p. 30-36, 2002.

TIMOTEO, O. et al. Characterization of the humoral immune response in alpacas (*Lama pacos*) experimentally infected with *Fasciola hepatica* against cysteine proteinases Fas1 and Fas2 and histopathological findings. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 106, p. 77–86, 2005.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária – Uma introdução**. 8ª ed. São Paulo: Roca Biomedicina, 2008.

TRIVILIN, L. O. et al. Avaliação microscópica comparativa de fígados de bovinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*: estudos preliminares. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 15.; Seminário de Parasitologia Veterinária

dos Países do Mercosul, 2., 2008, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CBPV, 2008. 1 CD. Resumos_Apresentação ORAL.doc.

TRIVILIN, L. O. et al. Avaliação histopatológica de fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*: estudos preliminares. In: Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 14, 2009, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: ABPV, 2009. 1 CD. Resumo217.doc.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

6 CONCLUSÕES GERAIS

As alterações histopatológicas presentes nas infecções por *Fasciola hepatica* permitem avaliar o grau de danos hepáticos causados pela infecção.

Em bovinos, lesões como proliferação de ductos biliares, infiltrado inflamatório mononuclear, arteriosclerose e fibrose, seja ela periportal ou periductal, são marcantes em infecções de cunho crônico.

A proposta de classificação da lesão crônica por fasciolose baseada nas principais alterações morfológicas observadas no fígado revelou que a maioria dos fígados apresentavam-se em estágio moderado de infecção. Isso porque a classificação levou em consideração lesões inflamatórias e fibróticas, mostrando-se assim, uma importante ferramenta de avaliação microscópica por permitir estudar o quadro evolutivo da fasciolose.

Lesões fibróticas em fígados cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* foram marcantes em todo o parênquima hepático, porém, mais importantes no lobo hepático esquerdo e em fígados considerados categoria III de lesão.

As lesões fibróticas vasculares de fígados bovinos com fasciolose se destacaram, principalmente em arteríolas presentes no espaço porta e no lobo esquerdo.

Em relação à imunofenotipagem da resposta imune na espécie bovina, linfócitos T e B estiveram presentes, além de células plasmáticas produtoras de IgG, com o envolvimento dos componentes celular e humoral frente a infecção.

Independente do tipo celular presente na resposta imune frente a infecção, no lobo esquerdo foram observadas maior número de células imunorreativas se comparado ao lobo direito.

As células inflamatórias imunorreativas revelaram estar correlacionadas na resposta imune, tanto humoral quanto celular na infecção crônica. Com isso, a técnica de imunoistoquímica é um excelente método para a identificação de componentes da resposta inflamatória nas infecções por *Fasciola hepatica*.

7 REFERENCIAS

ABROUS, M. et al. Morphological variability in *Fasciola hepatica* eggs in ruminants, rodents and lagomorphs. **Journal of Helminthology**. v. 72, p. 313-317, 1998.

ACHA, P. N. e SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales. **Organização Panamericana de Saúde**, Washington: D. C., 1986.

ACOSTA, D. Epidemiologia y control de *Fasciola hepatica* en el Uruguay. In NARI,A.; FIEL,C. (ed) **Enfermedades Parasitarias de Importancia em Bovinos**. Montevideo. Hemisfério Sur. 1994.

ARTHUR, M. J. P. MMPs and TIMPs in liver fibrosis. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, G245-G249, 2000.

BECK, A. A. H. Fasciolose. **A Hora Veterinária**. n. 75, p. 65-70, 1993.

BEHM, C. A. Pathophysiology of *Fasciola hepatica* infections mammals. In: BORAY, J. C. **Immunology, pathobiology and controle of fasciolosis**. Izimir: MSD AGVET, 1994.

BERNE, M. E. A. Identificação e purificação de antígenos somáticos de formas adultas de *Fasciola hepatica* através de anticorpos monoclonais: ensaios de imunoproteção e imunodiagnóstico. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas, 168p., 1994.

BORAY, J.C. Experimental fascioliasis in Australia. **Advances in Parasitology**, 1969.

BORDIN, E. L. Revisão da anatomia patológica da fasciolose bovina. **A Hora Veterinária**. Edição extra, n. 1, 1995.

BOSTELMANN, S. C. W. et al. Histopatologia comparativa em fígados de bovinos, bubalinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*. **Archives of Veterinary Science**, v. 5, p. 95-100, 2000.

CARAMORI, P. R. A.; YAMAMOTO, G. I.; ZAGO, A. J. Reestenose pós-angioplastia. Fisiopatogenia. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v. 69, n. 2, p. 141-150, 1997.

CARLTON, W.W. e McGAVIN, M.D. **Patologia veterinária especial de Thomson**, 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 1998.

CHAUVIN, A. e BOULARD, C. Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. **Parasite**, v. 3, p. 209–215, 1996.

CORDERO, M. et al. **Parasitologia veterinária**. Madrid : Mcgraw-Hill Interamericana, 1999, p.260-262.

COSTA, N. C.; SILVA SANTOS, I. C.; BOTELHO, G. A. *Myocastor coupus* Molina, 1782 (Rodentia, Echymidae) naturalmente infectado com *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda, Fasciolidae). **A Hora Veterinária**. Ano 6, n. 36, p. 24-26, 1987.

