

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

DYEIME RIBEIRO DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO DO IMUNOFENÓTIPO DAS CÉLULAS ENVOLVIDAS NO
PROCESSO FIBRÓTICO DE FÍGADOS BOVINOS CRONICAMENTE
INFECTADOS POR *Fasciola hepatica***

ALEGRE – ES

2014

DYEIME RIBEIRO DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO DO IMUNOFENÓTIPO DAS CÉLULAS ENVOLVIDAS NO
PROCESSO FIBRÓTICO DE FÍGADOS 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 em Diagnóstico e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas. Orientadora: Profa. Dra. Louisiane de Carvalho Nunes

ALEGRE – ES

2014

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

S725c Sousa, Dyeime Ribeiro de, 1984-
Caracterização do imunofenótipo das células envolvidas no processo fibrótico de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* / Dyeime Ribeiro de Sousa. – 2014.
93 f.: il.

Orientador: Louisiane de Carvalho Nunes.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Bovino – doenças. 2. *Fasciola hepatica*. 3. Fibrogênese. 4. Imunoistoquímica. I. Nunes, Louisiane de Carvalho. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 619

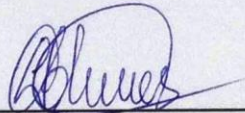
DYEIME RIBEIRO DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO DO IMUNOFENÓTIPO DAS CÉLULAS ENVOLVIDAS NO
PROCESSO FIBRÓTICO DE FÍGADOS BOVINOS CRONICAMENTE
INFECTADOS POR *Fasciola hepatica***

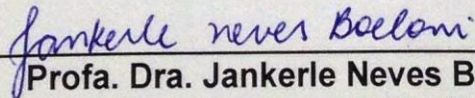
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas.

Aprovada em 21 de fevereiro 2014.

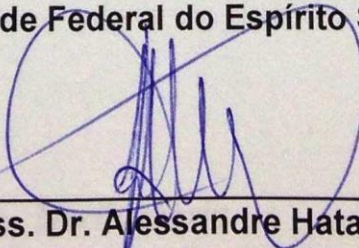
COMISSÃO EXAMINADORA:



Profa. Dra. Louisiane de Carvalho Nunes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



Profa. Dra. Jankerle Neves Boeloni
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Ass. Dr. Alexandre Hataka
Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha filha, que reforçou a importância do meu caminhar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser presente em todos os momentos de minha vida.

À minha filha, Marília Sousa Azêvedo, por ser à luz, por ser minha força e por ser minha inspiração de vida.

Aos meus pais Francisco das Chagas Alves de Sousa e Rosilene Ribeiro pelo apoio, carinho e dedicação.

Aos meus irmãos Dyeine Agnis Ribeiro de Sousa, Iguaracy Pinheiro de Sousa e Paraguacy Pinheiro de Sousa pelo apoio e por acreditarem em mim.

Ao meu sobrinho Kaike de Sousa Corrêa por ser uma benção em minha vida.

À Eunice Santos e família, pelo apoio e carinho dedicado a minha filha, sem vocês nada disso seria possível.

À minha orientadora Professora Doutora Louisiane de Carvalho Nunes pela orientação não apenas na execução desse trabalho e no decorrer do mestrado, mas pelo apoio, estímulo e conhecimento transmitido que foram decisivos na escolha da minha profissão, com seu exemplo de dedicação, profissionalismo e amor pela patologia.

À Professora Doutora Isabella Vilhena Freire Martins pela amizade e confiança depositada.

À Professora Doutora Surama Freitas Zanini pela amizade, incentivos e ensinamentos durante a minha vida acadêmica.

Aos amigos que fiz, e me acompanharam nas diferentes etapas da minha vida, que mesmo distantes me deram força para seguir adiante, em especial Marcella Sant'Anna, Daniele Rodrigues, Huezer Vigâno Sperandio, Maria Aparecida da Silva, Daiene Gonçalves, Leonardo Oliveira Trivilin, Pompeu Paes Guimarães, Rômulo Moura e Barbara Rauta de Avelar.

Aos colegas de laboratório, Antônio Calais Junior, Anderson Barros Archanjo, Thaís Sarandy e Fabiana Bravo Amaral, pela ajuda e companhia durante a pesquisa.

À professora Doutora Ana Paula Madureira pelo apoio com a estatística.

À Pós-Graduação em Ciências Veterinária e a UFES por ter me proporcionado essa experiência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pela bolsa concedida.

A todos, meus sinceros agradecimentos. Muito Obrigada!

*“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos
é um oceano”.*

Issac Newton

RESUMO

SOUSA, DYEIME RIBEIRO. **CARACTERIZAÇÃO DO IMUNOFENÓTIPO DAS CÉLULAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO FIBRÓTICO DE FÍGADOS BOVINOS CRONICAMENTE INFECTADOS POR *Fasciola hepatica***. 2014. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2014.

A fasciolose é uma doença causada por um trematódeo *Fasciola* sp. que pode ocasionar fibrose hepática severa. Objetivou-se caracterizar o imunofenótipo das células envolvidas na fibrogênese hepática de bovinos com esta enfermidade. Para isto, 74 fígados bovinos condenados por fasciolose foram coletados para processamento histológico e imunoistoquímico com os anticorpos anti- α -SMA, anti-elastina e anti-ER-TR7. Foi feita a classificação do grau de fibrose seguida pela identificação e quantificação de cada tipo celular no parênquima e nos espaços porta (EP). A análise estatística foi realizada pelo método descritivo e pelo teste de correlação de Spearman. No lobo hepático direito 90,5% (67/74) dos fígados foram classificados como fibrose de grau 1; 8,1% (6/74) como fibrose de grau 2 e 1,4% (01/74) como fibrose de grau 3. No lobo hepático esquerdo, 55,4% (41/74) dos fígados foram classificados como grau 1; 28,4% (21/74) como grau 2 e 16,2% (12/74) como grau 3. Houve associação positiva e significativa ($p=0,41$; $p<0,0001$) entre o grau de fibrose e o lobo hepático, revelando mais fibrose no lobo esquerdo. Observaram-se as células estreladas hepáticas (CEH) distribuídas no parênquima e miofibroblastos (MF) nos EP. Não foram encontrados fibroblastos. A média de CEH foi de 23,9 e houve correlação significativa entre os graus de fibrose ($\rho=-0,44$, $p<0,0001$) e a quantidade de CEH ($\rho=-0,61$, $p<0,0001$) nos lobos hepáticos, direito e esquerdo. Os miofibroblastos (MF) foram encontrados em torno das estruturas portais, vênula, arteríola e ducto biliar e houve correlação positiva e significativa do número de camadas em volta de cada estrutura do EP com o grau de fibrose ($\rho=0,19$, $p<0,0001$), embora, não tenha sido observada influência de qualquer estrutura do EP, em particular, sobre o grau de fibrose hepática ($p>0,05$). Conclui-se que as células CEH e os MF participam da fibrogênese de fígados bovinos com fasciolose crônica.

Palavras-chave: fasciolose, fibrogênese, imunoistoquímica

ABSTRACT

SOUSA, DYEIME RIBEIRO. **IMMUNOPHENOTYPE OF THE CELLS INVOLVED IN THE FIBROTIC PROCESS OF LIVER OF BOVINES CHRONICALLY INFECTED BY *Fasciola hepatica***. 2014. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2014.

The fascioliasis is a disease caused by the parasite *Fasciola hepatica* which can cause severe liver fibrosis. This study aimed to characterize the immunophenotype of cells involved in liver fibrogenesis of cattle with this disease. To this, 74 bovine livers condemned for fascioliasis were collected for histological processing and immunohistochemistry with anti- α -SMA, anti-elastin and anti-ER-TR7 antibodies. Was taken the classification of the degree of fibrosis followed by identification and quantification of each cell type in the parenchyma and portal space. Were used descriptive statistics and Spearman correlation test. In the right lobe of the liver 90.5% (67/74) was classified as fibrosis grade 1, 8.1% (6/74) as fibrosis grade 2 and 1.4% (01/74) as fibrosis grade 3. In the left hepatic lobe, 55.4% (41/74) of livers were classified as grade 1, 28.4% (21/74) as grade 2 and 16.2% (12/74) as grade 3. There were significant positive association ($p = 0.41$, $p < 0.0001$) between the degree of fibrosis and hepatic lobe, revealing more fibrosis in the left lobe. Observed hepatic stellate cell (HSC) distributed in the parenchyma and myofibroblasts (MF) in portal spaces. No fibroblasts were found. The mean of HSC was 23.9 and there was significant correlation between the degree of fibrosis ($\rho = -0.44$, $p < 0.0001$) and the amount of HSC ($\rho = -0.61$, $p < 0.0001$) in the right and left lobes. The MF were found around the portal structures, venules, arterioles and biliar ducts and there was positive and significant correlation between the number of layers around each structure of the EP with the degree of fibrosis ($\rho = 0.19$, $p < 0.0001$), though, has not been influenced by any structure of the portal space, in particular ($p > 0.05$). Concluded that the cells that participate in the fibrogenesis of the bovine livers with chronic fascioliasis are HSC and MF. These cells are involved in hepatic fibrogenesis because they increase in number with the progression of fibrosis.

Palavras-chave: fascioliasis, fibrogenesis, immunohistochemical

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1 – Fotomicrografia de fígado bovino. A) Fígado não condensado por fasciolose no matadouro frigorífico com degeneração moderada e congestão discreta. Hematoxilina e eosina (HE), barra 46,5 µm. B) Tecido conjuntivo ao redor das estruturas do espaço porta (seta) em fígado não condensado por fasciolose no matadouro frigorífico. Tricrômico de Masson, barra 46,5 µm. C) Infiltrado inflamatório discreto na região portal (cabeça de seta) em fígado condensado por fasciolose. Fibrose grau 1. HE, barra 14,5 µm. D) Fibrose portal discreta (seta), grau 1, em fígado condensado por fasciolose. Tricrômico de Masson, barra 14,5 µm.....	37
Figura 2 – Fígado bovino condensado por fasciolose. A) Espaço porta com proliferação de ductos biliares (setas), fibrose grau 2. HE, barra 6,4 µm. B) Tecido conjuntivo (TC) distribuído difusamente, formando septos delgados entorno do espaço porta, na fibrose grau 2. Tricrômico de Masson, barra 46,5 µm. C) Fibrose grau 3 apresentando infiltrado inflamatório (ii) intenso na região do espaço porta. HE, barra 46,5 µm. D) Fibrose grau 3, revelando tecido conjuntivo (TC) em ponte, unindo um espaço porta a outro (cabeça da seta). Tricrômico de Masson, barra 46,5 µm.....	38
Figura 3 – Valores percentuais de fígados bovinos infectados por <i>F. hepatica</i> de acordo com a classificação do grau de fibrose em cada lobo hepático.....	39
Figura 4 – Imunoistoquímica de fígado bovino condensado por fasciolose. A) Miofibroblastos em torno de arteríolas (a), vênulas (v) e ductos biliares (DB), imunomarcados com o anticorpo α-SMA, barra 14,5 µm. B) Região de espaço porta com arteríola (a),	

- vênula (v) e ducto biliar (DB) com ausência de imunarcação para fibroblasto. Anticorpo ER-TE7, barra 14,5 μm . C) Células estreladas hepáticas α -SMA positivas (setas) com predominante distribuição no parênquima, fibrose grau 1. Barra 6,4 μm . D) Miofibroblastos imunomarcados com elastina em torno de vênulas (v) e arteríolas (a) e ductos biliares (DB). Anticorpo anti-Elastina, barra 14,5 μm 42
- Figura 5 - Fígado bovino condenado por fasciolose, imunomarcado com anticorpo anti-elastina. A) Miofibroblastos na região de espaço porta (seta). Fibrose grau 1. Barra 46,5 μm . B) Miofibroblastos em torno de arteríola (a) e ducto biliar (DB). Fibrose grau 1. Barra 14,5 μm 43
- Figura 6 - Fígado bovino condenado por fasciolose com ausência de imunomarcação em fibroblastos com o anticorpo ER-TE7. A) Região de espaço porta (seta). Fibrose grau 1. Barra 46,5 μm . B) Destaque do espaço porta. Fibrose grau 1. Barra 14,5 μm 45
- Figura 7 - Valores médios de células estreladas hepáticas (CEH) encontradas em fígados bovinos condenados por fasciolose por grau de fibrose e por lobo hepático..... 46
- Figura 8 - Valores médios da quantidade de estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) e do número de camadas de miofibroblastos entorno dessas estruturas por lobo hepático em fígados bovinos infectados por *F. hepatica*..... 48
- Figura 9 - Valores médios do número de estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) encontradas em cada lobo hepático em relação ao grau de fibrose. A) Número de estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) no lobo hepático direito. B) Número de estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) no lobo hepático esquerdo..... 49
- Figura 10 - Valores médios do número de camadas entorno das estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) encontradas em cada lobo

hepático em relação ao grau de fibrose. A) Número de camadas
entorno das estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) no
lobo hepático direito. B) Número de camadas entorno das
estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) no lobo
hepático esquerdo..... 51

LISTA DE SIGLAS

ABCRYS - Receptor de Neurotrofina α - β -cristalina
AP - Arteriola Portal
BDNGF - Fator de Crescimento Derivado do Nervo e Cérebro
CD - Cluster of Differentiation
CEH - Células Estreladas Hepáticas
DB - Ducto biliar
EP- Espaço porta
ER-TE7 - Erasmus University Rotterdam-timo retículo
FB - Fibroblastos
FBP - Fibroblastos Portais
GFAP - Proteína Ácida Fibrilar Glial
HAI - Índice de Atividade Histológica
MEC - Matriz extracelular
MF - Miofibroblastos
MF/IF - Miofibroblastos de Interface
N-CAM - Molécula de Adesão de Células Neurais
NGF - Fator de Crescimento do Nervo
NT-3 - Neurotrofina-3
NT-4 - Neurotrofina-4
NTPD-2 - Nucleosídeo Trifosfato Difosfolidase-2
PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
SBP - Sociedade Brasileira de Patologia
TGF- β 1 - Fator de Crescimento Transformador β 1
Trk-B - Tirosina Quinase C
Trk-C - Tirosina Quinase C
VP - Vênula portal
 α -SMA - Alpha-Actina de Músculo Liso

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Tabela 1 -	Caracterização do imunofenótipo de cada tipo celular envolvido na fibrose hepática em bovinos cronicamente infectados por <i>Fasciola hepatica</i> de acordo com a positividade para cada anticorpo.....	35

LISTA DE QUADRO

Quadro	Página
Quadro 1 - Anticorpos primários, concentrações testadas e utilizadas nas reações imunoistoquímicas das amostras de fígado com fasciolose crônica.....	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Fasciolose	20
2.2 Distribuição e impacto econômico da fasciolose	21
2.3 Características morfológicas e ciclo evolutivo de <i>Fasciola hepatica</i>	22
2.4 Patogenia da fasciolose	23
2.4.1 Fibrose hepática	25
2.4.1.1 Miofibroblastos	27
2.4.1.2 Células estreladas hepáticas (CEH)	27
2.4.1.3 Fibroblastos	27
2.5 Marcadores celulares	31
2.5.1 Alfa-actina de músculo liso (α -SMA)	31
2.5.2 Elastina	32
2.5.3 <i>Erasmus University Rotterdam-timo retículo 7</i> (ER - TR7)	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Coleta e processamento de material	33
3.2 Avaliação histológica	33
3.3 Técnica imunistoquímica	34
3.4 Avaliação imunistoquímica	36
3.5 Análise Estatística	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Avaliação histológica	38
4.2 Avaliação imunistoquímica	42
5 CONCLUSÕES	54
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7 REFERÊNCIAS GERAIS	56
8 APÊNDICE	72

1 INTRODUÇÃO

A fasciolose ou distomatose hepática é uma enfermidade parasitária que têm como agentes etiológicos *Fasciola hepatica* ou *Fasciola gigantica*, que acomete fígado e vias biliares de muitas espécies animais e humanos, e é considerado um problema de saúde pública em muitas regiões tropicais e subtropicais (BOWMAN, 2010; ESPINOZA et al., 2010; MARCOS et al., 2007; TAYLOR; COOP; WALL, 2007). Os animais se infectam com a ingestão da metacercária nas pastagens contaminadas por moluscos que são os hospedeiros intermediários (PARKINSON; O'NEILL; DALTON, 2007).

Os danos causados por essa infecção levam a grandes prejuízos econômicos à pecuária mundial, com perdas anuais superiores a três bilhões de dólares (ESPINOZA et al., 2010), 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 levar os animais a morte (DUTRA et al., 2010; LUZ; QUEIROZ; LEITE, 1996; MAS-COMA; VALERO; BARGUES, 2009; TOSTES et al., 2004).

Essa enfermidade pode se apresentar de forma aguda, causada pela ingestão de um grande número de formas infectantes, ocasionando destruição do parênquima, insuficiência hepática e hemorragia na cavidade peritoneal, ou a forma crônica que é resultado da ação dos trematódeos adultos nos ductos biliares, devido a migração, onde há inflamação, edema e fibrose dos ductos biliares. Além disso, pode haver distensão, espessamento, fibrose e calcificação dos ductos biliares, o que caracteriza a cirrose biliar progressiva (ADRIEN et al., 2013; BOSTELMANN et al., 2000; TESSELE; BRUM; BARROS, 2013).

A fibrose hepática causada por *F. hepatica* coloca essa infecção parasitária no contexto das doenças crônicas do fígado (MARCOS et al., 2011), visto que a fibrose é uma alteração frequente promovida pelo acúmulo progressivo de componentes da matriz extracelular (MEC), resultando em substituição da arquitetura normal do tecido e comprometimento de sua atividade funcional (FRIEDMAN, 2000).

No fígado há vários elementos celulares capazes de sintetizar e depositar componentes da MEC como os fibroblastos portais (FBP), miofibroblastos (MF) dos

vasos, fibroblastos (FB), fibroblastos derivados de medula óssea, hepatócitos, contudo, a ativação das células estreladas hepáticas (CEH) é considerada o evento mais importante na fibrogênese hepática (BATALLER; BRENNER, 2005; FORBES et al., 2004; GUYOT et al., 2006; MAGNESS et al., 2004; RAMADORI; SAILE, 2004; SEGAWA et al., 2002; UCHIO et al., 2002). No entanto, Cassiman e Roskams (2002), relataram que não há evidência clara *in vivo* que as CEH podem ser ativadas ou ainda que as CEH sejam as principais células do fígado produtoras de MEC.