DACAL, A. R. M.; COSTA, H. M. A.; LEITE, A. C. R. Susceptibilidade de *Lymnaea* (Pseudosuccinea) *columella* (Say, 1817) exposta à infecção por miracídios de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. v. 30, n. 5, p. 361-369, 1988.

ECHEVARRIA, F. A. M. Fasciolose: ocorrência, diagnóstico e controle. **Agroquímica Santo Amaro**. v. 27. 1985.

ECHEVARRIA, F. Fasciolose. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 13., Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, 1. 2004, Ouro Preto. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, 2004.

ENTWISTLE, K. W. Reproduction. In: **Beef cattle production in the tropics**, James Cook University: Townsville, p. 172–273, 1978

FARINAZZO, R. J. M.; IGREJA, R. P.; HUGGINS, D. W. Fasciolíase Hepática. In: BATISTA, R. S.; GOMES, A. P.; IGREJA, R. P.; HUGGINS, D. W. **Medicina Tropical. Abordagem atual das Doenças Infeciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro : Editora Cultura Médica, 2001, p.287-290.

FERRE, I.; ORTEGA-MORA, L. M.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A. Serum and bile antibody responses (IgG and IgA) during subclinical *Fasciola hepatica* infection in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 68, p. 261-267, 1997.

FRAGA, J. C. L. Incidência de fasciolose hepática bovina no sul do Espírito Santo. Monografia (Pós-graduação em Defesa e Vigilância Sanitária Animal). Universidade Castelo Branco. Instituto Brasileiro de Pós-graduação Qualittas, 29p., 2008.

FREDES, F. La fasciolosis animal y humana. **Monografias Electrónica de Patología Veterinaria.**, n. 1, p. 38-67, 2004.

FRIEDMAN, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated celular response to tissue injury. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 275, n. 4, p.2247-2250, 2000.

GOMES, C. D. Interrelação entre *Fasciola hepatica* L., 1758 e *Lumnaea columella* Say, 1817: susceptibilidade e patogenia. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Intituto de Biologia, 73p., 1985.

GOMEZ-MUNOZ, M. T. et al. Inhibition of bovine T lymphocyte responses by extracts of the stomach worm *Ostertagia ostertagi*. **Veterinary Parasitology**, v. 120, p. 199-214, 2004.

GONZALES, H. Perdidas econômicas producidas por las parasitosis de los rumiantes. In: JORNADAS MÉDICO VETERINÁRIAS, 8.:1982, Valdivia. **Anais ...** Valdivia: Universidad Austral de Chile, 1982. p. 39-48.

GRABER, M. Role du facteur alimentaire dans la distomatose bovine et ovine a *Fasciola gigantica*. **Bulletin of Epizootic Diseases in Africa.** v. 19, p. 45–60, 1971.

HAROUN, E. T. M e HITLYER, G. V. Resistance to fascioliasis – a review. **Veterinary Parasitology**, v. 20, p. 63-93, 1986.

HURTREZ-BOUSSÈS, S. et al. Dynamics of host parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). **Microbes and Infection.** v. 3, p. 841-849, 2001.

JIMENEZ-ALBARRAN, M. e GUEVARA-POZO, D. Estudios experimentales sobre biología de *Fasciola hepatica*, 1 – Numero y variabilidad de los huevos de *Fasciola hepatica* hallados em vesícula biliar de vaca, oveja y cabra. **Revista Ibérica de Parasitología**. v. 37, n. 3-4, p. 291-300, 1977.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6ª ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415 p.

KEEGAN, P. S. e TRUDGETT, A. *Fasciola hepatica* in rat: immune responses associated with the development of resistance to infection. **Parasite Immunology**. v. 14, p. 657-669, 1992.

KUMA, S. E SHARMA, M. C. Infertility in rural cows in relation to fascioliasis. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 61, p. 838–840, 1991

LEITÃO, J. S. **Parasitologia Veterinária**, vol.II. 3º ed, 1980, p. 18-24.

LOTFOLLAHZADEH, S. et al. The relationship between normocytic, hypochromic anaemia and iron concentration together with hepatic enzyme activities in cattle infected with *Fasciola hepatica*. **Journal of Helminthology**. v. 82, n. 1, p. 85-88, 2008.

LUNA, L. G. **Manual of Histological Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology**. Washington: MacGraw Hill, 1968, 258p.

LUZ, E.; QUEIROZ, V. da S.; LEITE, L. C. Perfil epidemiológico da *Fasciola hepatica* numa propriedade na cidade de Bocaiúva do Sul. **Archives of Veterinary Science**, v. 1, n. 1, p. 54, 1996.

MARCOS, L. A. e TERASHIMA, A. Update on human fascioliasis in Peru: diagnosis, treatment and clinical classification proposal. **Neotropical Helminthology**, v. 1, n. 2, p. 85-103, 2007.

MARCOS, L. A. et al. Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle. **Journal of Helminthology**, v. 81, p. 381–386, 2007.

MARTÍNEZ-MORENO, A. et al. Liver pathology and immune response experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. **Veterinary Parasitology**. v.82, p. 19-33, 1999.

MAURE, E. A. P. et al. Dinamica de *Lymnaea columella* (Say, 1817), hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) em município do Estado de São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 35, n. 4, p. 151-155, 1998.

MEEUSEN, E. et al. Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. **Parasite Immunology**, v. 17, p.537–45, 1999.

MEEUSEN, E. N. T. e PIEDRAFITA, D. Exploiting natural immunity to helminth parasites for the development of veterinary vaccines. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p.1285–1290, 2003.

MÉNARD, A. et al. Inventory of wild rodents and lagomorphs as natural hosts of *Fasciola hepatica* on a farm located in a humid area in Loire Atlantique (France). **Parasite**. v. 7, p. 77-82, 2000.

MENDES, E. A. Comportamento e desenvolvimento de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) de bovinos naturalmente infectados em sagüi (*Callithrix penicillata*) e gerbil (*Meriones unguiculatus*). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, 127p., 2006.

MILBOURNE, E. A. e HOWELL, M. J. Eosinophil to responses to *Fasciola hepatica* in rodents. **International Journal for Parasitology**. v. 20, n. 5, p. 705-708, 1990.

MOLINA, E. C. Comparison of host-parasite relationships of *Fasciola gigantica* infection in cattle (*Bos indicus*) and swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). Thesis (Doctor of Philosophy) – School of Tropical Veterinary and Biomedical Sciences, James Cook University, 2005.

MOLINA, E. C. e SKERRATT, L. F. Cellular and humoral responses in liver of cattle and buffaloes infected with a single dose of *Fasciola gigantica*. **Veterinary Parasitology**. v. 131, p. 157-163, 2005.

MONTENEGRO, M. R. e FRANCO, M. **Patologia Processos Gerais**, 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

MULCAHY, G. e DALTON, J. P. Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. **Research in Veterinary Science**, v. 70, p. 83-86, 2001.

NAHM, J. **Helminthology and General Parasitology**. University of Missouri College of Veterinary Medicine, 1997.

PÉREZ, J. et al. Immunohistochemical study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in primary and secondary infected goats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, p. 337-348, 1998.

PÉREZ, J. et al. 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, p. 199-210, 1999.

PÉREZ, J. et al. Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with ou without triclabendazole treatment. **Journal of Comparative Pathology**, v. 127, p. 30-36, 2002.

PHIRI, A. M. et al. Comparative fluke burden and pathology in condemned and noncondemned cattle livers from selected abattoirs in Zambia. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 73, p. 275-281, 2006.

PROWSE, R. K. et al. *Fasciola hepatica* cathepsin L suppresses sheep lymphocyte proliferation in vitro and modulates surface CD4 expression on human and ovine T cell. **Parasite Immunology**, v. 24, p. 57-66, 2002.

QUEIROZ, V. S. Enzimoimunoensaio (ELISA), imunoeletrotransferência (EITB) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), como ferramentas para diagnóstico de fasciolose hepática em bubalinos (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758). 2005. Tese (Doutorado em Saúde Animal e Humana) - Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2005

RAADSMA, M. A. et al. Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* or *Fasciola hepatica* in Merino sheep I. Comparative immunological and plasma biochemical changes during early infection. **Veterinary Parasitology**. v. 143, p. 275-286, 2007.

RAINA, O. K.; SRIVENY, D.; YADAV, S. C. Humoral immune response against *Fasciola gigantica* fatty acid binding protein. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 65-72, 2004.

RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**, v. 2. São Paulo: Varela. 2001.

RONDELAUD, D. e DREYFUSS, G. *Fasciola hepatica*: the influence of the host on the characteristics of infection in the snail *Lymnaea truncatula*. **Parasite**. v. 2, p. 275-280, 1995.

ROSS, J. C.; TODD, J. R.; DOW, C. Single experimental infections of calves with the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). **Journal of Comparative Pathology**. n. 76, p. 67-81, 1966.

SADJJADI, S.M.; TAKI, T.M.; ORYAN, A. Quantitative histopathology of liver and portal lymphnode in chronic bovine fascioliasis. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.67, n.4, p.270- 274, 1997.

SEWELL, M. M. H. The pathogenesis of fascioliasis. **Veterinary Record**. v. 78, p. 98-105, 1966.

SILVA, I. C. et al. Fasciolose. I. incidência e importância na bovino e ovinocultura do RS. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v. 33, n. 323, p. 34-42, 1980.

SOULSBY, E. J. L. **Parasitologia y enfermedades parasitarias**. 7.ed. México: Interamericana, 1987. 77 p.

SOULSBY, E.J.L. **Helminths, Arthropods and Protozoa of domesticated animals**. 7 ed. Lea and Febiger: Filadelfia, 1982.

SPITHILL, T. W.; SMOOKER, P. M.; COPEMAN; B. *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. In: **Fasciolosis**, International: Wallingford, 1999p. 465– 520.

TIMOTEO, O. et al. Characterization of the humoral immune response in alpacas (*Lama pacos*) experimentally infected with *Fasciola hepatica* against cysteine proteinases Fas1 and Fas2 and histopathological findings. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 106, p. 77–86, 2005.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária – Uma introdução**. 8ª ed. São Paulo: Roca Biomedicina, 2008.

TRIVILIN, L. O. et al. Avaliação histopatológica de fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*: estudos preliminares. In: Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 14, 2009, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: ABPV, 2009. 1 CD. Resumo217.doc.