Sabendo disto, Marcos et al. (2011) ainda apontaram que as informações disponíveis sobre a fibrose hepática induzida pela infecção por *F. hepatica* é escassa, tanto em animais quanto em seres humanos, e que a realização de estudos mais aprofundados no controle da infecção, bem como, nos programas de prevenção em áreas endêmicas, serão úteis para limitar a progressão da doença.

Desta forma, objetivou-se caracterizar o imunofenótipo das células que participam da fibrogênese de fígados bovinos frente à infecção por *F. hepatica* buscando obter dados sobre os mecanismos de formação e distribuição da fibrose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fasciolose

A fasciolose ou distomatose hepática é uma enfermidade parasitária que apresenta como agentes etiológicos *Fasciola hepatica* ou *Fasciola gigantica*, que são parasitos pertencentes ao filo Platyhelminthes, a classe Trematoda, à subclasse *Digenea* e à família *Fasciolidae* (URQUHART; ARMOUR; DUNCAN, 1998). *F. hepatica* é encontrada predominantemente em regiões de clima temperado e nas Américas, sendo a única espécie de ocorrência comprovada no Brasil, enquanto a *F. gigantica* se localiza em regiões tropicais da África e Ásia (SERRA-FREIRE, 1995).

São parasitos do parênquima hepático e dos ductos biliares de várias espécies de hospedeiros, entre eles: ruminantes, equídeos, cervos, coelhos, lebres, ratos, suínos, camundongos e humanos (APT et al., 1993; BOWMAN, 2010; ESPINOZA et al., 2010; TAYLOR; COOP; WALL, 2007). A capacidade de infectar e completar seu ciclo em uma variedade de hospedeiros mamíferos contribui para o avanço e o sucesso de disseminação deste parasito (MAS-COMA, 2005).

Essa enfermidade tem grande importância para pecuária brasileira e mundial, devido aos danos causados aos animais e aos produtores, como queda na produção de carne, leite, lã, redução no ganho de peso, comprometimento da fertilidade, atraso no crescimento e elevadas perdas econômicas devido as condenação dos fígados infectados e à mortalidade de animais (ARAÚJO et al., 2007; CHEN et al., 2000; DUTRA et al., 2010).

Além disso, a fasciolose é considerada pela Organização Mundial da Saúde uma zoonose tropical emergente e negligenciada (ROBERT; TOLAN, 2011; WHO, 2006), com importância na saúde pública (SERRA-FREIRE, 1999), em razão dos números crescentes de casos de fasciolose humana, sendo correlacionados a regiões endêmicas para fasciolose em animal (ESPINOZA et al., 2010; MAS-COMA, 2005; MAS-COMA; BARGUES; ESTEBAN, 1999; ROBINSON; DALTON, 2009).

A ocorrência de *F. hepatica* está relacionada a fatores como, presença do hospedeiro intermediário, moluscos do gênero *Lymnaea*, disponibilidade de habitats adequados para a sobrevivência dos moluscos e condições de temperatura e umidade favoráveis. A presença do hospedeiro definitivo eliminando ovos e

contaminando as pastagens, constituem aspectos importantes para a epidemiologia e controle da fasciolose (ALVES et al., 2011; SERRA-FREIRE, 1995).

2.2 Distribuição e impacto econômico da fasciolose

Estudos sobre a prevalência da fasciolose demonstram que *Fasciola sp.* possui uma ampla distribuição geográfica, sendo reportada nos cinco continentes (MAS-COMA; VALERO; BARGUES, 2009).

Por meio de diferentes técnicas de diagnósticos, as prevalências da fasciolose em bovinos têm sido relatadas em vários países como Chile (94%), Vietnã (78,3%), Flórida (68%), Estados Unidos (52,7%), Irlanda (45%), Espanha (29,5%), Turquia (29,3%), Peru (29%), Zâmbia (19,46%), Alemanha (10,7%), Marrocos (10,4%), Camboja (10%) e Nova Zelândia (8,5%) (ANDERSON et al., 1999; TORGERSON; CLAXTON, 1999; TUM et al., 2007; YABE et al., 2008).

Rubel et al. (2005), analisando amostras de fezes de ovinos, caprinos e bovinos da Argentina, observaram que 100% dos caprinos, 82% dos ovinos e 86% dos bovinos estavam infectados, enquanto Issia et al. (2009) encontraram em 100% dos ovinos e 84% dos caprinos. No Brasil, dados semelhantes foram observados por Lima et al. (2009) e Oliveira et al. (2008) que constataram a presença dos ovos de *F. hepatica* em 100% dos ovinos, 81% dos caprinos e 70% em bovinos.

A prevalência de condenações de fígados por fasciolose, em matadouros frigoríficos, tem sido descritas em várias partes do mundo. Na África essas variam de 9,1% a 27% em bovinos e 8,5% a 18,2% em ovinos (MEKROUD et al., 2004), na China é de 28,5% em fígados ovinos (WANG et al., 2006) e na Suíça é de 63,2% em fígados bovinos (RAPSCH et al., 2006). No Brasil, as maiores prevalências de fígados condenados foram relatadas na região Sul do país, sendo entre 10,34% a 18,66% no Rio Grande do Sul, (DUTRA et al., 2009 TIETZ-MARQUES; SCROFERNEKER, 2003), de 10,14% em Santa Catarina (DUTRA et al., 2009) e de 61,6% no Paraná (GAVINHO; KULEK; MOLENTO, 2008).

De acordo com Serra-Freire (1995), os casos de fasciolose foram descritos em todos os estados do sul e sudeste do Brasil, exceto para o Espírito Santo. No entanto os primeiros registros de prevalência de fígados com esta enfermidade no sul do Espírito Santo datam de 2005 (FRAGA, 2008). A tendência da fasciolose no

estado tem sido crescente, de 15,24% em 2006, 23,93% em 2007, 28,57% até novembro de 2008 e de 27,07% no início de 2009 (BERNARDO et al., 2011; VIERA et al., 2011). Atualmente a prevalência atinge 33,00% (dados ainda não publicados). Com perdas econômicas de \$381.875 dólares, entre os anos de 2006 e 2009.

Estimativas econômicas sugerem perdas anuais superiores a três bilhões de dólares, pois mais de 300 milhões de bovinos e 250 milhões de ovinos do mundo estão em áreas endêmicas para *Fasciola sp.* (ESPINOZA et al., 2010; MAS-COMA; VALERO; BARGUES, 2009; OLAECHEA, 2004).

2.3 Características morfológicas e ciclo evolutivo de *Fasciola hepatica*

Fasciola hepatica se caracteriza morfológicamente por apresentar o corpo deprimido dorso-ventralmente em forma de folha, quando adulto mede cerca de 3 cm de comprimento por 1,5 cm de largura, apresenta duas ventosas (oral e acetabular), um cone cefálico e são hermafroditas. Os ovos medem cerca de 140µm de comprimento por 80µm de largura, são elípticos e revestidos por uma concha delgada, a qual apresenta um opérculo na extremidade (URQUHART; ARMOUR; DUNCAN, 1998).

O ciclo biológico da *Fasciola sp.* inicia-se com os ovos sendo eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos, uma vez em ambientes alagados, estes eclodem e originam a larva piriforme ciliada, denominada miracídio, que infectam os hospedeiros intermediários, moluscos do gênero *Lymnaea*. Dentro do molusco a larva evolui para esporocisto, rédia e cercária. No ambiente aquático, as cercárias nadam ativamente e se fixam a um substrato onde perdem a cauda e se encistam, originando as metacercárias que são as formas infectantes. O período da penetração do miracídio até a formação de metacercárias infectantes varia de 45 a 60 dias, dependendo das condições ambientais favoráveis de temperatura e umidade (ECHEVARRIA, 2004; SILVA et al., 1980; URQUHART; ARMOUR; DUNCAN, 1998).

As metacercárias ingeridas pelo hospedeiro definitivo desencistam no intestino delgado, migram através da parede intestinal para cavidade peritoneal e penetram no fígado pela cápsula de Glisson, migram no parênquima até atingirem os ductos biliares onde os exemplares adultos ovipoem. Os ovos são liberados junto

com a bile nas fezes (FARINAZZO; IGREJA; HUGGINS, 2001). O período pré-patente dura aproximadamente dois meses, mas nem todos os parasitos alcançam a maturidade ao mesmo tempo (SOULSBY, 1982).

2.4 Patogenia da fasciolose

A patogenia da fasciolose está relacionada com a quantidade de metacercárias ingeridas e com o tempo que o parasito se mantém no organismo do hospedeiro. Após ingestão das metacercárias ocorre liberação das formas imaturas no intestino delgado, causando corrosões e destruição da camada serosa intestinal. Ao alcançarem o fígado os parasitos jovens continuam sua migração pelo parênquima hepático, provocando hemorragias e áreas de necrose, até penetrarem nos ductos biliares onde permanecem, alimentando-se de sangue e ocasionando extensas áreas de erosão, necrose e inflamação na mucosa ductal (BECK, 1993; BERNE, 1994; SILVA et al., 1980).

Essa enfermidade pode apresentar-se na forma aguda, quando à ingestão de grande quantidade de metacercárias em curto período de tempo e, os sintomas são decorrentes da migração maciça das larvas imaturas do intestino para o parênquima hepático. Sendo eles: diarreia, febre, anemia, mucosas pálidas, dispneia, hepatomegalia e ascite (ADRIEN et al., 2013; SOULSBY, 1987; URQUHART; ARMOUR; DUNCAN, 1998), essa forma raramente é observada em bovinos, sendo mais comum em ovinos (RADOSTISTS et al., 2000).

A fasciolose crônica a forma crônica ocorre em animais que ingerem poucas metacercárias durante longo período de tempo (OAKLEY; OWEN; KNAPP, 1979). Pois, as metacercárias atingem os ductos biliares, causam colangite e fibrose dos ductos biliares, além de inflamação e edema no parênquima (URQUHART; ARMOUR; DUNCAN, 1998). Os sintomas observados são inespecíficos como: anemia, perda de peso, queda na produção e infertilidade, mas devido a fibrose há condenação do fígado ao abate (CHARLIER et al., 2009; FOREYT, 2005; PRITCHARD et al., 2005).

Na forma aguda observa-se fígado dilatado, cápsula espessada com fibrina aderida, ao corte observa-se focos hemorrágicos difusos e parasitos jovens (CARLTON; McGAVIN, 1998; RIET-CORREA et al., 2001). Microscopicamente,

observam-se áreas de necrose de coagulação, focos de hemorragia acentuada e desorganização do parênquima com acentuada infiltração de neutrófilos e eosinófilos, além de fibrose e hiperplasia dos ductos biliares. As formas imaturas de *F. hepatica* são observadas no parênquima rodeadas por hepatócitos em degeneração, neutrófilos, eosinófilos e hemorragia (ADRIEN et al., 2013; BORDIN, 1995; KEEGAN; TRUDGETT, 1992).

Na fase crônica da fasciolose observam-se palidez hepática, atrofia do parênquima, fibrose e calcificação do revestimento interno dos ductos biliares e em alguns casos, no interior dos ductos afetados, observa-se exsudato marrom-escuro viscoso, formado por flocos de bile, células epiteliais de revestimento ductal descamadas, fragmentos e ovos, além de exemplares de *F. hepatica* em meio ao exsudato (RIET-CORREA et al., 2001; TESSELE; BRUM; BARROS, 2013).

Em amostras histológicas de fígados infectados por *Fasciola* sp., pode-se observar, colângio-hepatite acentuada (MARCOS et al., 2007; TESSELE; BRUM; BARROS, 2013), espessamento e calcificação dos ductos biliares, proliferação e hiperplasia de ductos biliares, formações acinares irregulares, cortes do parasito adulto, detritos celulares, áreas de necrose, além de infiltrado inflamatório mononuclear, arteriosclerose e fibrose periportal (BOSTELMANN et al., 2000; GOLBAR et al., 2013; MOLINA, 2005; PÉREZ et al., 2002; TESSELE; BRUM; BARROS, 2013; TRIVLIN et al., 2013).

Bostelmann et al. (2000) verificaram que na fasciolose em bovinos, os tipos celulares predominantes nos espaços porta são linfócitos e plasmócitos. Trivilin et al. (2013) encontraram dados semelhantes. Molina e Skerratt (2005) relataram que em bovinos o número de linfócitos T foi alto na terceira semana pós-infecção, porém, declinou após a sexta semana. 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 entanto, a habilidade do parasito em diminuir a resposta imune do hospedeiro pode induzir doença crônica. Além disso, a presença no local da infecção se torna um estímulo antigênico constante (GOMEZ-MUNOZ et al., 2004).

Na fasciolose citam a catepsina L, enzima proteolítica da classe cisteíno-protease conhecida como Fas2, secretada pela *Fasciola* spp., como responsável pela patogenicidade (MARCOS et al., 2011; TIMOTEO et al., 2005). Esta proteína age facilitando a migração do parasito pelo intestino e fígado do hospedeiro, pois

atua clivando proteínas da matriz intersticial, tais como fibronectina, laminina e colágeno, além de ser implicada na inativação da defesa imune do hospedeiro por clivar imunoglobulinas (BERASAIN et al., 1997; LOWTHER et al., 2009; PROWSE et al., 2002; ROBINSON et al., 2008; STACK et al., 2008).

2.4.1 Fibrose hepática

Os mecanismos que regulam a fibrose em diferentes órgãos e tecidos são semelhantes e possuem características comuns, como o acúmulo progressivo de tecido conjuntivo e deposição excessiva de componentes da MEC, resultando em substituição da arquitetura normal do tecido e comprometimento de sua atividade funcional (FRIEDMAN, 2000).

No fígado vários elementos celulares são capazes de sintetizar e depositar componentes da MEC por um processo de ativação e/ou transdiferenciação dos fibroblastos portais (FBP), dos miofibroblastos (MF) dos vasos, hepatócitos, fibroblastos (FB) derivados da medula óssea e células estreladas hepáticas (CEH) que é considerado o evento mais importante na fibrogênese hepática (FORBES et al., 2004; FORBES; PAROLA, 2011; GUYOT et al., 2006; MAGNESS et al., 2004; RAMADORI; SAILE, 2004; SEGAWA et al., 2002; UCHIO et al., 2002).

A fibrose hepática é uma resposta cicatricial a lesões repetidas no fígado, visto que os hepatócitos tem capacidade de se regenerar e substituir as células necróticas ou apoptóticas após uma lesão aguda. No entanto, se a lesão persistir e a regeneração do fígado falhar, os hepatócitos são substituídos por componentes da MEC como colágeno (I, III, e IV), fibronectina, elastina, laminina, ácido hialurônico, proteoglicanos, podendo evoluir até o estágio cirrótico (ARTHUR, 2000; FRIEDMAN, 2003).

Em qualquer doença hepática crônica, a fibrose pode desenvolver e prosseguir para um padrão distinto, que têm relação estreita com a etiologia, com a localização da lesão tecidual e com as diferentes populações de MF (CASSIMAN; ROSKAMS, 2002; PAROLA; MARRA; PINZANI, 2008; PINZANI; ROMBOUITS, 2004).

O padrão de fibrose centrolobular geralmente está associada à insuficiência cardíaca congestiva direita ou a lesão tóxica crônica. Nesses casos a fibrose pode

ocorrer da região centrolobular até os espaços porta e os septos fibróticos formados podem se estender pelo parênquima hepático e atingir outras áreas centrolobulares. As principais células responsáveis pela deposição de MEC são as CEH (BATALLER; BRENNER, 2005; CULLEN; MACLACHLAN, 2001).

Fibrose periportal resulta de lesão inflamatória crônica ou lesão causada por um pequeno grupo de toxinas que afetam os hepatócitos periportais. Na hepatite viral crônica em humanos, a inflamação é predominantemente periportal, causando fibrose periportal ou ainda fibrose em ponte portal-central (FRIEDMAN, 1993; PINZANI; ROMBOOTS, 2004). O termo fibrose em ponte é aplicado quando a fibrose se estende de um espaço porta a outro ou de um espaço porta a uma veia centrolobular (CULLEN; MACLACHLAN, 2001).

Neste tipo de fibrose a ativação crônica é o principal mecanismo patogênico para condução e progressão da fibrose que são sustentadas, por populações hepáticas de MF que se originam principalmente de CEH, mas também a partir de qualquer outro FBP ou FB derivado medula óssea/células-tronco (BATALLER; BRENNER, 2005).

A fibrose portal, também conhecida como fibrose biliar, está associada à inflamação crônica da região portal e em cães ocorre nas hepatites crônicas e em gatos nas colângio-hepatites crônicas (JOHNSON, 1997). Podem ser observadas em doenças colestáticas, nas obstruções biliares e na doença hepática alcoólica (CULLEN; MACLACHLAN, 2001), formando um padrão de fibrose portal-portal, com envolvimento concomitante da proliferação de ductos biliares e FB periductais (KINNMAN; HOUSSET, 2002; PINZANI; ROMBOOTS, 2004).

A proliferação de ductos biliares intra-hepáticos (reação ductular) pode ocorrer após necrose hepática acentuada, ou ainda após obstrução biliar extra-hepática de longa duração (CLOUSTON et al., 2005), casos de hiperplasia nodular focal, de colestase crônica (BEAUSSIER et al., 2007), de cirrose biliar primária e após infecção por *Fasciola hepatica* ou *Schistosoma mansoni* (FABRIS et al., 2007; RICHARDSON et al., 2007; URQUHART et al., 1998; YOSHIOKA et al., 2004).

Na fibrose biliar as CEH não sofrem diferenciação miofibroblástica (BEAUSSIER et al., 2007), sendo assim, os MF podem derivar de fibroblastos periductais e de células de músculo liso vascular que residem nas paredes de veias portas e de artérias portas que são as principais células responsáveis pela MEC (ANDRADE, GUERRET, FERNANDES, 1999; KINNMAN; HOUSSET, 2002).

Conhecer e saber a importância de cada tipo MF pode ajudar a esclarecer o papel desses em cada doença hepática promovida por diferentes agentes, pois, enquanto as CEH são as principais células fibrogênica em áreas pericentrais os miofibroblastos portais podem predominar nas lesões em torno dos espaços porta (BATALLER; BRENNER, 2005).

Assim, Cassiman et al. (2002) identificaram três subpopulações distintas de células mesenquimais responsáveis pela fibrogênese hepática, com localização distinta e fenótipo imunoistoquímico característico: os miofibroblastos claramente derivados de CEH, os miofibroblastos portais/septais postulados por serem derivados de fibroblastos portais e de miofibroblastos de vasos e os miofibroblastos da interface com um fenótipo intermediário e origem obscura.