TRIVILIN, L. O. et al. Avaliação microscópica comparativa de fígados de bovinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*: estudos preliminares. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 15.; Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul, 2., 2008, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CBPV, 2008. 1 CD. Resumos_Apresentação ORAL.doc.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

VALERO, M. A. e MAS-COMA, S. Comparative infectivity of *Fasciola hepatica* metacercariae from isolates of the main and secondary reservoir animal host species in the Bolivian Altiplano high human endemic region. **Folia Parasitologica**. v. 47, n. 1, p. 17-22, 2000.

WHO. Study group on the control of foodborne trematode infections. Control of foodborne trematode infections: report of a WHO study group. **Report Technical Series**, Geneva, 1995. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_849_\(part1\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_849_(part1).pdf)>. Acesso em: Maio, 2009.

WIEDOSARI, E.; HAYAKAWA, H. E COPEMAN, B. Host differences in response to trickle infection with *Fasciola gigantica* in buffalo, Ongole and Bali calves. **Tropical Animal Health and Production**. v. 38, p. 43–53, 2006.

WILCOX, J. N. Molecular biology: insight into the causes and prevention of restenosis after arterial intervention. **American Journal of Cardiology**. v. 72, 88E-95E, 1993.

YANG, Q. et al. Plasma aspartate aminotransferase (AST), glutamate dehydrogenase (GLDH) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) activities in water buffaloes with experimental subclinical fasciolosis. **Veterinary Parasitology**. v. 78, p. 129-136, 1998.

ZAFRA, R., et al. Study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunised with a peptide of the Sm14 antigen. **Research in Veterinary Science**. (2009), doi:10.1016/j.rvsc.2009.02.013.

ZHANG, W. Y. et al. *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: Comparison of cellular response to experimental infection in sheep. **Experimental Parasitology**, v. 111, p. 154-159, 2005.

8 ANEXOS

PROPOSAL OF HISTOPATHOLOGICAL CLASSIFICATION OF BOVINE HEPATIC LESIONS CAUSED BY CHRONIC FASCIOLOSIS

Artigo submetido à publicação na Revista Veterinary Parasitology

Manuscript Number: Vetpar-D-09-3525R1

Title: PROPOSAL OF HISTOPATHOLOGICAL CLASSIFICATION OF BOVINE HEPATIC LESIONS CAUSED BY CHRONIC FASCIOLOSIS

Article Type: Research Paper

Keywords: Fasciola hepatica, histopathology, liver, bovine.

Corresponding Author: Mr Leonardo Oliveira Trivilin

Corresponding Author's Institution: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

First Author: Leonardo Oliveira Trivilin

Order of Authors: Leonardo Oliveira Trivilin; Dyeime R Sousa, Medicine Veterinary Student; Louisiane C Nunes, Doctor; Isabella V F Martins, Doctor

Abstract: Fasciolosis is a zoonotic disease led by a digenetic trematode. Most of the time, it is a chronic disease in bovine. This study had as aim the proposal of classification of bovine hepatic lesion chronically infected by Fasciola hepatica through histopathological evaluation. Fifty livers convicted of fasciolosis in the slaughterhouse of Atilio Vivacqua, Espírito Santo, Brazil were used. One fragment of each hepatic lobe of each liver was sampled and submitted to histopathological processes with inclusions in paraffin and HE staining. Different levels and intensities of inflammatory and fibrotic lesions were evaluated and classified according to categories varying from I to III. The results have revealed that 52% of the samples belonged to the category II, followed by 36% into the category I, and 12% into the category III. The proposal of histopathological classification of bovine hepatic lesions by chronic fasciolosis has proved to be a valuable method of microscopic evaluation, since it allows the establishment of the evolutionary picture of the illness.

1 **PROPOSAL OF HISTOPATHOLOGICAL CLASSIFICATION OF BOVINE**
2 **HEPATIC LESIONS CAUSED BY CHRONIC FASCIOSIS**

3 L. O. TRIVILIN¹; D. R. DE SOUSA²; L. C. NUNES³; I. V. F. MARTINS³

4 1 – Medicine Veterinary Graduate Student of the Universidade Federal do Espírito Santo

5 2 – Medicine Veterinary Undergraduate Student of the Universidade Federal do Espírito
6 Santo

7 3 – Department of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Espírito Santo, Alto
8 Universitário, post office box 16, Alegre, Espírito Santo State, Brazil, ZIP CODE 29500-000

9
10 ABSTRACT: Fasciolosis is a zoonotic disease led by a digenetic trematode. Most of the
11 time, it is a chronic disease in bovine. This study had as aim the proposal of classification of
12 bovine hepatic lesion chronically infected by *Fasciola hepatica* through histopathological
13 evaluation. Fifty livers convicted of fasciolosis in the slaughterhouse of *Atílio Vivacqua*,
14 Espírito Santo, Brazil were used. One fragment of each hepatic lobe of each liver was
15 sampled and submitted to histopathological processes with inclusions in paraffin and HE
16 staining. Different levels and intensities of inflammatory and fibrotic lesions were evaluated
17 and classified according to categories varying from I to III. The results have revealed that
18 52% of the samples belonged to the category II, followed by 36% into the category I, and
19 12% into the category III. The proposal of histopathological classification of bovine hepatic
20 lesions by chronic fasciolosis has proved to be a valuable method of microscopic evaluation,
21 since it allows the establishment of the evolutionary picture of the illness.

22 Keywords: *Fasciola hepatica*, histopathology, liver, bovine.

23
24 **INTRODUCTION**

25 Fasciolosis is a zoonotic disease leaded by a digenetic trematode, which could infest different
26 animal species, especially, ruminantia (WHO, 1995).

27 Pathogenic and clinical sings succeeding fasciolosis vary in many aspects and factors such as
28 the parasite load, the age of the host, the developmental phase of the parasite, the pasturage
29 location and condition, and the seasonality. Migratory juvenile parasites in hepatic
30 parenchyma can be observed in the acute phase of fasciolosis, since the presence of adult
31 parasite inside the biliary ducts can be observed in the chronic phase (BORAY, 1969).

32 According to *Leitão* (1980), the most common form of fasciolosis is the progressive biliary
33 cirrhosis with distension and thickening of the biliary ducts, fibrosis and calcification,
34 developing edema, digestive disorders, emaciation and weakness.

35 Bostelmann et al. (2000) through histological study of bovine livers found the expansion of
36 biliary ducts with wall fibrosis and the presence of adult parasite sections, calcification of the
37 walls of the ducts, cellular debris in the lumen, irregular acinar formation disposed in the
38 medial third of the wall, eosinophilic, lymphocytic and plamocytic infiltration, and the
39 presence of macrophages. The ductal epithelium has presented areas of necrosis. Rare
40 Neutrophylcal and lymphoplasmacytic infiltration, yonder duct hyperplasia at the portal
41 space and fibrotic proliferation tissue were found at the outer third of the walls of the ducts.

42 Marcos et al. (2007) studied a phase of bovine hepatic fibrosis. However, no literature has
43 pointed any specific report classifying the hepatic injuries in chronic fasciolosis. Therefore,
44 this work had as aim the proposal of a histopathological classification of bovine hepatic
45 lesions caused by chronic fasciolosis.

46

47 **MATERIAL AND METHODS**

48 Fifty bovine livers convicted of fasciolosis in the slaughterhouse of *Atílio Vivacqua*, Espírito
49 Santo, Brazil, were used. The animals were sacrificed under the inspection of the *Instituto de*

50 *Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo* (IDAF-ES, Agricultural and Forestry
51 Defence Institute of Espírito Santo State, Brazil), and the livers were macroscopically
52 observed for the presence of *Fasciola hepatica*.

53 One fragment of each hepatic lobe, right and left, of each liver was sampled. The samples
54 were packed in bottles that contained 10% formalin (9:1) properly identified to be taken to the
55 Histopathology Laboratory of Animal Pathology Service of the Veterinary Hospital at the
56 Agricultural Science Centre of the Espírito Santo Federal University (HOVET/CCA-UFES)
57 for histopathological evaluation.

58 The sample of each hepatic lobe underwent histotechnical processing through paraffin
59 inclusion, confection of histological slide stained in hematoxylin-eosin (HE) and Masson's
60 trichrome for the evaluation of morphological alterations, considering different levels of
61 inflammatory variants and fibrotic lesions: biliary ducts proliferation in the portal space,
62 inflammatory infiltration, the presence of eosinophiles, vascular sclerosis, area of necrosis,
63 acinar formation, hepatic degeneration and atrophy, portal space fibrosis and diffuse fibrosis.
64 The samples were also evaluated as to the presence or absence of the alterations above
65 mentioned, and its intensity (discrete=+, moderate=++, severe=+++).

66 A pattern according to the evolution of the level of the injuries, from I to III, was established
67 for the histopathological classification of chronic injury. The level I presented prevailed
68 discrete injuries; the level II showed moderate injuries, the level III presented severe injuries
69 as displayed in the table below (Table 1).

70 The statistical analysis included a descriptive analysis of histopathological findings.

71

72 **RESULTS**

73 The results of the histopathological analysis of the livers chronically affected by *Fasciola* sp.
74 revealed that that 52% of the samples presented lesions into the category II, followed by 36%
75 in category I, and 12% into category I (Table 2).

76 The histological sections of different classifications are demonstrated in the figures 1, 2, and
77 3.

78 As related to the biliary duct proliferation, 92% of the samples (46 of 50) showed
79 proliferation of biliary canaliculus in this study. However, from these 46 samples, 24 of them
80 (52.17%) presented only two or three canaliculi, and 47.83% (22 samples) presented more
81 than four canaliculi into proliferation.

82 As to inflammatory infiltration, it was observed the presence of mononuclear infiltration in 49
83 evaluated samples (98%), distinguished in discrete, moderate or severe intensities. The
84 discrete infiltration prevails in 51% of the samples (25), followed by moderate in 34.7% (17
85 samples) and 14.3% of the samples (7) with severe infiltration.

86 The presence and intensity of eosinophilis was also evaluated and their absence was found in
87 seven samples (14%). However, in all of 43 samples the eosinophilic presence was noticed,
88 60.5% (26 samples) presented discrete infiltration, 20.9% (nine samples) showed moderate
89 and 16.6% (eight samples) presented severe infiltration.