2.4.1.1 Miofibroblastos

Os miofibroblastos (MF) têm características intermediárias entre o FB e as células musculares lisas, mas contêm maior quantidade de microfilamentos de actina e miosina (STITES; TERR; PARSLOW, 2000). Os fibroblastos são morfologicamente distintos dos miofibroblastos que expressam α -SMA, mas metabolicamente semelhantes, por sintetizarem componentes da MEC (ELBERG et al., 2008; JIROUTOVA et al., 2005).

Os miofibroblastos (MF) são células contráteis altamente proliferativas, que originam-se por um processo de ativação e/ou transdiferenciação das CEH, de FBP, de células dendríticas positivas para CD34, células musculares lisas, pericitos dos vasos sanguíneos, fibrócitos e até mesmo de células epiteliais. Estão presentes em tecidos normais que necessitam de resistência mecânica e sua ativação desempenha um papel chave no desenvolvimento da resposta fibrótica, pois participam da síntese de MEC (FREGNANI et al., 2009; HINZ, 2010; NOVO et al., 2009; TOMASEK et al., 2002; VERED; SHOHATI; DAYAN, 2005).

As células inflamatórias, por meio da liberação de citocinas, podem estimular ou inibir a proliferação, síntese proteica e a movimentação das células responsáveis pela síntese do tecido fibroso. A transdiferenciação dos FB em MF é realizada principalmente pelo fator de crescimento transformador β 1 (TGF- β 1) e o responsável pela maturação é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (BATALLER;

BRENNER, 2005; DOOLEY et al., 2001; FRIEDMAN, 2003; ONORI et al., 2000; SAFADI; FRIEDMAN, 2002; WU; ZERN, 2000).

No fígado, os MF portais/septais podem ser originários de diferentes populações de células precursoras que incluem células da musculatura vascular das paredes de artéria hepática e/ou de veia portal, bem como, de FBP que ficam em volta dos ductos biliares (KINNMAN et al., 2003; LI et al., 2007; UCHIO et al., 2002). São normalmente detectados no tecido conjuntivo expandido em torno do espaço porta (MF portal) ou na parte interna de septos fibróticos (MF septal). Independentemente da sua localização, estas células compartilham um repertório comum de sobreposição antigênica que permite o seu reconhecimento *in vivo*, em humano, que incluem α -SMA, expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), fator derivado de crescimento do nervo do cérebro (BDNGF) e receptor de neurotrofina α - β -cristalina (ABCRYS) (CASSIMAN et al., 2002; NOVO et al., 2009; POONKHUM et al., 2011; POVERO et al., 2010).

Os pericitos, também chamados de células periendothelias, são células que se encontram associadas à microvasos, opostas às células endoteliais. Para ser considerada pericito, essa célula precisa demonstrar ter contato físico com as células endoteliais por meio de junções *gap* e expressarem pelo menos um marcador atribuído à pericitos (α -SMA, nestina) e não expressar marcadores de células endoteliais (CD31) (MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008).

Segundo Fontes et al. (2008) os pericitos da retina apresentavam perfil de expressão gênica similar às células-tronco mesenquimais da medula óssea, da parede da veia umbilical e das células estreladas hepáticas. Portanto, os pericitos localizados dentro da membrana basal dos vasos capilares proliferados, são propensos a se separar e acumular-se dentro dos tecidos lesionados onde sofrem transformação fenotípica em miofibroblastos e participam ativamente da síntese de componentes da MEC (CASSIMAN; ROSKAMS, 2002; LEE et al., 2007; LEMOS; ANDRADE, 2010).

Os miofibroblastos de interface (MF/IF) estão localizados na interface entre o espaço portal e o parênquima, ou na interface entre os septos fibróticos e o parênquima. Essas células podem se originar da ativação/transdiferenciação de células estreladas hepáticas, fibroblastos portais, bem como, de células mesenquimais derivadas da medula óssea/células-tronco (FORBES; PAROLA, 2011; RUSSO et al., 2006; DI BONZO et al., 2008). Em humanos expressam

marcadores como α -SMA, GFAP, BDNF, ABCRYS, bem como o fator de crescimento do nervo (NGF), molécula de adesão de células neurais (N-CAM) e neurotrofina-4 (NT-4) (RAMADORI; SAILE, 2004).

2.4.1.2 Células estreladas hepáticas (CEH)

Células estreladas hepáticas são denominadas de células de Ito, lipócitos ou células perisinusoidais, situadas no espaço de Disse, em contato direto com os hepatócitos e células endoteliais. São células não parenquimatosas, de origem mesenquimal, quiescentes, com três funções fisiológicas principais: armazenamento de gordura e vitamina A, produção de MEC e regulação do fluxo da microcirculação sinusoidal (CARPINO et al., 1981; GEERTS, 2001; GIAMPIERI; JEZEQUEL; ORLANDI, 1981).

Morfologicamente são fusiformes com citoplasma acidófilico, núcleos ovalados ou alongados, com proeminentes processos dendríticos citoplasmáticos, que confere uma forma estrelada (ANDRADE, 2005; FRIEDMAN, 1993; GEERTS, 2001). A microscopia eletrônica revelou que contêm retículo endoplasmático rugoso, extenso feixes de filamentos intermediários, vacúolos, gotículas lipídicas citoplasmáticas, que raramente formam desmossomos ou junções desmossômicas, não têm membrana basal verdadeira e, em condições normais, não contêm lisossomos (CASSIMAN; ROSKAMS, 2002). No fígado normal representam cerca de 15% da população de células hepáticas (MARCOS et al., 2003).

Os miofibroblastos claramente derivados de CEH são células α -SMA positivas encontrados principalmente em torno de capilares sinusoides em fígados fibrótico/cirróticos que, por definição, se originam somente por meio do processo de ativação/transdiferenciação de CEH. Pode ser reconhecido a partir de outro MF por sua positividade para uma lista de marcadores adicionais que inclui neurotrofina-3 (NT-3), tirosina quinase B ou C (Trk - B, Trk -C), sinaptofisina p75, N-CAM, GFAP, desmina e fator de crescimento do receptor do nervo de baixa afinidade. As CEH quiescentes expressam marcadores que são característicos dos adipócitos, SREBP-1c e leptina, enquanto, CEH ativadas expressam α -SMA, c-myb, e miócitos (GEERTS, 2001; SATO; SUZUKI; SENOO, 2003).

2.4.1.3 Fibroblastos

Os fibroblastos (FB) são as principais células envolvidas na cicatrização tecidual e têm por função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo e a síntese dos componentes da MEC, particularmente, das substâncias fundamentais como colágeno, reticulina, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases (HILDEBRAND et al., 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SORRELL, 2004; SORRELL; CAPLAN, 2009).

Morfologicamente os FB apresentam citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso e o aparelho de Golgi desenvolvido, além de prolongamentos citoplasmáticos irregulares com núcleo claro, grande, ovoide, com cromatina fina e nucléolo evidente. Fibrócitos são fibroblastos na forma inativa, são células menores, fusiformes, com citoplasma acidófilo e número de prolongamentos menores que do fibroblasto. Os fibrócitos possuem núcleos pequenos, alongados e mais escuros e, em determinadas condições como a cicatrização, podem reassumir a estrutura de fibroblastos (HEATHCOTE; GRANT, 1981; SORRELL; CAPLAN, 2009).

Durante a formação do tecido de granulação, FB e células endoteliais se movem para o interior da ferida, produzindo MEC e angiogênese (SINGER, CLARK, 1999). Na presença de lesão e durante o crescimento tumoral, os FB são estimulados a produzir fatores de crescimento angiogênicos como, por exemplo, o fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento derivado de plaquetas e o fator transformador de crescimento β 1, que vão atuar sobre as células endoteliais vasculares, subsequentemente estimulando a proliferação, migração e diferenciação para formarem novos vasos sanguíneos (NEWMAN et al., 2011).

Libbrecht et al. (2002) mostraram que durante o desenvolvimento do fígado, o fibroblastos portais são células semelhantes aos precursores das células musculares da parede vascular das artérias e veias portal e por isto expressam elastina. Alguns fibroblastos podem adquirir aspecto morfológico e bioquímico de células musculares lisas sendo conhecidos como miofibroblastos (DESMOULIÉRE et al., 1997).

Os fibroblastos portais e as CEH são células de origens diferentes, mas que convergem para um mesmo tipo celular quando ativados, os miofibroblastos. (UCHIO et al., 2002). Esses FBP foram considerados fonte adicional de MF na

fibrose hepática (ASAHINA et al., 2009; UCHIO et al., 2002) apresentando um fenótipo morfológico e um repertório de antígenos semelhantes aos outros FB que incluem interleucina-6, fibulina-2, elastina, ecto-ATPase e nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-2 (NTPD-2), além de um marcador altamente específico para fibroblastos o ER-TE7, que não são expressos por outros MF e nem por CEH (DRANOFF; WELLS, 2010; GOODPASTER et al., 2008).

2.5 Marcadores celulares

Os marcadores imunistoquímicos são utilizados na identificação e classificação de células específicas dentro de uma população celular morfológica heterogênea ou aparentemente homogênea, no diagnóstico de tumores, na identificação e distinção histológica, bem como na reorganização de subtipos histológicos (CAPELOZZI, 2009).

2.5.1 Alfa-actina de músculo liso (α -SMA)

Alpha-actina de músculo liso (α -SMA) é uma das seis isoformas de actina expressas em tecidos de mamíferos, está localizada dentro dos feixes de microfilamentos dos miofibroblastos e fibroblastos contrácteis (GABBIANI et al., 1981; SCHMITT-GRAFF et al., 1991; SKALLI et al., 1986). A actina é uma proteína globular, dividida em três classes de acordo com seu ponto isoelétrico em: isoforma alfa (α) predominante no interior de músculo liso, isoforma beta (β) e gama (δ) presente em células não-musculares. Os filamentos de actina tem função estrutural de formar parte do citoesqueleto que atuam na regulação do movimento e na forma da célula (DeBIASE et al., 2006; LAMBERT; PERRI; MEEHAN, 2005; LEE et al., 2007).

Há grande interesse no estudo da α -SMA, pois sua expressão é restrita às células musculares lisas, sendo considerado um marcador específico para a diferenciação de músculo liso, em condições normais e patológicas (SKALLI et al., 1986). Essa proteína é expressa pela CEH ativada e é amplamente aceita como marcador confiável da ativação das CEH, sendo usada para identificar e quantificar

essas células assim como indicador precoce de fibrose, são expressas em pequena quantidade em fígado saudável, mas em doenças hepáticas crônicas tornam-se significativamente elevada (AKPOLAT et al., 2005; CARPINO et al., 2005; GUIDO et al., 1996; MABUCHI et al., 2004; KWEON et al., 2001; SAPPINO, SCHURCH, GABBIANI, 1990).

2.5.2 Elastina

O principal componente das fibras elásticas é a proteína elastina, além de microfibrilas, são encontradas em todos os locais do corpo onde existe a necessidade de elasticidade e resistência, como, por exemplo, nas paredes das artérias (DUBUISSON et al., 2001; LORENA et al., 2004). As principais células produtoras de elastina são os fibroblastos e as células musculares lisas dos vasos sanguíneos (CLEARY; GIBSON, 1983; SERGEI, 2002).

A expressão imunoistoquímica das fibras elásticas pode ser obtida pela utilização de anticorpo monoclonal específico para elastina ou pelo uso de anticorpo policlonal contra tropoelastina humana, que é a subunidade solúvel responsável pela formação da porção amorfa da elastina (MIDWOOD; SCHWARZBAUER, 2002)

Alguns investigadores têm demonstrado que a deposição de elastina aumenta à medida que a fibrose hepática progride e ocorre proliferação de FBP (DESMOULIERE et al., 1997; LORENA et al., 2004). Acredita-se que a elastina possa ser considerada específica para identificação dos FBP em oposição as CEH (RAMADORI; SAILE, 2004; SATO; SUZUKI; SENOO, 2003).

2.5.3 Erasmus University Rotterdam-timo retículo 7 (ER - TR7)

Este anticorpo detecta fibroblastos reticulares e reage com um componente intracelular dos fibroblastos, é um anticorpo monoclonal contra células não linfóides (VAN VLIET et al. 1986). Tieu et al., (2010) demonstraram fibroblastos positivos para ER-TR7 predominantemente na adventícia da aorta, mas também intercalados na camada medial dos vasos.

3 MATERIAL E METÓDOS

3.1 Coleta e processamento de material

Foram coletados 74 fígados de bovinos condenados por fasciolose no matadouro frigorífico de Atilio Vivácqua, Espírito Santo, sob autorização e fiscalização do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF-ES), coletou-se também uma amostra de fígado normal, no período de dezembro de 2010 a janeiro de 2011.

Os fígados foram macroscopicamente avaliados para confirmação da presença dos trematódeos, e foram seccionados ao meio seguindo a divisão anatômica de lobo direito e esquerdo. De cada lobo hepático foi coletado um fragmento medindo aproximadamente dois cm³, que por convenção, o fragmento do lado esquerdo foi coletado no formato triangular e do lado direito no formato quadrado, que foram fixados em formalina 10% e, em seguida, encaminhados ao Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo para processamento.

As amostras previamente fixadas foram submetidas ao processamento histológico de rotina, em seguida, à microtomia, em micrótomo rotativo manual, para a secção de cortes histológicos de três micrômetros de espessura, que foram depositados em lâminas histológicas, coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) (LUNA, 1968) e Tricrômico de Masson (LUNA, 1968) para a avaliação da fibrose hepática e inflamação, bem como sua distribuição pelo parênquima.

3.2 Avaliação histológica

A avaliação histológica foi realizada levando-se em consideração o infiltrado inflamatório e a fibrose, bem como a sua distribuição. A caracterização da fibrose hepática foi feita de acordo com os critérios estabelecidos por Oliveira, Souza e Andrade (2004), utilizando-se o material corado em HE e Tricrômico de Masson. Sendo fibrose hepática classificada como grau 1 caracterizada por: fibrose septal em pequenas áreas havendo pouco envolvimento do parênquima hepático; fibrose

hepática classificada como grau 2: fibrose difusa, com formações de septos fibrosos delgados e, geralmente, incompletos e a fibrose hepática classificada como grau 3: fibrose proeminente com septos fibrosos espessos e distribuídos por todo parênquima hepático.

3.3 Técnica imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica foi realizada para detectar o imunofenótipo das células que compõem a fibrose induzida pela infecção por *F. hepatica*. Por tratar-se de tecido que possui grande quantidade de proteínas, as amostras foram submetidas aos seguintes procedimentos, para a padronização da técnica e da diluição de cada anticorpo.

As amostras histológicas foram submetidas à microtomia para obtenção de cortes com três μm de espessura, os quais foram depositados sobre lâminas previamente tratadas com cola líquida de poli-L-lisina (P8920- Sigma Chemical CO., St. Louis MO., E.U.A.), e permaneceram na estufa a 60°C por 12 horas para fixação do tecido à lâmina. Estas lâminas foram submetidas aos processos de desparafinização e hidratação seguida do bloqueio de peroxidases endógenas com solução de água oxigenada 30 volumes diluídos em metanol, na proporção de 1:9, por 15 minutos. Após este procedimento, realizou-se lavagem em água destilada e o material foi submetido à recuperação de antígenos.

Para a recuperação de antígenos foram testadas três técnicas, a primeira técnica foi com solução de citrato 10mM pH 6,0 em forno de microondas potência máxima (700w) durante quinze minutos. A segunda técnica foi solução de citrato 10mM pH 6,0 em autoclave microprocessada (Brastec® Q290M22) a 120°C por 30 segundos e a terceira técnica também foi com solução de citrato 10mM pH 6,0 em panela de pressão microprocessada (Dako, S2800-1) a 125°C por 30 segundos. Os melhores resultados ocorreram com a utilização da solução de citrato em panela de pressão microprocessada, a 125°C por 30 segundos, para o anticorpos anti- α -SMA e em autoclave microprocessada, a 120°C por 30 segundos, para os anticorpos anti-elastina e anti-ER-TE7.

Após essa etapa, o material foi resfriado em temperatura ambiente por 20 minutos e foi lavado em solução tampão de TRIS pH 7,40 (TRIZMA BASE, Sigma

Chemical CO., St. Louis MO., E.U.A.). Em seguida, realizou-se o bloqueio de proteínas inespecíficas com solução de leite em pó Molico[®] a 3% por uma hora.

Posteriormente, o material foi novamente lavado em solução tampão de TRIS e incubado com cada anticorpo primário em câmara úmida por 18 horas a 4°C. As diluições dos anticorpos testadas estão dispostas no Quadro 1, esses anticorpos foram diluídos em solução de albumina sérica bovina na concentração e 1%.

Anticorpo	Descrição	Concentrações testadas	Concentração utilizada
Anti-Elastin (BA-4): sc-58756	Anticorpo monoclonal (IgG-1) de rato, produzido contra elastina de origem bovina, recomendado para a detecção de elastina insolúvel, α -elastina e tropoelastina de rato, humanos e outras espécies	1:25, 1:50, 1:100, 1:200	1:100
Anti-Fibroblast Marker (ER-TR7): sc-73355	Anticorpo monoclonal (IgG-2a) de rato, é recomendada para a detecção de fibroblastos reticulares de origem humana e do rato.	1:100, 1:150, 1:200, 1:500	1:150
Anti- α -Smooth Muscle Actin (M0851, Clone 1A4)	Anticorpo monoclonal (IgG-2a) de rato recomendada para a detecção de células musculares lisas, miofibroblastos e células mioepiteliais	1:100, 1:200, 1:400, 1:100, 1:1000, 1:1400	1:1250

Quadro 1 - Anticorpos primários, concentrações testadas e utilizadas nas reações imunistoquímicas das amostras de fígado com fasciolose crônica.

Como controle positivo para o anticorpo α -SMA utilizou-se cordão umbilical humano, para o anticorpo anti-elastina utilizou-se fígado e artéria aorta bovina, e a para o anticorpo anti-ER-TE7 foi utilizado tecido de granulação equino. Como controle negativo foi feita a omissão do anticorpo primário em todas as amostras.

Após a incubação com os anticorpos primários, o material foi lavado em solução de TRIS e, para a amplificação da reação, utilizou-se o sistema de detecção à base de polímeros *NovoLink* (Novocastra, 7280-K) em que o material foi incubado em temperatura ambiente com cada reagente por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente com solução de TRIS e depois tratadas com solução de 3,3'-diaminobenzidina (Liquid DAB, Dako K-3466) por cinco minutos à

temperatura ambiente. O material foi lavado em água corrente, seguida de água destilada e contra-corado com hematoxilina de Harris por 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas em água corrente por 10 minutos e submetidas aos processos de desidratação e montagem com resina sintética.