90 Necrosis areas were present in only two samples, corresponding to 4% of the total. Acinar
91 formations were observed in four samples (8%). Hepatic atrophy was not observed, however
92 hepatic degeneration was present in 10% of the evaluated samples.

93 Discrete arteriosclerosis was found in 19 samples (37.9%), moderate, in 24 samples (47.4%)
94 and severe, in seven samples (14.7%).

95 Periportal fibrosis was present in all of evaluated samples, in both lobes. Fibrosis of either one
96 or two layers were found in six (11.83%) of the samples observed, fibrosis presenting from
97 three to five layers were found in 28 samples (55.91%), and 16 samples presented fibrosis of

98 six or more layers (32.26%). Periductal fibrosis was evaluated when the ducts presented their
99 calibre varied from intermediate to great. No duct of great calibre was found in 10 evaluated
100 samples (20%). Only one sample (2.5%) showed periductal fibrosis with one or two layers of
101 fibrotic tissue, 21 samples (52.5%) had from three to five layers, and 18 samples (45%) had
102 more than six layers. The distribution of fibrosis in the hepatic parenchyma was also
103 evaluated. Ten percent of the samples showed absence of fibrosis in the parenchyma. Discrete
104 diffuse fibrosis was noticed in 13 samples (28.88%), moderate fibrosis in 16 samples
105 (35.56%) and severe fibrosis in 16 samples (35.56%). Slight periductal fibrosis was present in
106 75% of the samples, and moderate in 25%, with diffuse fibrosis being present in all samples.
107 The distribution of fibrotic and inflammatory injuries were studied with regard to the hepatic
108 lobes, being noticed a frequency of 82% (41 samples) in the left lobe and 18% (nine samples)
109 in the right lobe.

110

111 **DISCUSSION**

112 It was observed the presence of the adult parasite in the biliary ducts, thickening of duct walls
113 with proliferation and calcification in all samples, meaning a chronic infection according to
114 Queiroz (2005). However, since the origin of the samples was the slaughterhouse, the time of
115 infection by the parasite was not determined.

116 Until the present time, no chronic injury classification proposal has been presented. It is
117 important to emphasize that the classification of the variations are related to the level of
118 damage of the liver due to the fasciolosis. Therefore, in recent infection, many decisive
119 variants to the classification may not be present, oppositely to chronic infections, which may
120 lead to a major injury to the liver. Moreover, it is important to be aware of reinfections
121 subjected to animals, which may change the injury schedule previously found.

122 Molina (2005), while studying the host-parasite relationship in bovine and bubaline, found
123 hyperplasia of the biliary ducts from week 12 to 16 post-infection by metacercarial of
124 *Fasciola gigantica* (the end of experimentation was at 16th week). Ross et al. (1966) reported
125 that the hyperplasia of the biliary ducts in bovine is more evident from week 8 on *post-*
126 *infection*.

127 Bostelmann et al. (2000) evaluated bovine liver samples convicted of fasciolosis from a
128 slaughterhouse in Parana State, Brazil and found a moderate hyperplasia of the biliary ducts in
129 all the evaluated samples (four at total). Marcos et al. (2007) analyzed samples of bovine
130 livers convicted of fasciolosis, and found a proliferation of the biliary ducts in all the
131 evaluated samples, 37% discrete, 47% moderate and 13% with severe intensity. As the aim of
132 this study was the proposal of the classification of chronic injuries, the biliary ducts
133 proliferation was quantified in each portal space, not being considered an intensity parameter
134 of ductal proliferation. The most prevailing alteration in chronicle fasciolosis is the
135 hyperplasia of the biliary ducts in the portal space according to Sadjjadi et al. (1997).

136 Bostelmann et al. (2000) evaluated the inflammatory infiltration in bovine livers infected by
137 *Fasciola hepatica* and found lymphocytes, plasmocytes, eosinophils, and mastocytes
138 distributed in the medial third of the most calibre ductal wall, besides lymphoplasmacytic and
139 neutrophilic infiltration in the outer third of ductal wall. The lymphoplasmacytic infiltration
140 was moderate. In our study, the discrete infiltration prevailed. As related by Marcos et al.
141 (2007), the highest frequency found was moderate infiltration. The intensities are attributed
142 by the observers, what explains the differences between the literature and our results.

143 According to Ross et al. (1966) the prevalence of cells as lymphocytes and plasmocytes with
144 less amount of neutrophils and eosinophils at the portal space characterizes a seven to 11
145 weeks *post-infection* period. Molina (2005) found periportal lymphocytic infiltration by
146 *Fasciola gigantica* on the 7th week *post-infection*, described as discrete infiltration. However,

147 from 12th to 16th week, the inflammatory infiltration was described as severe – characterized
148 by lymphocytes, macrophages and plasmatic cells. The presence, the intensity and the
149 characterization of inflammatory cells contribute to the classification process, as far as it can
150 indicate the schedule of infection by the parasite.

151 Bostelmann et al. (2000) also found discrete infiltration of eosinophils in bovine livers with
152 *Fasciola sp.* However, Marcos et al. (2007) related moderate eosinophilic infiltration in theirs
153 samples.

154 Molina (2005) described discrete focal necrosis with eosinophils, lymphocytes and
155 macrophages presence until seventh week, becoming severe after the 12th week. Evaluated
156 samples of Bostelmann et al. (2000) revealed necrosis areas and acinar formation in 100% of
157 the analyzed livers. However, the low frequency found in our research must be related to the
158 sampling site as well as its size and quantity (only one sample per hepatic lobe).