3.4 Avaliação imunoistoquímica

A caracterização do imunofenótipo das células que compõem a fibrose hepática, células estreladas hepáticas (CEH), miofibroblastos (MF) e fibroblastos (FB), foi baseada na morfologia de cada tipo celular e na marcação destas células para cada anticorpo utilizado, conforme exposto na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização do imunofenótipo de cada tipo celular envolvido na fibrose hepática em bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* de acordo com a positividade para cada anticorpo.

Tipo celular	Anticorpo anti- α -SMA	Anticorpo anti-elastina	Anticorpo anti-fibroblasto
CEH	+	-	-
MF	+	+	-
FB	-	+	+

(+): Marcação imunoistoquímica positiva;(-): Ausência de marcação imunoistoquímica; CEH: células estreladas hepática; MF: miofibroblastos; FB: fibroblastos

Após a identificação de cada tipo celular, com base na expressão dos anticorpos, estas células foram quantificadas no parênquima e nos espaços porta de cada amostra. Para a análise no parênquima, foram avaliados cinco campos lineares aleatórios, sob microscópio de luz utilizando-se objetiva de 20x. Esta análise foi feita separadamente em cada lobo hepático. Após a avaliação foi obtida a quantidade média de células por lobo hepático.

Para a análise no espaço porta levou-se em consideração a distribuição e intensidade da fibrose. Desta forma, avaliou-se a distribuição da fibrose em cada estrutura do espaço porta (EP): vênula portal (VP), arteríola portal (AP) e ducto biliar (DB), bem como, a intensidade. A intensidade da marcação foi obtida pela quantificação de cada estrutura observada por espaço porta e pelo número de

células imunomarcadas entorno de cada estrutura. Nesta análise também foram observados cinco espaços porta aleatórios em cada lobo hepático.

3.5 Análise Estatística

A análise estatística foi feita por análise descritiva com os valores expressos em percentuais e pelo teste de correlação de Spearman com nível de 5% de probabilidade de erro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação histológica

Na análise histológica dos fígados cronicamente infectados por *F. hepatica* observou-se que as amostras classificadas como grau 1 houve fibrose septal discreta (Figura 1), em pequenas áreas do espaço porta com pouco envolvimento do parênquima hepático e infiltrado inflamatório discreto predominantemente periportal.

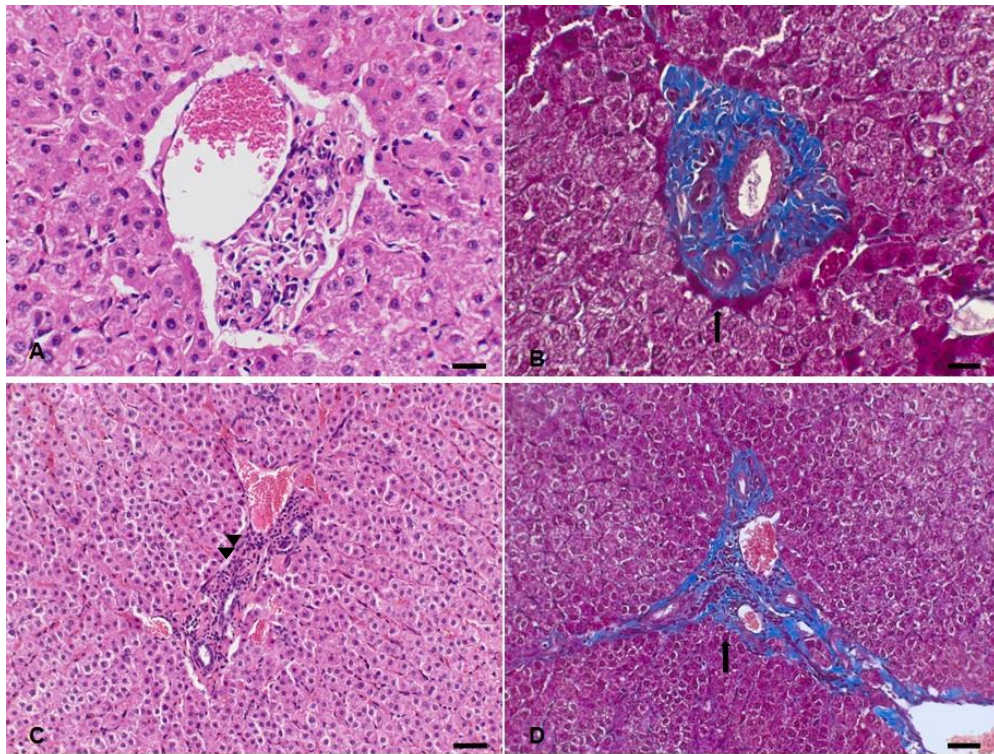


Figura 1 - Fotomicrografia de fígado bovino. **A)** Fígado não condensado por fasciolose no matadouro frigorífico. Hematoxilina e eosina (HE), barra 6,4 μm . **B)** Tecido conjuntivo ao redor das estruturas do espaço porta (seta) em fígado não condensado por fasciolose no matadouro frigorífico. Tricrômico de Masson, barra 6,4 μm . **C)** Infiltrado inflamatório discreto na região portal (cabeça de seta) em fígado condensado por fasciolose. Fibrose grau 1. HE, barra 14,5 μm . **D)** Fibrose portal discreta (seta), grau 1, em fígado condensado por fasciolose. Tricrômico de Masson, barra 14,5 μm .

Nas amostras classificadas como fibrose grau 2 observou-se fibrose portal difusa formando septos fibrosos delgados, geralmente, incompletos no parênquima, proliferação moderada de ductos biliares e infiltrado inflamatório discreto na região periportal (Figuras 2A e 2B). As amostras classificadas como fibrose grau 3 observou-se fibrose portal proeminente com septos fibrosos espessos, frequentemente, ligando um espaço porta a outro, conjuntamente com infiltrado inflamatório moderado predominantemente (Figuras 2C e 2D).

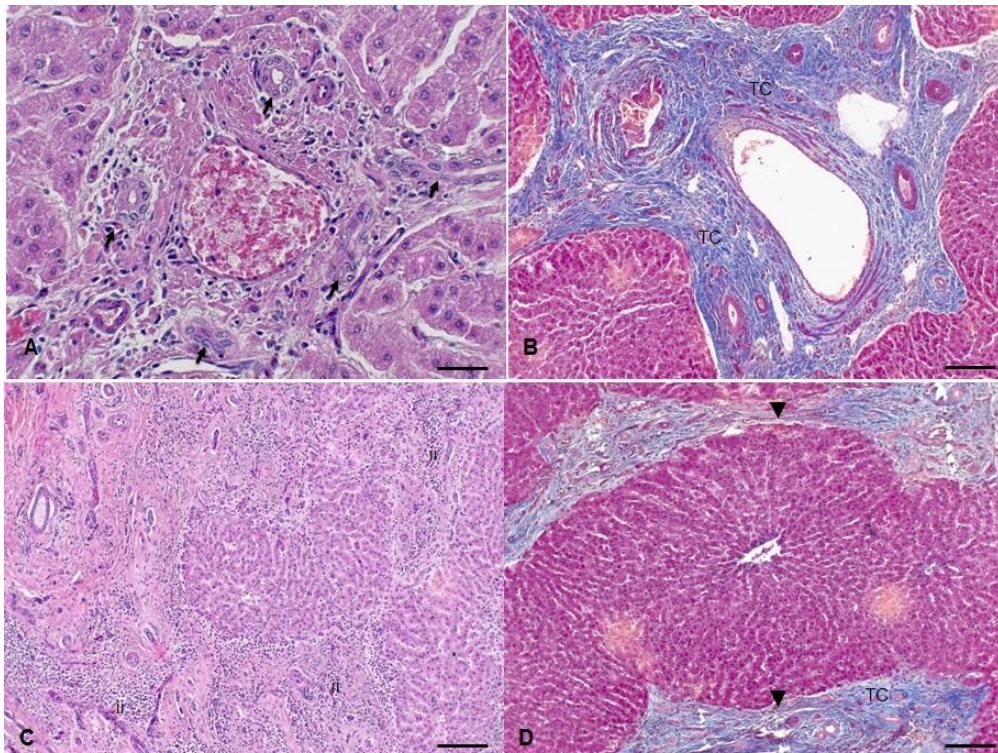


Figura 2 - Fígado bovino condenado por fasciolose. **A)** Espaço porta com proliferação de ductos biliares (setas), fibrose grau 2. HE, barra 6,4 μm. **B)** Tecido conjuntivo (TC) distribuído difusamente, formando septos delgados entorno do espaço porta, na fibrose grau 2. Tricrômico de Masson, barra 46,5 μm. **C)** Fibrose grau 3 apresentando infiltrado inflamatório (ii) intenso na região do espaço porta. HE, barra 46,5 μm. **D)** Fibrose grau 3, revelando tecido conjuntivo (TC) em ponte, unindo um espaço porta a outro (cabeça da seta). Tricrômico de Masson, barra 46,5 μm.

Na figura 3, observou-se que no lobo hepático direito 90,5% (67/74) dos fígados foram classificados como fibrose grau 1; 8,1% (6/74) como fibrose grau 2 e 1,4% (01/74) como fibrose grau 3 e no lobo hepático esquerdo 55,4% (41/74) dos fígados foram classificados como grau 1; 28,4% (21/74) como grau 2 e 16,2% (12/74) como grau 3.

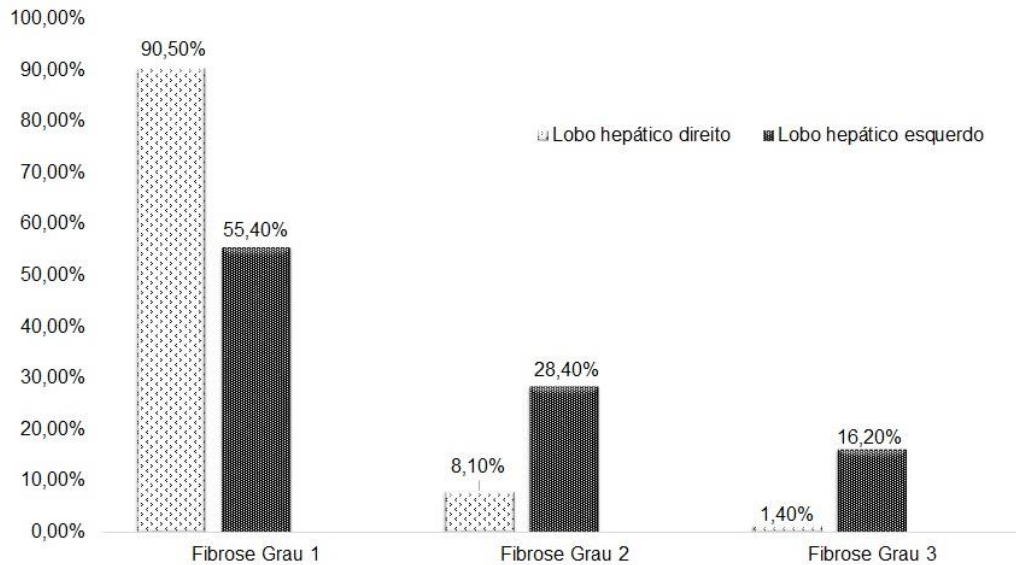


Figura 3 - Valores percentuais de fígados bovinos infectados por *F. hepatica* de acordo com a classificação do grau de fibrose em cada lobo hepático.

O modelo de classificação para a fibrose hepática utilizada neste estudo foi preconizado em pesquisas com *Capillaria hepatica* (OLIVEIRA; SOUZA; ANDRADE, 2004), pois esse modelo tem a vantagem da fibrose desenvolver-se em 100% dos animais infectados, além de sua cronologia pode ser prevista com uma boa margem de confiança (GOMES et al., 2006).

Na medicina humana, grau de estadiamento da fibrose hepática prediz a progressão da lesão, além de avaliar prognóstico e eficácia de tratamento (DESMET et al., 1994). No entanto, há vários modelos semiquantitativos utilizados para classificar a lesão hepática, como a escala de ISHAK, METAVIR, SBP (Sociedade Brasileira de Patologia) e a HAI (Índice de Atividade Histológica), embora nenhuma dessas escalas possa ser considerada livre de apresentar falhas, especialmente, na avaliação do grau de fibrose, devido à dependência da interpretação subjetiva do observador (BURT, 2007).

Na literatura consultada não há uma classificação estabelecida para se avaliar a progressão da lesão hepática em bovinos. Trivilin et al. (2014) propuseram uma categorização para lesão hepática em que avaliou-se além da fibrose, a hiperplasia dos ductos biliares, infiltrado inflamatório e a esclerose de vasos. Entretanto, a classificação proposta por Oliveira, Souza e Andrade (2004) tem sido mais utilizada.

Assim, Marcos et al. (2007) utilizando este método de graduação de lesão, verificaram maior prevalência de alterações hepáticas classificadas como grau 3. Por outro lado, Trivilin et al. (2014), observou maior prevalência de fibrose grau 2. Tais divergências podem ser decorrentes de diferentes critérios morfológicos avaliados, embora também possa ser devido à resposta imune de cada hospedeiro frente à infecção (MEEUSEN; PIEDRAFITA, 2003). Acredita-se que as características epidemiológicas, como temperatura, pluviosidade, altitude dos locais também possam influenciar a progressão da lesão hepática frente ao parasitismo (ALVES et al., 2011).

Apesar disto, muitos autores relataram que na infecção por *Fasciola* sp. as lesões fibróticas mais importantes, são observadas ao redor dos ductos biliares (BOSTELMANN et al., 2000; MARCOS et al., 2007; PHIRI et al., 2006; TRIVILIN et al., 2014), fato que também foi observado neste estudo.

Neste estudo, observou-se que o grau de fibrose tem associação positiva e significativa ($\rho=0,41$; $p<0,0001$) com o lobo hepático, revelando existir mais fibrose no lobo hepático esquerdo do que no direito (Figura 3).

Tessele, Brum e Barros (2013) avaliaram, macro e microscopicamente, fígados bovinos condenados por fasciolose e observaram que o lobo esquerdo frequentemente encontrava-se atrofiado e com maior presença de fibrose, respaldando os resultados obtidos neste estudo.

Além disso, segundo Shirai et al. (2006) os exemplares de *Fasciola* sp. são predominantemente encontrados no ducto biliar comum do lobo hepático esquerdo, este é o principal ducto ocupando um terço desse lobo hepático. Esse fato pode ser verificado pelas alterações fibróticas marcantes detectadas na superfície visceral.

Stalker e Hayes (2007) também relataram que a fibrose é mais ampla no lobo hepático esquerdo, por ocorrer maior parte da migração parasitária, enquanto o lobo direito mostra hipertrofia compensatória. Como relatado por Shirai et al. (2006), a presença de um único ramo de veia porta e de um único ducto biliar no lobo hepático esquerdo, paralelo com a superfície visceral e superfície diafragmática, favorece a fibrose atrófica nesta área. Enquanto que, no lobo direito, vários ductos biliares grandes e ramos portais interligam-se uns com os outros, de modo que a infecção em um determinado ducto pode não causar o abaulamento das vias biliares na superfície, mas provocar hipertrofia compensatória em vez de atrofia, mesmo quando muitos canais biliares são afetados.

Diante disso, Hodžić et al. (2013) observaram que em fígados bovinos com fasciolose ocorre perda de continuidade dos ductos biliares menores, no lobo hepático esquerdo, decorrente do resultado da compressão causada por infiltrado inflamatório, edema e proliferação de tecido conjuntivo, esses fatores também poderiam contribuir para que o lobo esquerdo revelasse mais fibrose do que o direito.

4.2 Avaliação imunoistoquímica

Em relação à caracterização do imunofenótipo das células que compõem a fibrose hepática, observaram-se somente células estreladas hepáticas e miofibroblastos nas amostras avaliadas. Não foram encontrados fibroblastos em nenhum dos fígados avaliados, nem no parênquima e nem no espaço porta, incluindo o fígado normal (Figura 4).

Com base na expressão dos anticorpos utilizados, a distribuição das CEH foi homogênea no parênquima de todos os fígados avaliados (Figura 4C), tanto no lobo direito quanto no lobo esquerdo. Entretanto, com os anticorpos utilizados não foi possível detectar a presença dessas células no espaço porta, pois neste local houve forte expressão de elastina. Assim, considerou-se que no EP encontram-se apenas miofibroblastos, pois foram elastina positiva e α -SMA positivos, tanto no lobo direito quanto no lobo esquerdo.

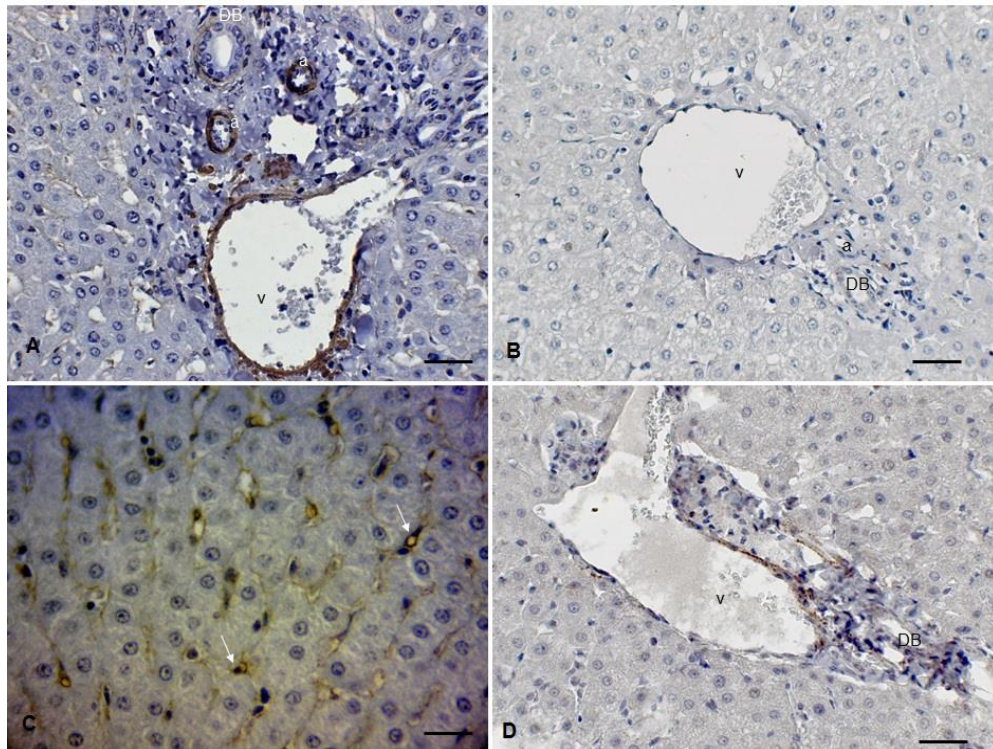


Figura 4 - Imunoistoquímica de fígado bovino condenado por fasciolose. **A)** Miofibroblastos em torno de arteríolas (a), vênulas (v) e ductos biliares (DB), imunomarcados com o anticorpo α -SMA, barra 14,5 μ m. **B)** Região de espaço porta com arteríola (a), vênula (v) e ducto biliar (DB) com ausência de imunomarcação para fibroblasto. Anticorpo ER-TE7, barra 14,5 μ m. **C)** Células estreladas hepáticas α -SMA positivas (setas) com predominante distribuição no parênquima, fibrose grau 1. Barra 6,4 μ m. **D)** Miofibroblastos imunomarcados com elastina em torno de vênulas (v) e arteríolas (a) e ductos biliares (DB). Anticorpo anti-Elastina, barra 14,5 μ m.