159 Bostelmann et l. (2000) did not find vascular alterations in bovine livers convicted of
160 fasciolosis, not corroborating with the results of this study. Trivilin et al. (2008) found
161 discrete and severe vascular injuries in the left lobe and absence of injury in the right lobe of
162 bovine livers.

163 Bostelmann et al. (2000) found severe periportal fibrosis in 50% of the evaluated samples,
164 25% of moderate fibrosis and 25% of discrete fibrosis. Slight periductal fibrosis was present
165 in 75% of the samples and moderate in 25%, with diffuse fibrosis being present in all
166 samples. Marcos et al. (2007) found 13% of discrete, 27% of moderate and 33% of severe
167 periductal fibrosis in bovine livers chronically infected by *Fasciola hepatica*. In a study with
168 convicted bovine livers from slaughterhouse, Trivilin et al. (2008) observed discrete
169 periductal and periportal fibrosis in the right lobe and discrete or moderate fibrosis in the left
170 one. According to Echevarria (2004), there is collagen deposition around migratory tunnels of

171 the juvenile forms of *Fasciola sp.* nearly six weeks *post*-infection, producing tissue scars
172 adhered to portal system, hepatic capsules and veins.

173

174 **CONCLUSION**

175 The morphologic alterations suggested for the classification were important and adequate to
176 classify the evaluated samples.

177 The proposal of the histopathological classification of bovine hepatic lesions by chronic
178 fasciolosis showed to be a valuable methodology of microscopic evaluation since it allows the
179 establishment of the evolutionary schedule of the illness. However, as the samples came from
180 a slaughterhouse, it was not possible to establish the period of the infection of the parasite.

181 Thereafter, new studies must be performed considering the control of the infection in weeks
182 for the employment of the histopathological classification.

183

184 **ACKNOWLEDGMENT**

185 *Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Espírito Santo*, Brazil (FAPES, Research
186 Support Foundation of the Espírito Santo State) for the financial support in the researches
187 with *Fasciola hepatica*.

188

189 **REFERENCES**

190 BORAY, JC, 1969. Experimental fascioliasis in Australia. **Advanced Parasitology**. 7, 95-
191 210.

192 BOSTELMANN, SCW; LUZ, E; THOMAZ SOCCOL, V; CIRIO, SM, 2000. Histopatologia
193 comparativa em fígados de bovinos, bubalinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*.

194 **Archives of Veterinary Science**, 5, 95-100.

195 ECHEVARRIA, F, 2004. Fasciolose. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária,
196 13., Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, 1., Ouro Preto. **Revista Brasileira de**
197 **Parasitologia Veterinária**, 13 (1), 2004.

198 LEITÃO, JS, 1980. **Parasitologia Veterinária**, Fundação Caloute Gulbenkian, Lisboa, II, 3
199 ed., 18-24.

200 MARCOS, LA; YI, P; MACHICADO, A; ANDRADE, R; SAMALVIDES, F; SÁNCHEZ, J;
201 TERASHIMA, A, 2007. Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle. **Journal of**
202 **Helminthology**, 81, 381–386.

203 MOLINA, EC, 2005. Comparison of host-parasite relationships of *Fasciola gigantica*
204 infection in cattle (*Bos indicus*) and swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). Thesis (Doctor of
205 Philosophy) – School of Tropical Veterinary and Biomedical Sciences, James Cook
206 University.

207 QUEIROZ, VS, 2005. Enzimoimunoensaio (ELISA), imunoelectrotransferência (EITB) e
208 cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), como ferramentas para diagnóstico de
209 fasciolose hepática em bubalinos (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758). Tese (Doutorado em
210 Saúde Animal e Humana) - Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos Setor de
211 Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Paraná.

212 ROSS, JC; TODD, JR; DOW, C, 1966. Single experimental infections of calves with the liver
213 fluke, *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). **Journal of Comparative Pathology**. 76, 67-81.

214 SADJJADI, SM; TAKI, TM; ORYAN, A, 1997. Quantitative histopathology of liver and
215 portal lymphnode in chronic bovine fascioliasis. **Indian Journal of Animal Sciences**, 67 (4),
216 270-274.

217 TRIVILIN, LO; CARNEIRO, MB; BERNARDO, CC; SILVEIRA, TL; REIS, DR; NUNES,
218 LC; MARTINS, IVF, 2008. Avaliação microscópica comparativa de fígados de bovinos e
219 ovinos infectados por *Fasciola hepatica*: estudos preliminares. In: Congresso Brasileiro de
220 Parasitologia Veterinária, 15.; Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul,
221 2., , Curitiba. **Anais...** Curitiba: CBPV, 2008. 1 CD. Resumos_Apresentação ORAL.doc.

222 WHO: Study group on the control of foodborne trematode infections. Control of foodborne
223 trematode infections: report of a WHO study group. **Report Technical Series**, Geneva, 1995.
224 Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_849_\(part1\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_849_(part1).pdf)>. Acesso em:
225 Maio, 2009.

226

227 Table 1: Morphological standards of injuries evaluation by histopathologic classification of
 228 bovine livers chronicle infected by *Fasciola hepatica*.