O anticorpo α -SMA é considerado bom marcador para a detecção de células semelhantes a miofibroblastos, em homem e rato, e um marcador confiável de CEH ativadas que precedem a deposição de tecido fibroso, assim, é útil para monitorizar a eficácia da terapia (CARPINO et al., 2005). Porém, segundo Uchio et al. (2002), até o momento, nenhum marcador permite discriminar totalmente, os MF das CEH na fase de miofibroblastos.

Visto que, nem todos os MF α -SMA positivos são derivados de CEH ativadas, considerando que além dessas células, os MF de vasos e os FBP podem expressar essa proteína, o que revela a heterogenicidade do miofibroblastos hepáticos

(CASSIMAN et al., 2002; CHERNG; YOUNG; MA, 2008; MAGNESS et al., 2004; RAMADORI; SAILE, 2004).

No presente trabalho foi possível identificar as populações de MF no espaço porta quando estas células encontravam-se marcadas pelo α -SMA e elastina (Figura 5), entretanto, estes poderiam ser derivados de MF de vasos, FB ou de FBP. Tentando esclarecer essa dúvida utilizou-se o anticorpo ER-TE7 (GOODPASTER et al., 2008) para detectar fibroblastos, no entanto, não houve imunomarcção dessas células nas amostras analisadas, logo, entende-se que os MF presentes no espaço porta são derivados de MF de vasos.

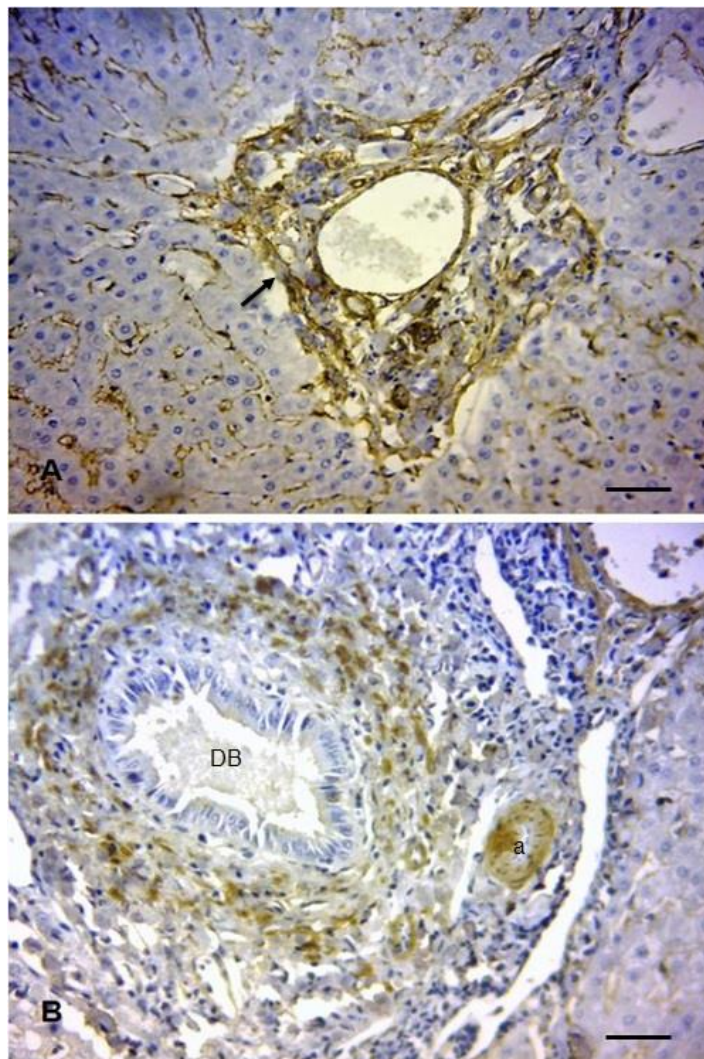


Figura 5 - Fígado bovino condensado por fasciolose, imunomarcado com anticorpo anti-elastina. **A)** Miofibroblastos na região de espaço porta (seta). Fibrose grau 1. Barra 46,5 μ m. **B)** Miofibroblastos em torno de arteríola (a) e ducto biliar (DB). Fibrose grau 1. Barra 14,5 μ m.

Uchio et al. (2002) citaram que as células mesenquimais dos vasos presentes nos espaços porta podem ser mais importantes na formação da fibrose do que geralmente tem sido suposto, devido a grande extensão destas quando comparada com as CEH ativadas, podendo desta forma contribuir efetivamente para a fibrogênese hepática. Dados semelhantes foram verificados nestes estudo.

A ausência de FB (Figura 6) nas amostras avaliadas pode ser decorrente da ativação dessas células para miofibroblastos (ASAHINA et al., 2009; LIBBRECHT et al., 2002; UCHIO et al., 2002). Uma vez que, na presença de lesão e/ou de células inflamatórias, os FB são estimulados a produzirem fatores TGF- β 1 e PDGF que atuam na transdiferenciação para MF (BATALLER; BRENNER, 2005; DOOLEY et al., 2001; ONORI et al., 2000; SAFADI; FRIEDMAN, 2002; WU; ZERN, 2000).

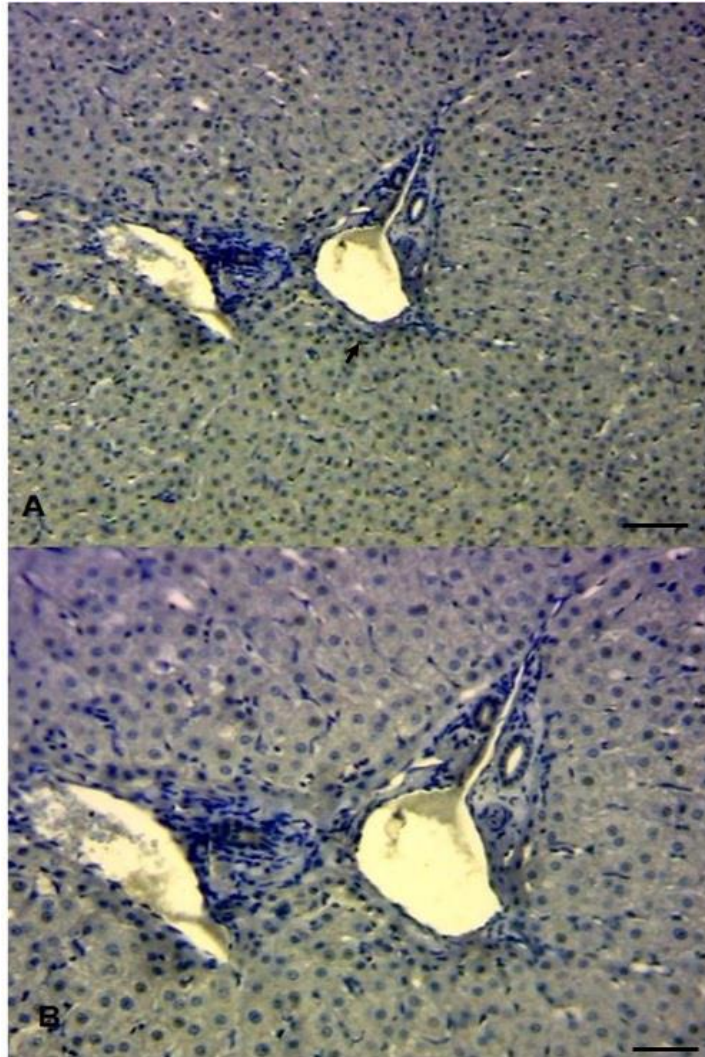


Figura 6 - Fígado bovino condensado por fasciolose com ausência de imunomarcção em fibroblastos com o anticorpo ER-TE7. **A)** Região de espaço porta (seta). Fibrose grau 1. Barra 46,5 μm . **B)** Destaque do espaço porta. Fibrose grau 1. Barra 14,5 μm .

Zeisberg et al. (2007) observaram FB apenas em fígados normais utilizando um marcador específico para FB, a *fibroblast specific protein-1*; em torno das veias centrais e na região periportal. Porém, sabe-se que os FBP presentes nos espaços porta, em condições normais, não expressam α -SMA (PAROLA; MARRA; PINZANI, 2008) e são distintos das CEH por expressarem elastina (DUDAS et al., 2007; YOVCHEV et al., 2009). Contudo, observou-se neste estudo que em fígados bovinos normais há expressão de α -SMA em FBP.

Também observamos que as CEH foram encontradas apenas no parênquima hepático e estavam localizadas entre os hepatócitos e espaços de Disse,

corroborando com Poonkhum et al. (2011). Todavia, Kinnman et al. (2000) citaram que as CEH sofrem quimiotaxia em direção a estruturas de ductos biliares, em ratos.

Em relação à quantificação das CEH no parênquima a média encontrada foi de 23,9, sendo que no lobo hepático direito foi de 22,9 e no lobo hepático esquerdo foi de 24,8. Quando analisada quantidade de CEH em cada categoria de fibrose hepática grau 1, 2 ou 3 observou-se que não houve associação entre a quantidade de CEH e o grau de fibrose no lobo hepático direito ($\rho=-0,20$; $p=0,09$) nem no lobo hepático esquerdo ($\rho=0,02$, $p=0,85$). Por outro lado, observou-se uma correlação negativa e significativa entre os graus de fibrose ($\rho=-0,44$, $p<0,0001$) e a quantidade de CEH ($\rho=-0,61$, $p<0,0001$) nos lobos hepáticos, direito e esquerdo (Figura 7).

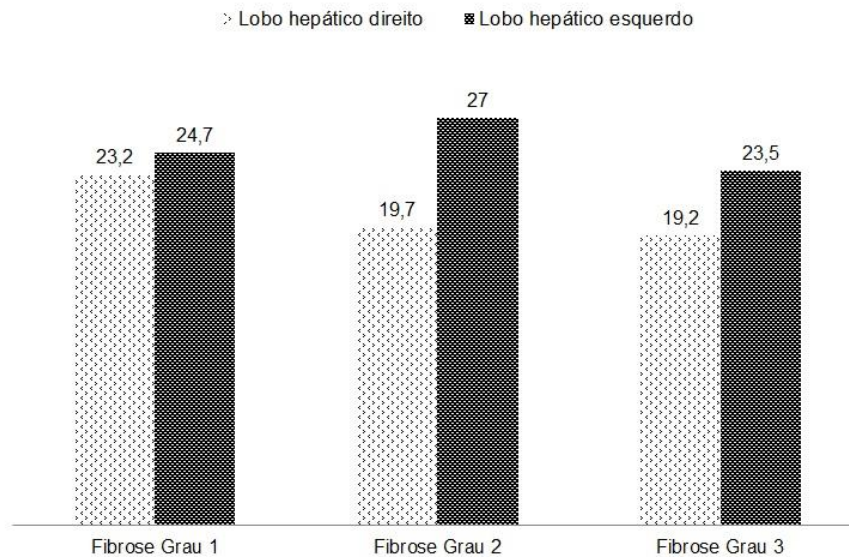


Figura 7 - Valores médios de células estreladas hepáticas (CEH) encontradas em fígados bovinos condenados por fasciolose por grau de fibrose e por lobo hepático.

Assim, à medida que aumenta a fibrose nos lobos hepáticos, diminui a quantidade de CEH. Ao contrário do que observa-se em cães, onde a intensidade da imunomarcção para CEH α -SMA positivas na região perissinusoidal pode variar dependendo do grau de fibrose (MILIJANA et al., 2009).

Em cães, a expressão de α -SMA não está relacionada com a ativação das CEH durante a fibrose, uma vez que o α -SMA é expresso também no tecido hepático saudável, como uma molécula constitutiva (IJZER et al., 2006; MEKONNEN; IJZER; NEDERBRAGT, 2007), contrapondo-se ao que é observado

em humanos e ratos, onde há aumento das CEH com forte expressão de α -SMA durante a fibrose hepática (CASSIMAN et al., 2002).

Isso também foi demonstrado por Akpolat et al. (2005) e Chu, Shyu e Liaw (2008) em pacientes com hepatite crônica B e C, há uma correlação positiva significativa das CEH ativadas com o estágio da fibrose. Segundo Schmitt-Graff et al. (1991) as CEH α -SMA positivas são responsáveis pela acúmulo de tecido fibrótico na doença hepática crônica em humanos, pois houve aumento de CEH em pacientes com doença hepática crônica quando comparado com o fígado normal, com correlação positiva entre o seu número e a extensão da fibrose. Resultados semelhantes também foram obtidos por Tsai et al. (2008), que demonstraram aumento na expressão de α -SMA na fibrose hepática quando comparado com o fígado normal.

Neste mesmo contexto, Carpino et al. (2005) demonstraram que houve correlação positiva entre a porcentagem de CEH α -SMA positivas com a progressão da fibrose hepática e sugeriram que a progressão da fibrose não está relacionada com os fatores etiológicos da doença hepática, mas sim, representa uma resposta estereotipada a insultos crônicos.

Por outro lado, Tomanovic, Boricic e Brasanac (2006) relataram, em pacientes com hepatite B crônica, que as CEH podem expressar α -SMA sem ter correlação evidente com a gravidade da lesão hepática. Existe também, estudos que relataram correlação negativa entre o estágio de fibrose e expressão de CEH α -SMA positiva na zona perivenular e no espaço portal (IREDALE et al., 1998). Esta correlação negativa pode ser explicada pela diminuição de CEH ativadas por apoptose (ISSA et al., 2001) que, segundo Beaussier et al. (2007), as CEH são mais susceptíveis a apoptose espontânea e, por isto, há maior acúmulo de miofibroblastos portais sobre as CEH, pelo menos em fibrose biliar.

Estudos em fígados com fasciolose crônica indicaram que existe associação entre a intensidade da infecção e a progressão da fibrose em diversos modelos animais (MARCOS et al., 2011), entretanto, não existem dados concretos avaliando a imunomarcagem das CEH em fígados bovinos com fasciolose e sua correlação com a progressão da fibrose.

Ao avaliar a quantidade de células imunomarcadas nos espaços porta, verificou-se aumento no número de estruturas como: arteríolas (AP), vênulas (VP) e ductos biliares (DB), bem como um aumento no número de camadas entorno de

cada uma dessas estruturas, tanto no lobo hepático direito quanto no lobo hepático esquerdo (Figura 8). No entanto, não houve influência de qualquer estrutura do espaço porta, em particular, sobre o grau de fibrose hepática ($p>0,05$).

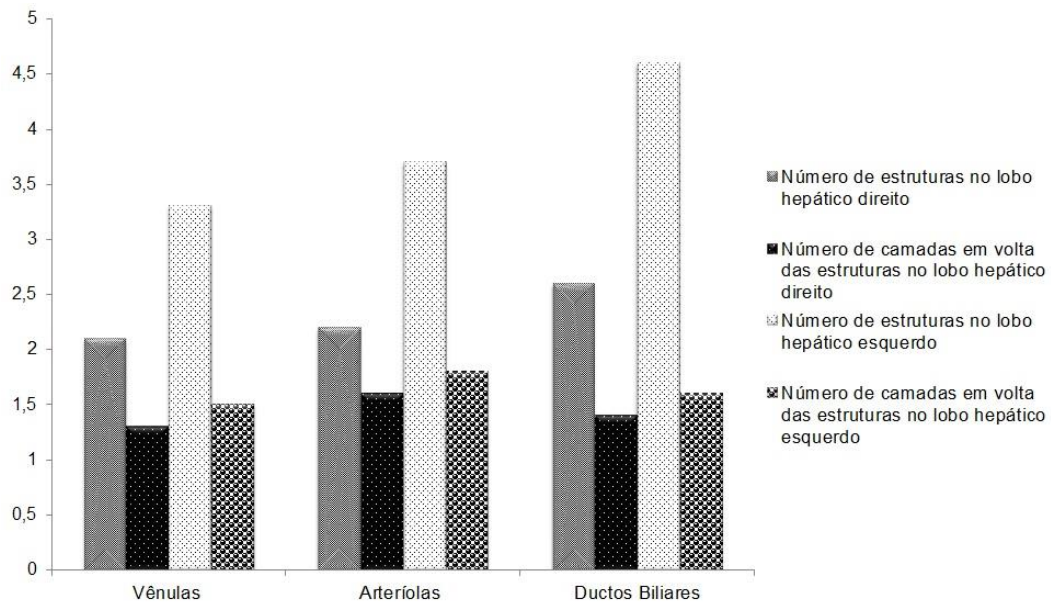


Figura 8 - Valores médios da quantidade de estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) e do número de camadas de miofibroblastos entorno dessas estruturas por lobo hepático em fígados bovinos infectados por *F. hepatica*.

Contudo, quando avaliou-se a influência do número de estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) sobre o grau de fibrose, observou-se correlação positiva e significativa ($p=0,51$; $p<0,0001$) com uma associação moderada, no lobo hepático direito e esquerdo (Figura 9).

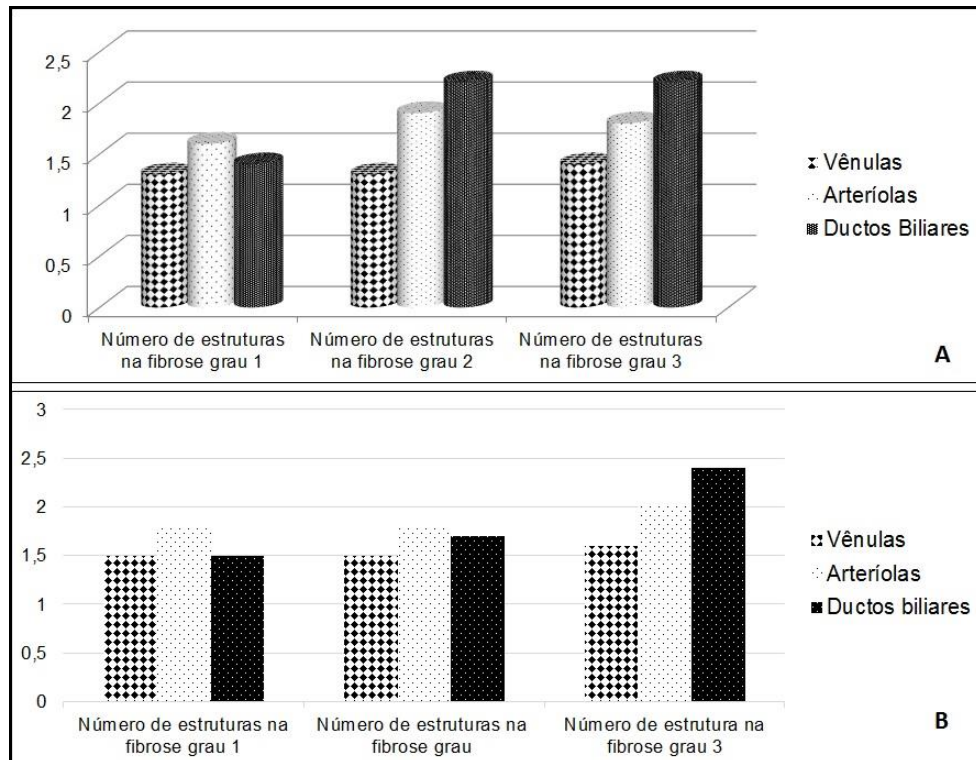


Figura 9 - Valores médios do número de estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) encontradas em cada lobo hepático em relação ao grau de fibrose. **A)** Número de estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) no lobo hepático direito. **B)** Número de estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) no lobo hepático esquerdo.

Neste estudo, observou-se que na fibrose induzida por *F. hepatica* há proliferação das estruturas portais como vênulas, arteríolas e ductos biliares com positividade para α -SMA e elastina, assim como o aumento do número de camadas, ou seja, miofibroblasto entorno dessas estruturas. Entretanto, não foi possível afirmar qual a estrutura que mais prolifera-se em decorrência do processo fibrótico.

Segundo, Milijana et al. (2009) os MF aumentam conforme o grau de fibrose, entorno dos vasos sanguíneos e ductos biliares em cães, devido a correlação entre o grau de fibrose, a inflamação e a proliferação das vias biliares. Porém, Poonkhum et al. (2011) demonstraram que na fibrose biliar de cães, que embora exista proliferação de ductos biliares no espaço porta e fibrose, não há imunomarcagem para α -SMA nos MF periductais.

Fabris et al. (2007) e Richardson et al. (2007) demonstraram correlação direta entre a intensidade da reação ductal com a gravidade da fibrose, em figados de humanos e em modelos animais numa variedade de etiologias, que incluem a

hepatite viral C e a esteatose hepática não-alcoólica. Ramm et al. (2004), verificaram que em doenças colestáticas do fígado, a fibrose portal é decorrente da reação ductal, onde o epitélio ductal expressa proteínas que atraem e ativam as CEH levando à deposição de colágeno.

Embora, segundo Clouston et al. (2005), não existem provas de que a reação ductal promova diretamente a fibrose portal, uma vez que encontraram reação ductal mesmo sem fibrose portal (estágio 0), sugerindo que essa reação ductal precede a fibrose e que essa possa ser um estímulo comum que impulsiona as CEH e os MF a produzirem fibrose independentemente, ou que, a reação seja simplesmente um subproduto da fibrose portal.

Verificou-se que o número de camadas em volta de cada estrutura do espaço porta, apresenta correlação positiva e significativa do com o grau de fibrose ($\rho=0,19$, $p<0,0001$), tanto no lobo hepático direito quanto esquerdo (Figura 10), porém uma associação fraca. Estes dados revelam que quanto maior o número de camadas em volta de determinada estrutura do espaço porta maior é o grau de fibrose.

Notou-se ainda que o número de camadas em cada estrutura do espaço porta apresenta uma correlação positiva, moderada e significativa com a quantidade de estruturas do espaço porta avaliadas ($\rho=0,35$, $p<0,0001$;), ou seja, a proliferação destas estruturas pode ser explicada pelo aumento do número de camadas de fibrose em torno dessas ou vice-versa. Além disso, observou-se que no lobo hepático esquerdo houve uma correlação positiva e significativa do número de camadas em cada estrutura do espaço porta ($\rho=0,15$, $p<0,0012$, Figura 10), entretanto, uma associação fraca.

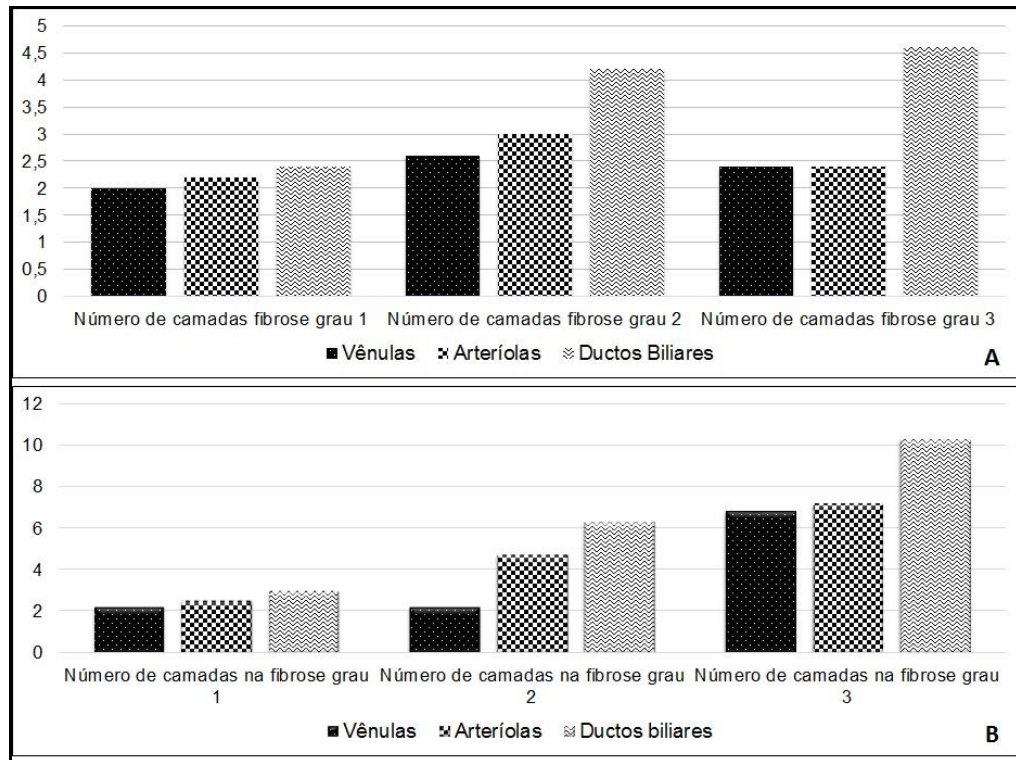


Figura 10 - Valores médios do número de camadas em volta das estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) encontradas em cada lobo hepático em relação ao grau de fibrose. **A)** Número de camadas em volta das estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) no lobo hepático direito. **B)** Número de camadas em volta das estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) no lobo hepático esquerdo.

A proliferação de tecido conjuntivo no espaço porta tem grande influencia na fibrose hepática não só em doenças das vias biliares, mas outras doenças hepáticas crônicas que inclui as doenças virais e álcool (CLOUSTON et al., 2005), assim, Tomanovic et al. (2009) encontraram uma correlação positiva e significativa entre o estágio de fibrose e a expressão α -SMA neste local em pacientes com hepatite viral crônica tipo C.

Segundo Libbrecht et al. (2002), as células que residem na parede da artéria portal contribuem para reparar os danos no espaço porta. Kinnman e Housset (2002), Magness et al. (2004) e Uchio et al. (2002) também relataram que os MF derivados de pequenos vasos portais proliferam em torno de ductos biliares contribuindo para a fibrose hepática. Estes dados confirmam os encontrados por Beaussier et al. (2007) que verificaram uma grande quantidade de células fibrogênicas no fígado α -SMA positivas derivadas, principalmente, de células mesenquimais do espaço porta, sendo que ocorreu maior acúmulo de tecido fibroso

em torno de estruturas septais/portal e ductais, tal fato também foi verificado no presente estudo em que os MF foram observados exclusivamente nos espaços porta.

Estes achados também foram demonstrados por Kinnman et al. (2000) em ratos e humanos na fibrose biliar. Estes autores verificaram que ocorre elevada expressão de α -SMA nos MF peribiliares dos espaços porta. Entretanto, Novo et al. (2009) sugerem que a forte imunomarcação α -SMA na fibrose hepática crônica observada nos MF do tecido conjuntivo, da túnica média hiperplásica de vasos e nas células do músculo liso extravascular, podem ser consequência da angiogênese patológica durante a progressão da lesão.

5 CONCLUSÕES

As células que participam da fibrogênese de fígados bovinos frente à infecção por *F. hepatica* são as CEH e os MF.

As CEH estão presentes no parênquima hepático em fígados com qualquer grau de fibrose.

Os MF aumentam conforme aumenta o grau de fibrose.

Os FB não foram detectados pela técnica de imunohistoquímica em fígados com fasciolose.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fasciolose é uma doença parasitária com alta prevalência e de grande importância para a região Sul do Espírito Santo.

Em relação à classificação histológica da fibrose hepática percebeu-se que a categorização utilizada leva em consideração apenas a extensão da lesão fibrótica não sendo avaliado seu arranjo. Os dados deste estudo permitiram verificar que existem diferenças na composição e na organização do tecido fibroso em torno das vênulas, arteríolas e ductos biliares e que este arranjo sofre modificações conforme aumenta o grau de fibrose.

As células que participam da fibrogênese são as CEH e os MF. As CEH estão presentes no parênquima hepático enquanto que os MF estão presentes nos espaços porta e distribuídos em torno de vênulas, arteríolas e ductos biliares, e, conforme proliferam, contribuem para a progressão da fibrose. Estes dados mostram que existe a participação destas células na modulação do processo fibrótico hepático induzido pelo parasito e, acredita-se que os MF sejam as células mais importantes no processo de fibrogênese hepática causada pela fasciolose crônica.

Os estudos envolvendo os mecanismos de fibrose em diversos modelos animais, bem como, em diferentes etiologias deve ser continuado para tentar esclarecer a patogênese deste processo e buscar elementos para melhores tratamentos e medidas de controle que limitem ou minimizem a progressão das enfermidades.

7 REFERÊNCIAS GERAIS

ADRIEN, M.L.; SCHILD, A.L.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; FISS, L.; RUAS, J.; GRECCO, F.; RAFFI, M. Acute fasciolosis in cattle in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 705-709, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100736X201300060000&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 11 de Jan. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600003>.

AKPOLAT, N.; YAHSI, S.; GODEKMERDAN, A.; YALNIZ, M.; DEMIRBAG, K. The value of a-SMA in the evaluation of hepatic fibrosis severity in hepatitis B infection and cirrhosis development: a histopathological and immunohistochemical study. **Histopathology**, v. 47, n. 3, p.276–280, 2005.

ALVES, D. P.; CARNEIRO, M. B.; MARTINS, I. V. F.; BERNARDO, C. C.; DONATELE, D. M.; PEREIRA JÚNIOR, O. S.; ALMEIDA, B. R.; AVELAR, B. R.; LEÃO, A. G. C. Distribution and factors associated with *Fasciola hepatica* infection in cattle in the south of Espírito Santo State, Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. 271-276, 2011.

ANDERSON, N.; LUONG, T. T.; VO, N. G.; BUI, K. L.; SMOOKER, P. M.; SPITHILL, T. W. The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 83, n. 1, p.15–24, 1999.

ANDRADE, Z. A. Regressão da fibrose hepática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p.514-520, 2005.

ANDRADE, Z. A.; GUERRET, S.; FERNANDES, A. L. Myofibroblasts in schistosomal portal fibrosis of man. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 87–93, 1999.

APT, W.; AGUILERA, X.; VEJA; ALCAÍNO, H.; ZULANTAY, I.; APT, P.; GONZÁLEZ, V.; RETAMAL, C.; RODRÍGUEZ, J.; SANDOVAL, J. P. Prevalencia de fascioliasis en humanos, caballos, cerdos y conejos silvestres, en tres provincias de Chile. **Boletín de la oficina sanitaria panamericana**, v. 115, n.5, p. 405-414,1993.

ARTHUR, M. J. P. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, n. 2, p. 245-249, 2000.

ARAÚJO, J.L.B.; LINHARES, G.F.C.; OLIVEIRA, A.P.M.; AMORIL, J.G., FREITAS, M.R.; COSTA, I.C.; PINHEIRO, V. J. L.; ESSELIN, I. R. R.; REIS, S. A. Infecções autóctones de bovinos por *Fasciola hepatica* Linneus, 1758 (Trematoda, Fasciolidae) no Estado de Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.36, n.1, p.96-100, 2007.

ASAHINA, K.; TSAI, L.Y.; LI, P.; ISHII, M.; MAXSON, R.E.; SUCOV, H.M.; TSUKAMOTO, H. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells,

and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. **Hepatology**, v. 49, n. 3, p. 998-1011, 2009.

BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 2, p. 209–218, 2005.

BEAUSSIER, M.; WENDUM, D.; SCHIFFER, E.; DUMONT, S.; REY, C.; LIENHART, A.; HOUSSET, C. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. **Laboratory Investigation**, v. 87, n. 3, p. 292-303, 2007.

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

BERASAIN, P.; GONI, F. MCGONIGLE, S. DOWD, A.; DALTON, J. P.; FRANGIONE, B.; CARMONA, C. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 1, p. 1–5, 1997.

BERNARDO, C. C.; CARNEIRO, M. B.; AVELAR, B. R.; DONATELE, D. M.; MARTINS, I. V. F.; PEREIRA, M. J. S. Prevalence of liver condemnation due to bovine fasciolosis in Southern Espírito Santo: temporal distribution and economic losses. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 49-53, 2011.

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**. 168p. 1994. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas, 1994.

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

BOSTELMANN, S. C. W.; LUZ, E.; SOCCOL, V. T.; CIRIO, S. M. Histopatologia comparativa em fígados de bovinos, bubalinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*. **Archives of Veterinary Science**, v. 5, p. 95-100, 2000.

BOWMAN, D. D. **Georgis – Parasitologia Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 432 p.

BRUNT, E. M. **Non-alcoholic fatty liver disease**. In: BURT, A. D.; PORTMANN, B. C.; FERREL, L. D. editors. *MacSween's pathology of the liver*. 5th ed. London: Churchill-Livingstone; 2007. p. 367-98.

CAPELOZZI, V. L. Papel da imuno-histoquímica no diagnóstico do câncer de pulmão. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 4, p. 375-382, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180637132009000400012&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 6 de janeiro de 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132009000400012>.

CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia Especial Veterinária de Thomson**. 2nd ed. Porto Alegre, Artmed. 1998. 672p.

CARPINO, F.; GAUDIO, E.; MARINOZZI, G.; MELIS, M.; MOTTA, P. M. A scanning and transmission electron microscopic study of experimental extrahepatic cholestasis in the rat. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 13, n. 4, p.581-98, 1981.

CARPINO, G.; MORINI, S.; GINANNI CORRADINI, S.; FRANCHITTO, A.; MERLI, M.; SICILIANO, M.; GENTILI, F.; ONETTI MUDA, A.; BERLOCO, P.; ROSSI, M.; ATTILI, A. F.; GAUDIO, E. Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation. **Digestive and Liver Disease**, v. 37, n. 5, p. 349-356, 2005.

CASSIMAN, D.; LIBBRECHT, L.; DESMET, V.; DENEFF, C.; ROSKAMS, T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. **Journal of Hepatology**, v. 36, n. 2, p. 200–209, 2002.

CASSIMAN, D.; ROSKAMS, T. Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research. **Journal of Hepatology**, v. 37, n. 4, p. 527–535, 2002.

CHARLIER, J.; CAT, A. D.; FORBES, A.; VERCRUYSSSE, J. Measurement of antibodies to gastrointestinal nematodes and liver fluke in meat juice of beef cattle and associations with carcass parameters. **Veterinary Parasitology**, v.166, n. 3-4, p.235–240, 2009.

CHEN, L.; DAUGSCHIES, A.; WANG, B.; MAO, X. Blood eicosanoids and immune indices during fascioliasis in water buffaloes. **Veterinary Parasitology**, v. 49, n. 4, p. 273–278, 2000.

CHERNG, S.; YOUNG, J.; MA, H. Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA). **The Journal of American Science**, v. 4, n. 4, p. 7-9, 2008.

CHU, C. M.; SHYU, W. C.;, LIAW, Y. F. Comparative studies on expression of alpha smooth muscle actin in hepatic stellate cells in chronic hepatitis B and C. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 53, n. 5, p. 1364-1369, 2008.

CLEARY, E. G.; GIBSON, M. A. Elastin-associated microfibrils and microfibrillar proteins. **International review of connective tissue research**, v. 10, p. 97-209, 1983.

CLOUSTON, A. D.; POWELL, E. E.; WALSH, M. J.; RICHARDSON, M. M.; DEMETRIS, A. J.; JONSSON, J. R. Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. **Hepatology**, v. 41, n. 4, p. 809–818, 2005.

CULLEN, J. M., MacLACHLAN, N. J. **Liver, biliary system, and exocrine pancreas**. In: McGAVIN, M. D., CARLTON, W. W., ZACHARY, J. F. *Special Veterinary Pathology*. 3 ed. Missouri : Mosby, 2001. p. 81-124.

DEBIASE, P. J.; LANE, K.; BUDINGER, S.; RIDGE, K.; WILSON, M.; JONES, J. C. Laminin-311 (Laminin-6) fiber assembly by type I-like alveolar cells. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 54, n. 6, p. 665-672, 2006.

DESMET, V. J.; GERBER, M.; HOOFNAGLE, J. H.; MANNS, M.; SCHEUER, P. J. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. **Hepatology**, v. 19, n. 6, p. 1513-1520, 1994.