Chronic injury classification	Morphological findings
Degree I	Periportal fibrosis (absent or until 5 layers) Absent to small quantity diffuse fibrosis Biliary ducts' hyperplasia in portal space (absent or from 2 to 3 layers) Mononuclear inflammatory infiltration absent or discrete (associated or not to eosinophyles) Absence or presence of arteriosclerosis
Degree II	Periportal fibrosis (until 6 layers) Periductal fibrosis (if present/until 6 layers) Diffuse fibrosis discrete to moderate Biliary ducts' hyperplasia in portal space (until 4 layers) Discrete to moderate mononuclear inflammatory infiltration diffuse associated to eosinophyles Presence of arteriosclerosis
Degree III	Periportal fibrosis (> 6 layers) Periductal fibrosis (if present/> 6 layers) Diffuse fibrosis moderate to severe Biliary ducts' hyperplasia in portal space (> 4 layers) Severe mononuclear inflammatory infiltration diffuse Acinar formation in main ducts (when present) Hepatic atrophy and/or degeneration (Present or ausence) Presence of arteriosclerosis

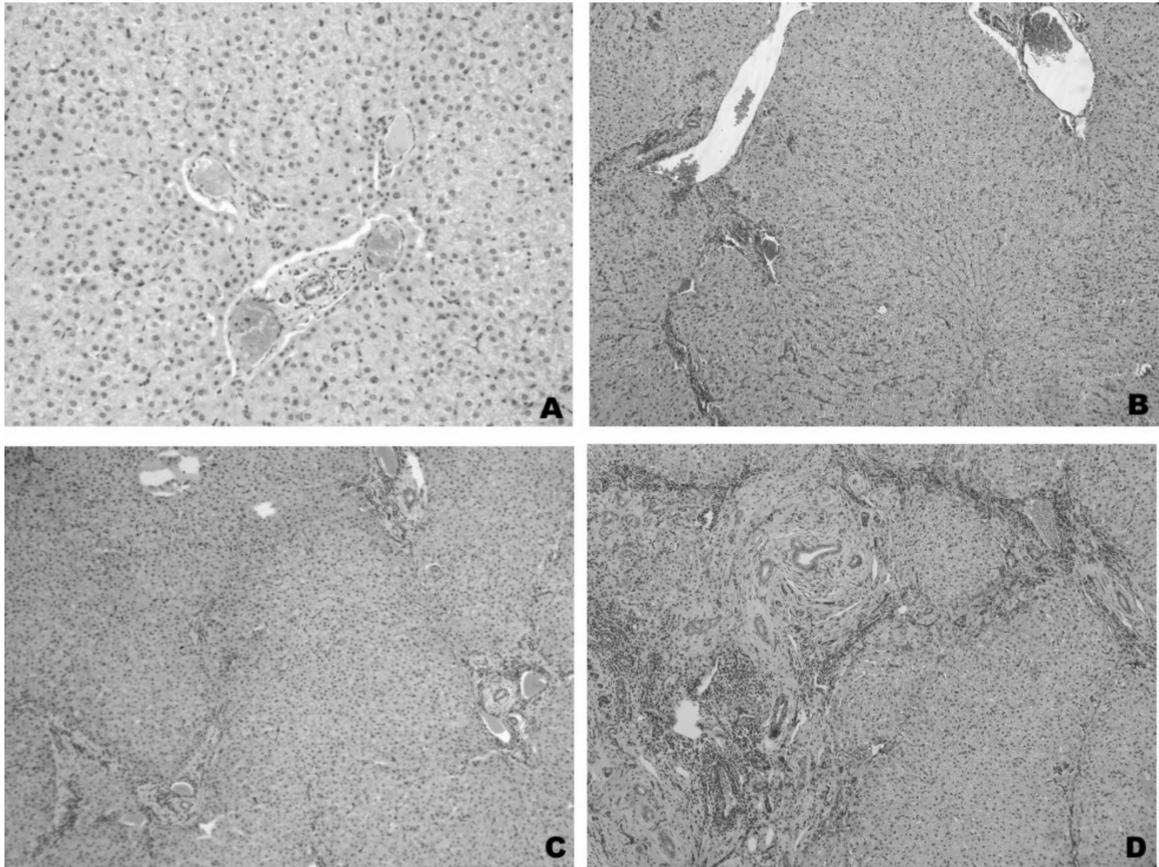
229

230

231 Table 2 – Absolute values and frequency of hepatic injuries by *Fasciola*'s chronic infection
232 after histopathological classification.

233

	ABSOLUTE VALUES	FREQUENCY (%)
DEGREE I	<i>18</i>	<i>36</i>
DEGREE II	<i>26</i>	<i>52</i>
DEGREE III	<i>06</i>	<i>12</i>
TOTAL	50	100



234

235 Fig. 1 – Photomicrography of bovine liver in histologic sections. **A** – Normal liver (HE,
236 objective 20x); **B** – Chronic infected liver by *Fasciola hepatica*, degree I (HE, objective 20x),
237 **C** – Chronic infected liver by *Fasciola hepatica*, degree II (HE, objective 20x), **D** – Chronic
238 infected liver by *Fasciola hepatica*, degree III (HE, objective 20x).