DESMOULIÈRE, A.; BADID, C.; BOCHATON-PIALLAT, M. L.; GABBIANI, G. Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 29, n. 1, p. 19-30, 1997.

DI BONZO, L. V.; FERRERO, I.; CRAVANZOLA, C.; MARESCHI, K.; RUSTICHELLI, D.; NOVO, E.; SANAVIO, F.; CANNITO, S.; ZAMARA, E.; BERTERO, M.; DAVIT, A.; FRANCICA, S.; NOVELLI, F.; COLOMBATTO, S.; FAGIOLI, F.; PAROLA, M. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. **Gut**, v. 57, n. 2, p. 223-231, 2008.

DOOLEY, S.; DELVOUX, B.; STRECKERT, M.; BONZEL, L.; STOPA, M.; TEN DIJKE, P.; GRESSNER, A. M. Transforming growth factor b signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2 / 3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. **FEBS Lett**, v. 502, n. 1-2, p. 4-10, 2001.

DRANOFF, J.A.; WELLS, R.G. Portal fibroblasts: underappreciated mediators of biliary fibrosis. **Hepatology**, v. 51, n. 4, p. 1434-1444, 2010.

DUBUISSON, L.; LEPREUX, S.; BIOULAC-SAGE, P.; BALABAUD, C.; COSTA, A. M.; ROSENBAUM, J.; DESMOULIERE, A. Expression and cellular localization of fibrillin-1 in normal and pathological human liver. **Journal of Hepatology**, v. 34, p.514–522, 2001.

DUDAS, J.; MANSUROGLU, T.; BATUSIC, D.; SAILE, B.; RAMADORI, G. Thy-1 is an in vivo and in vitro marker of liver myofibroblasts. **Cell and Tissue Research**, v. 329, n. 3, p. 503–14, 2007.

DUTRA, L. H.; MOLENTO, M. B.; NAUMANN, C. R. C.; FORTES, F. S.; SAVIO, D.; MALONE, J. B. Epidemiologia da fasciolose bovina com auxílio do sistema de informação geográfica na região sul. **Anais... XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia**, Foz do Iguaçu. 2009.

DUTRA, L. H.; MOLENTO, M. B.; NAUMANN, C. R. C.; BIONDO, A. W.; FORTES, F. S.; SAVIO, D.; MALONE, J. B. Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using geographic information systems. **Veterinary Parasitology**, v.169, n. 1-2, p. 76–81, 2010.

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

ELBERG, G.; CHEN, L.; ELBERG, D.; CHAN, M. D.; LOGAN, C. J.; TURMAN, M. A. MKL1 mediates TGF- β 1-induced α -smooth muscle actin expression in human renal epithelial cells. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 294, n. 5, p. 1116-1128, 2008.

ESPINOZA, J. R.; TERASHIMA, A.; HERRERA-VELIT, P.; MARCOS, L. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endêmicas. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 27, n. 4, p. 604-12, 2010.

FABRIS, L.; CADAMURO, M.; GUIDO, M.; SPIRLI, C.; FIOROTTO, R.; COLLEDAN, M.; TORRE, G.; ALBERTI, D.; SONZOGNI, A.; OKOLICSANYI, L.; STRAZZABOSCO, M. Analysis of liver repair mechanisms in Alagille syndrome and biliary atresia reveals a role for notch signaling. **American Journal of Pathology**, v. 171, n. 2, p. 641–653, 2007.

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 Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2001. p.287-290.

FONTES, A. M.; PANEPUCCI, R. A.; ORELLANA, M. D.; SANTOS, A. R. D.; ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. Células-tronco mesenquimais são similares aos pericitos, apresentam ampla distribuição no organismo humano e se localizam na parede dos vasos sanguíneos. **Anais... 60ª Reunião anual da SBPC**. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas/SP 2008.

FORBES, S. J.; RUSSO, F. P.; REY, V.; BURRA, P.; RUGGE, M.; WRIGHT, N. A.; ALISON, M. R. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. **Gastroenterology**, v. 126, n. 4, p. 955-963, 2004.

FORBES, S.J.; PAROLA, M. Liver fibrogenic cells. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 25, n. 2, p. 207-217, 2011.

FOREYT, W.J. **Parasitologia Veterinária: manual de referência**. 5ª ed., Roca, São Paulo, 2005. 256p.

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.

FREGNANI, E. R.; SOBRAL, L. M.; ALVES, F. A.; SOARES, F. A.; KOWALSKI, L. P.; COLETTA, R. D. Presence of myofibroblasts and expression of matrix

metalloproteinase-2 (MMP-2) in ameloblastomas correlate with rupture of the osseous cortical. **Pathology & Oncology Research**, v. 15, n. 2, p. 231-40, 2009.

FRIEDMAN, S. L. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanisms and treatment strategies. **New England Journal of Medicine**, v. 328, p. 1828-1835, 1993.

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

FRIEDMAN, S. L. Liver Fibrosis – From bench to bedside. **Journal of Hepatology**, v.38, supl.1, p. 38-53, 2003.

GABBIANI, G.; KAPANCI, Y.; BARRAZONE, P.; FRANKE, W. W. Immunochemical identification of intermediate-sized filaments in human neoplastic cells: a diagnostic aid for the surgical pathologist. **American Journal of Pathology**, v. 104, p. 206-216, 1981.

GAVINHO, B.; KULEK, A. C. G.; MOLENTO, M. B. Determinação quantitativa e distribuição geográfica de *Fasciola hepatica* em bovídeos abatidos no frigorífico Argus, São José dos Pinhais, PR. **Relatório técnico**, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Outubro, CD-Rom. 2008. 46pp.

GEERTS, A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. **Seminars in Liver Diseases**, v. 21, n. 3, p. 311-335, 2001.

GIAMPIERI, M. P.; JEZEQUEL, A.M.; ORLANDI, F. The lipocytes in normal human liver. **Digestion**, v. 22, n. 3, p. 165–169, 1981.

GOLBAR, H. M.; IZAWA, T.; JUNIANTITO, V.; ICHIKAWA, C.; TANAKA, M.; KUWAMURA, M.; YAMATE, J. Immunohistochemical characterization of macrophages and myofibroblasts in fibrotic liver lesions due to *Fasciola* infection in cattle. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 7, p. 857–865, 2013.

GOMES, A. T.; CUNHA, L. M.; BASTOS, C. G.; MEDRADO, B. F.; ASSIS, B. C. A.; ANDRADE, Z. A. *Capillaria hepatica* in rats: focal parasitic hepatic lesions and septal fibrosis run independent courses. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 895-898, 2006.

GÓMEZ-MUÑOZ, M. T.; CANALS-CABALLERO, A.; ALMERIA, S.; PASQUALI, P.; ZARLENGA, D. S.; GASBARRE, L. C. Inhibition of bovine T lymphocyte responses by extracts of the stomach worm *Ostertagia ostertagi*. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 3, p. 199-214, 2004.

GOODPASTER, T.; LEGESSE-MILLER, A.; HAMEED, M. R.; AISNER, S. C.; RANDOLPH-HABECKER, J.; COLLIER, H. A. An immunohistochemical method for identifying fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 56, p. 347–358, 2008.

GUIDO, M.; RUGGE, M.; CHEMELLO, L.; LEANDRO, G.; FATTOCICH, G.; GIUSTINA, G.; CASSARO, M.; ALBERTI, A. Liver stellate cells in chronic viral hepatitis: the effect of interferon therapy. **Journal of Hepatology**, v. 24, n.3, p. 301-307, 1996.

GUYOT, C.; LEPREUX, S.; COMBE, C.; DOUDNIKOFF, E.; BIOULAC-SAGE, P.; BALABAUD, C.; DESMOULIERE, A. Hepatic fibrosis and cirrhosis: The (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, n. 2, p. 135–151, 2006.

HEATHCOTE, J.G.; GRANT, M.E. The molecular organization of basement membranes. **International review of connective tissue research**, v. 9, p. 191-193, 1981.

HILDEBRAND, K. A.; GALLANT-BEHM, C. L.; KYDD, A. S.; HART, A. D. The basics of soft tissue healing and general factors that influence such healing. **Sports Med Arthrosc**, v. 13, p. 136-44, 2005.

HINZ, B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. **Journal of Biomechanics**, v. 43, n. 1, p. 146-55, 2010.

HODŽIĆ, A.; ZUKO, A.; AVDIĆ, R.; ALIĆ, A.; OMERAGIĆ, J.; JAŽIĆ, A. Influence of *fasciola hepatica* on serum biochemical parameters and vascular and biliary system of sheep liver. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 8, n. 1, p. 92-98, 2013.

IJZER, J.; ROSKAMS, T.; MOLENBEEK, R. F.; ULTEE, T.; PENNING, L. C.; ROTHUIZEN, J.; INGH, T. V. D. Morphological characterisation of portal myofibroblasts and hepatic stellate cells in the normal dog liver. **Comparative Hepatology**, v. 5, n. 7, p.1-9, 2006.

IREDALE, J. P.; BENYON, R. C.; PICKERING, J.; MCCULLEN, M.; NORTHROP, M.; PAWLEY, S.; HOVELL, C.; ARTHUR, M. J. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 3, p. 538-549, 1998.

ISSA, R.; WILLIAMS, E.; TRIM, N.; KENDALL, T.; ARTHUR, M. J.; REICHEN, J.; BENYON, R. C.; IREDALE, J. P. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. **Gut**, v. 48, n. 4, p. 548-557, 2001.

ISSIA, L.; PIETROKOVSKY, S.; SOUSA-FIGUEIREDO, J.; STOTHARD, J. R.; WISNIVESKY-COLLI, C. *Fasciola hepatica* infections in livestock flock, guanacos and coypus in two wildlife reserves in Argentina, **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3-4, p.341-344, 2009.

JIROUTOVA, A.; MAJDIAKOVA, L.; CERMAKOVA, M.; KOHLEROVA, R.; KANTA, J. Expression of cytoskeletal proteins in hepatic stellate cells isolated from normal and cirrhotic rat liver. **Acta Medica (Hradec Kralove)**, v. 48, n. 3-4 p.137-144, 2005.

JOHNSON, S. E. **Afecções do fígado.** In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e do gato. 4. ed. São Paulo : Manole, 1997. v. 2, p. 1817-1879.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 10a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. 589p.

KEEGAN, P. S.; TRUDGETT, A. *Fasciola hepatica* in rat: immune responses associated with the development of resistance to infection. **Parasite Immunology**, v. 14, n. 6, p. 657-669, 1992.

KINNMAN, N.; HULTCRANTZ, R.; BARBU, V.; REY, C.; WENDUM, D.; POUPON, R.; HOUSSET, C. PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. **Laboratory Investigation**, v. 80, n. 5, p. 697-707, 2000.

KINNMAN, N.; FRANCOZ, C.; BARBU, V.; WENDUM, D.; REY, C.; HULTCRANTZ, R.; POUPON, R.; HOUSSET, C. The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. **Laboratory Investigation**, v. 83, n. 2, p. 163-73, 2003.

KINNMAN, N.; HOUSSET, C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. **Frontiers in bioscience**, v. 1, n. 7, p. 496-503, 2002.

KWEON, Y.; GOODMAN, Z.D.; DIESTANG, J.L.; SCHIFF, E.R.; BROWN, N.A.; BURKHARDT, E. Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. **Journal of Hepatology**, v. 35, n. 6, p. 749-755, 2001.

LAMBERT, L. A.; PERRI, H.; MEEHAN, T. J. Evolution of duplications in the transferrin family of proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 140, n. 1, p.11-25, 2005.

LEE, J. S.; SEMELA, D.; IREDALE, J.; SHAH, V. H. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte? **Hepatology**, v. 45, n. 3, p. 817-825. 2007.

LEMOS, Q. T.; ANDRADE, Z. A. Angiogenesis and experimental hepatic fibrosis. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 5, p. 611-614, 2010.

LI, Z.; DRANOFF, J. A.; CHAN, E. P.; UEMURA, M.; SEVIGNY, J.; WELLS, R. G. Transforming growth factor-beta and substrate stiffness regulate portal fibroblast activation in culture. **Hepatology**, v. 46, p. 1246-1256, 2007.

LIBBRECHT, L.; CASSIMAN, D.; DESMET, V.; ROSKAMS, T. The correlation between portal myofibroblasts and development of intrahepatic bile ducts and arterial branches in human liver. **Liver**, v. 22, n. 3, p: 252-258, 2002.

LIMA, W. S.; SOARES, L. R. M.; BARÇANTE, T. A.; GUIMARAES, M. P.; BARÇANTE, J. M. P. Occurrence of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) infection in Brazilian cattle of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.2, p. 27-30, 2009.

LORENA, D.; DARBY, I. A.; REINHARDT, D. P.; SAPIN, V.; ROSENBAUM, J.; DESMOULIERE, A. Fibrillin-1 expression in normal and fibrotic rat liver and in cultured hepatic fibroblastic cells: modulation by mechanical stress and role in cell adhesion. **Laboratory Investigation**, v. 84, p. 203–212, 2004.

LOWTHER, J.; ROBINSON, M. W.; DONNELLY, S. M.; XU, W.; STACK, C. M.; MATTHEWS, J. M.; DALTON, J. P. The Importance of pH in regulating the function of the *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine protease, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 1, p. 369, 2009.

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.

MABUCHI, A.; MULLANEY, I.; SHEARD, P.; HESSIAN, P.; ZIMMERMANN, A.; SENOO, H.; WHEATLEY, A. M. Role of hepatic stellate cells in the early phase of liver regeneration in rat: formation of tight adhesion to parenchymal cells. **Comparative Hepatology**, v. 3, supl. 1, p. 1-4, 2004.

MAGNESS, S. T.; BATALLER, R.; YANG, L.; BRENNER, D. A. A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations. **Hepatology**, v. 40, n. 5, p. 1151-1159, 2004.

MARCOS, L. A.; MACHICADO, A.; ANDRADE, R.; SAMALVIDES, F.; SANCHEZ, J.; TERASHIMA, A. Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle. **Journal of Helminthology**, v. 81, n. 4, p. 381-386, 2007.

MARCOS, R.; ROCHA, E.; HENRIQUE, R. M.F.; MONTEIRO, R. A. F. Uma nova abordagem para uma estimativa imparcial do índice de celular estreladas hepáticas no fígado de rato: um exemplo em condições saudáveis. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1101–1104, 2003.

MARCOS, L.A.; TERASHIMA, A.; YI, P.; ANDRADE, R.; CUBERO, F. J.; ALBANIS, E.; GOTUZZO, E.; ESPINOZA, J. R.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of liver fibrosis associated with experimental *Fasciola hepatica* infection: roles of Fas2 proteinase and hepatic stellate cell activation. **Journal Parasitology**, v. 97, n. 1, p.82-7. 2011.

MAS-COMA, S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. **Journal of Helminthology**, v.79, n. 3, p.207–216, 2005.

MAS-COMA, S.; VALERO, M. A.; BARGUES, M. D. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology,

evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. **Advances in Parasitology**, v.69, p.44-68, 2009.

MAS-COMA, S.; BARGUES, M. D.; ESTEBAN, J.G. **Human fasciolosis**. Dalton JP, ed. *Fasciolosis*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 1999. 411-434 p.

MEIRELLES L. S.; CAPLAN A. I.; NARDI N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 9 p. 2287-2299, 2008

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

MEKONNEN, G. A.; IJZER, J.; NEDERBRAGT, H. Tenascin-C in chronic canine hepatitis: immunohistochemical localization and correlation with necro-inflammatory activity, fibrotic stage, and expression of alpha-smooth muscle actin, cytokeratin 7, and CD3+ cells. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 803–813, 2007.

MEKROUD, A.; BENAKHLA, A.; VIGNOLES, P.; RONDELAUD, D.; DREYFUSS, G. Preliminary studies on the prevalences of natural fasciolosis in cattle, sheep, and the host snail (*Galba trunculata*) in north-eastern Algeria. **Parasitology Research**, v. 92, n. 6, p. 502-505, 2004.

MIDWOOD, K. S.; SCHWARZBAUER, J.E. Elastic fibers: building bridges between cells and their matrix. **Current Biology**, v. 12, n. 8, p. 279-81, 2002.

MILIJANA, K.; GLEDI C, D.; KUKOLJ, V.; KNEZEVIC, D. J.; JOVANOVIC, M.; JANA, K.; SANJA, A. K. Expression of α -SMA, desmin and vimentin in canine liver with fibrosis. **Acta Veterinaria (Beograd)**, v. 59, n. 4, p. 361-370, 2009.

MOLINA, E. C.; 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, n. 1-2, p. 157-163, 2005.

NEWMAN, A. C.; NAKATSU, M. N.; CHOU, W.; GERSHON, P.D.; HUGHES, CC. The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. **International review of cell and molecular biology**, v. 22, n. 20, p. 3791-3800, 2011.

NOVO, E.; DI BONZO, L. V.; CANNITO, S.; COLOMBATTO, S. & PAROLA, M. Hepatic myofibroblasts: A heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 11, p.2089-93, 2009.

OAKLEY, G.A.; OWEN, B.; KNAPP, N.H.H. Production effects of subclinical liver luke infection in growing dairy heifers. **Veterinary Record**, v. 104, n. 22, p. 503-7, 1979.

OLAECHEA, F. V. *Fasciola hepatica*. Redacción de Helminología de FAO para América Latina y el Caribe. **Conferencia Electronica**, 2004.

OLIVEIRA, D. R.; FERREIRA, D. M.; STIVAL, C. C.; ROMERO, F.; CAVAGNOLLI, F.; KLOSS, A.; ARAÚJO, F. B.; MOLENTO, M. B. Triclabendazole resistance involving *Fasciola hepatica* in sheep and goats during an outbreak in Almirante Tamandaré, Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, suppl 1, p.149-153, 2008.

OLIVEIRA, L.; SOUZA, M. M.; ANDRADE, Z. *Capillaria hepatica*-induced hepatic fibrosis in rats: paradoxical effect of repeated infections. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 2, p. 123–127, 2004.

ONORI, P.; MORINI, S.; FRANCHITTO, A.; SFERRA, R.; ALVARO, D.; GAUDIO, E. Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl₄-treated rats. **Journal of Hepatology**, v. 33, n. 4, p. 555–63, 2000.

PARKINSON, M.; O'NEILL, S. M.; DALTON, J.P. Endemic human fasciolosis in the Bolivian Altiplano. **Epidemiology and Infection**, v. 135, n. 4, p. 669–674, 2007.

PAROLA, M.; MARRA, F.; PINZANI, M. Myofibroblast—like cells and liver fibrogenesis: emerging concepts in a rapidly moving scenario. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, n. 1-2, p. 58–66, 2008.

PÉREZ, J. ORTEGA, J. MORENO, T. MORRONGO, P. LÓPEZ-SÁNDEZ, C., MARTINEZ-MORENO, A. 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, n. 1, p. 30-36, 2002.

PHIRI, A. M.; PHIRI, I. K.; SIKASUNGE, C. S.; CHEMBENSOFU, M.; MONRAD, J. Comparative fluke burden and pathology in condemned and noncondemned cattle livers from selected abattoirs in Zambia. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 4, p. 275-281, 2006.

PINZANI, M.; ROMBOUTS, K: Liver fibrosis - from the bench to clinical targets. **Digestive and Liver Disease**, v. 36, n. 4, p. 231-242, 2004.

POONKHUM, R.; PRADIDARCHEEP, W.; NILBU-NGA, S.; CHAUNCHAIYAKU, S. Distribution of Hepatic Myofibroblasts and Type I and III Collagen in Rat Liver Cirrhosis Induced by Thioacetamide. **International Journal of Morphology**, v. 29, n. 2, p. 501-508, 2011.

POVERO, D.; BUSLETTA, C.; NOVO, E.; DI BONZO, L. V.; CANNITO, S.; PATERNOSTRO, C.; PAROLA, M. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 8, p.1075-91, 2010.

PRITCHARD, G. C.; FORBES, A. B.; WILLIAMS, D. J. L.; SALIMI-BEJESTANI, M. R.; DANIEL, R. G. Emergence of fasciolosis in cattle East Anglia. **Veterinary Record**, v. 157, n. 19, p. 578-582, 2005.

PROWSE, R. K.; CHAPLIN, P.; ROBINSON, H. C.; SPITHILL, T. W. *Fasciola hepatica* cathepsin L suppresses sheep lymphocyte proliferation in vitro and modulates surface CD4 expression on human and ovine T cells. **Parasite Immunology**, v. 24, n. 2, p. 57-66, 2002.

RADOSTISTS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9ª ed., Guanabara Koogan; Rio de Janeiro, 2000.

RAMADORI, G.; SAILE, B. Portal tract fibrogenesis in the liver. **Laboratory Investigation**, v.84, n. 2, p.153–159, 2004.

RAPSCH, C.; SCHWEIZER, G.; GRIMM, F.; KOHLER, L.; BAUER, C.; DEPLAZES, P.; BRAUN, U.; TORGERSO, P. R. Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. p. 1153–1158, 2006.

RICHARDSON, M. M.; JONSSON, J. R.; POWELL, E. E.; BRUNT, E. M.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. BHATHAL, P. S.; DIXON, J. B. Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. **Gastroenterology**, v. 133, p. 80–90, 2007.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. 2ª ed. Varela; São Paulo, 2001. 658p.

ROBERT, W.; TOLAN, JR M. D. Fascioliasis due to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* infection: an update on this 'neglected' neglected tropical disease. **Lab Medicine**, v. 42, n. 2, p. 107-116, 2011.

ROBINSON, M. W.; TORT, J. F.; LOWTHER, J.; DONNELLY, S.M.; WONG, E.; XU, W.; STACK, C. M.; PADULA, M.; HERBERT, B.; DALTON, J. P. Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: expansion of a repertoire of virulence-associated factors. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, n. 6, p. 1111-23, 2008.

ROBINSON, M. W.; DALTON, J. P. Zoonotic helminth infections with particular emphasis on fasciolosis and other trematodiasis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 364, n. 1530, p. 2763-2776, 2009.

RUBEL, D.; PREPELITCHI, L.; KLEIMAN, F.; CARNEVALE, S.; WISNIVESKY-COLLI, C. Estudio de foco en un caso de fasciolosis humana en Neuquén. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 65, n. 3, p. 207-212, 2005.

RUSSO, F. P.; ALISON, M. R.; BIGGER, B. W.; AMOFAH, E.; FLOROU, A.; AMIN, F.; BOU-GHARIOS, G.; JEFFERY, R.; IREDALE, J.P.; FORBES, S. J. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. **Gastroenterology**, v. 130, n. 6, p. 1807-1821, 2006.

SAFADI, R.; FRIEDMAN, S. L. Hepatic fibrosis—role of hepatic stellate cell activation. **The Medscape Journal of Medicine**, v.4, n. 3, p. 27, 2002.

SAPPINO, A.; SCHURCH, W.; GABBIANI, G. Differentiation CD31. repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulation. **Laboratory Investigation**, v. 63, p. 144-61, 1990.

SATO, M.; SUZUKI, S.; SENOO, H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. **Cell Structure and Function**, v. 28, n. 2, p.105-112, 2003.

SCHMITT-GRAFF, A.; KRUGER, S.; BOCHARD, F.; GABBIANI, G.; DENK, H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. **The American Journal of Pathology**, v. 42, p.1233, 1991.

SEGAWA, M.; KAYANO, K.; SAKAGUCHI, E.; OKAMOTO, M.; SAKAIDA, I.; OKITA, K. Antioxidant, N-acetyl-L-cysteine inhibits the expression of the collagen $\alpha 2$ (I) promoter in the activated human hepatic stellate cell line in the absence as well as the presence of transforming growth factor-b. **Hepatology Research**, v. 24, n. 3, p. 305–315, 2002.

SERGEI, P. A. Regulação do complexo citocina na fibrose tecidual. **Life Sciences**, v. 72, p.631-643, 2002.

SERRA-FREIRE, N. M. Fasciolose hepática. **Hora Veterinária**, v.1, p.13-19, 1995.

SERRA-FREIRE, N. M. Fasciolose hepática no Brasil: análise retrospectiva e prospectiva. **Caderno Técnico-Científico da Escola de Medicina Veterinária**, Ano 1, p.9-70, 1999.

SHIRAI, W.; SATO, T.; SHIBUYA, H.; NAITO, K.; TSUKISE, A. Anatomicopathological study of vascular and biliary system using cast samples of *Fasciola*-infected bovine livers. **Journal of veterinary medicine. The physiology, pathology, clinical medicine**, v. 53, n. 5, p. 239-245, 2006.

SILVA, I. C. C.; MULLER, G.; MATTOS, M. J. T.; CASTRO, A. L. L. D.; ALMEIDA, J. E. M.; UENO, H. Fasciolose: I – incidência e importância na bovino e ovinocultura do RS. **Lavoura Arrozeira**, v. 323, n. 33, p. 34-42, 1980.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 738-46, 1999.

SKALLI, O.; ROPRAZ, P.; TRZECIAK, A.; BENZONANA, G.; GILLESSEN, D.; GABBIANI, G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. **Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 103, n. 6, p. 2787-96, 1986.

SORRELL, J. M.; CAPLAN, A. I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 5, p. 667-75, 2004.

SORRELL, J. M.; CAPLAN, A. L. Fibroblasts - a diverse population at the center of it all. **International review of cell and molecular biology**, v. 276, p. 161-241, 2009.

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

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

STACK, C. M., C. R.; CAFFREY, S. M.; DONNELLY, A. et al. Structural and functional relationships in the virulence-associated cathepsin L proteases of the parasitic liver fluke, *Fasciola hepatica*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 9896–9908, 2008.

STALKER, M. J.; HAYES, M. A. **Liver and biliary system**. In: Maxie M.G. (Ed.), JUBB, KENNEDY & PALMER'S. Pathology of Domestic Animals. 5 ed. Academic Press; San Diego, 2007. 297-388p.

STITES, D. P.; TERR, A. L.; PARLOW, T. G. **Imunologia Médica**. Rio de Janeiro: 9ª Ed., Guanabara Koogan; Rio de Janeiro, 2000. 689p.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Veterinary Parasitology**. 3rd ed. Blackwell Publishing. Oxford. 2007, 874p.

TESSELE, B.; BRUM, J.S.; BARROS, C. S. L. Lesões parasitárias encontradas em bovinos abatidos para consumo humano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 7, p. 873-889, 2013.

TIETZ-MARQUES, S. M.; SCROFERNEKER, M. L. Fasciola hepatica infection in cattle and buffaloes in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 58, n. 3-4, p.169-172, 2003.

TIEU, B. C.; JU, X.; LEE, C.; SUN, H.; LEJEUNE, W.; RECINOS, A.; BRASIER, A. R.; TILTON, G. R. Aortic adventitial fibroblasts participate in angiotensin-induced vascular wall inflammation and remodeling. **Journal Vascular Research**, v. 48, p. 261–272, 2010.

TIMOTEO, O.; MACO, JR. V.; MACO, V. R. 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., Roca Biomedicina; São Paulo, 2008.

TOMANOVIC, N.; BORICIC, I.; BRASANAC, D. Immunohistochemical analysis of alpha-SMA and GFAP expression in liver stellate cells. **Vojnosanitetski Pregled**, v. 63, n. 6, p. 553-557, 2006.

TOMANOVIC, N. R.; BORICIC, I.V.; BRASANAC, D. C.; STOJSIC, Z. M.; DELIC, D. S.; BRMBOLIC, B. J. Activated liver stellate cells in chronic viral c hepatitis: histopathological and immunohistochemical study. **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, v. 18, n. 2, p. 163-167, 2009.

TOMASEK, J. J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R. A. Myofibroblasts and mechano regulation of connective tissue remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 5, p. 349-63, 2002.

TORGERSON, P.; CLAXTON, J. **Epidemiology and Control**, p.113-139. In: DALTON J.P. Fasciolosis. Cab international; Londres, 1999, 543p.

TOSTES, R.A.; SANTAREM, V.A.; ALBERTI, H.; SANCHES, O.C. Casos autóctones de *Fasciola hepatica* na região de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n. 3, p.961-962, 2004.

TRIVILIN, L. O. **Avaliação histopatológica e imunoistoquímica de fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica***. 2010. 101 f Dissertação Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre. 2010.

TRIVILIN, L. O.; SOUSA, D. R.; NUNES, L. C.; ROCHA, N. S.; MARTINS, I. V. Histopathology aspects and fibrosis evaluation of bovine naturally infected livers by *Fasciola hepatica*. **Archives of Veterinary Science**, v.19, n.1, p.61-69, 2014.

TRIVILIN, L. O.; SOUSA, D. R.; NUNES, L. C.; MARTINS, I. V. F. Imunofenotipagem da resposta inflamatória em fígados de bovinos cronicamente e naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*, **Revista Brasileira Medicina Veterinaria**, v. 35, n. 1, p. 41-47, 2013.

TSAI, J. H.; LIU, J. Y.; WU, T. T.; HO, P. C.; HUANG, C. Y.; SHYU, J. C.; HSIEH, Y. S.; TSAI, C. C.; LIU, Y. C. Effects of silymarin on the resolution of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 15, n. 7, p. 508–514, 2008.

TUM, S.; PUOTINEN, M. L.; SKERRATT, L. F.; CHAN, B.; SOTHOEUN, S. Validation of a geographic information system model for mapping the risk of fasciolosis in cattle and buffaloes in Cambodia. **Veterinary Parasitology**, v.143, n. 3-4, p.364–367, 2007.

UCHIO, K.; TUCHWEBER, B.; MANABE, N.; GABBIANI, G.; ROSENBAUM, J.; DESMOULIÈRE, A. Cellular retinol-binding protein-1 expression and modulation during in vivo and in vitro myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells and portal fibroblasts. **Laboratory Investigation**, v. 82, p. 619–628, 2002.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L. **Parasitologia veterinária**. 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273p.

VAN VLIET, E.; MELIS, M.; FOIDART, J. M.; VAN EWIJK, W. Reticular fibroblasts in peripheral lymphoid organs identified by a monoclonal antibody. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 34, n. 7, p. 883-890, 1986.

VERED, M.; SHOHATI, B. A.; DAYAN, D. Myofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior lesions. **Oral Oncology**, v. 41, n., p.1028-1033, 2005.

VIEIRA, N. P.; FARIA, P. B.; MATTOS, M. R.; PEREIRA, A. A. Condensação de fígados bovinos na região sul do estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n. 6, p.1605-1608, 2011.

WANG, C. R.; QIU, J. H.; ZHU, X. Q.; HAN, X. H.; NI, H. B.; ZHAO, J. P.; ZHOU, Q. M.; ZHANG, H. W.; LUN, Z. R. Survey of helminths in adult sheep in heilongjiang province, people's republic of China. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 3-4, p.378-382, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The “Neglected” Neglected Worms. Action Against Worms.** Dezembro de 2006. Disponível em: www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/Newsletter10.pdf. Acesso em: 30 de outubro de 2012.

WU, J.; ZERN, M. A. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. **Journal of Gastroenterology**, v. 35, n. 9, p. 666–672, 2000.

YABE, J.; PHIRI, I.K.; PHIRI, A.M.; CHEMBENSOFU, M.; DORNY, P.; VERCRUYSSSE, J. Concurrent infections of *Fasciola*, *Schistosoma* and *Amphistomum* spp. in cattle from Kafue and Zambezi river basins of Zambia. **Journal of Helminthology**, v. 82, n. 4, p. 373–376, 2008.

YOSHIOKA, K.; ENAGA, S.; TANIGUCHI, K.; FUKUSHIMA, U.; UECHI, M.; MUTOH, K. Morphological characterization of ductular reactions in canine liver disease. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 2-3, p. 92–98, 2004.

YOVCHEV, M. I.; ZHANG, J.; NEUFELD, D. S.; GROZDANOV, P. N.; DABEVA, M. D. Thymus cell antigen-1-expressing cells in the oval cell compartment. **Hepatology**, v. 50, n. 2, p. 601–11, 2009.

ZEISBERG, M.; YANG, C.; MARTINO, M.; DUNCAN, M. B.; RIEDER, F.; TANJORE, H.; KALLURI, R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 32, 23337-23347, 2007.

8 APÉNDICE

Caracterização do imunofenótipo das células envolvidas no processo fibrótico de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepática*

Immunophenotype of the cells involved in the fibrotic process of liver of bovines chronically infected by *Fasciola hepatica*.

Dyeime R. Sousa¹, Maria Aparecida Silva², Julio L. Sequeira³, Ana Paula Madureira⁴, Louisiane de C. Nunes^{1*}

1 Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, ES, Brasil.

2 Departamento Clínica Veterinária, Universidade Estado São Paulo (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

3 Universidade Estadual Norte Fluminense, Rio de Janeiro (UENF), Campos, RJ, Brasil.

4 Departamento Estatística, Universidade São João Del Rey, São João Del Rey, Brasil.

Resumo:

A fasciolose é uma doença causada por um trematódeo *Fasciola* sp. que pode ocasionar fibrose hepática severa. Objetivou-se caracterizar o imunofenótipo das células envolvidas na fibrogênese hepática de bovinos com esta enfermidade. Para isto, 74 fígados bovinos condenados por fasciolose foram coletados para processamento histológico e imunoistoquímico com os anticorpos anti- α -SMA, anti-elastina e anti-ER-TR7. Foi realizada a classificação do grau de fibrose seguida pela identificação e quantificação de cada tipo celular no parênquima e nos espaços porta (EP). A análise estatística foi realizada pelo método descritivo e pelo teste de correlação de Spearman. No lobo hepático direito 90,5% (67/74) dos fígados foram classificados como fibrose de grau 1; 8,1% (6/74) como fibrose de grau 2 e 1,4% (01/74) como fibrose de grau 3. No lobo hepático esquerdo, 55,4% (41/74) dos fígados foram classificados como grau 1; 28,4% (21/74) como grau 2 e 16,2% (12/74) como grau 3. Houve associação positiva e significativa ($p=0,41$; $p<0,0001$) entre o grau de fibrose e o lobo hepático, revelando mais fibrose no lobo esquerdo. Observaram-se as células estreladas hepáticas (CEH) distribuídas no parênquima e miofibroblastos (MF) nos EP. Não foram encontrados fibroblastos. A média de CEH foi de 23,9 e houve correlação significativa entre os graus de fibrose ($\rho=-0,44$, $p<0,0001$) e a quantidade de CEH ($\rho=-0,61$, $p<0,0001$) nos lobos hepáticos, direito e esquerdo. Os miofibroblastos (MF) foram encontrados em torno das estruturas portais, vênula, arteríola e ducto biliar e houve correlação positiva e significativa do número de camadas em volta de cada estrutura do EP com o grau de fibrose ($\rho=0,19$, $p<0,0001$), embora, não tenha sido observada influência de qualquer estrutura do EP, em particular, sobre o grau de fibrose hepática ($p>0,05$). Conclui-se que as células CEH e os MF participam da fibrogênese de fígados bovinos com fasciolose crônica

Palavras-chaves: Bovino, Fasciolose; fibrogênese, Imunoistoquímica;

Astract

The fascioliasis is a disease caused by the parasite *Fasciola* sp. which can cause severe liver fibrosis. This study aimed to characterize the immunophenotype of cells involved in liver fibrogenesis of cattle with this disease. To this, 74 bovine livers condemned for fascioliasis were collected for histological processing and immunohistochemistry with anti- α -SMA, anti-elastin and anti-ER-TR7 antibodies. Was taken the classification of the degree of fibrosis followed by identification and quantification of each cell type in the parenchyma and portal space. Were used descriptive statistics and Spearman correlation test. In the right lobe of the liver 90.5% (67/74) was classified as fibrosis grade 1, 8.1% (6/74) as fibrosis grade 2 and 1.4% (01/74) as fibrosis grade 3. In the left hepatic lobe, 55.4% (41/74) of livers were classified as grade 1, 28.4% (21/74) as grade 2 and 16.2% (12/74) as grade 3. There were significant positive association ($\rho = 0.41$, $p < 0.0001$) between the degree of fibrosis and hepatic lobe, revealing more fibrosis in the left lobe. Observed hepatic stellate cell (HSC) distributed in the parenchyma and myofibroblasts (MF) in portal spaces. No fibroblasts were found. The mean of HSC was 23.9 and there was significant correlation between the degree of fibrosis ($\rho = -0.44$, $p < 0.0001$) and the amount of HSC ($\rho = -0.61$, $p < 0.0001$) in the right and left lobes. The MF were found around the portal structures, venules, arterioles and biliar ducts and there was positive and significant correlation between the number of layers around each structure of the EP with the degree of fibrosis ($\rho = 0.19$, $p < 0.0001$), though, has not been influenced by any structure of the portal space, in particular ($p > 0.05$). Concluded that the cells that participate in the fibrogenesis of the bovine livers with chronic fascioliasis are HSC and MF. These cells are involved in hepatic fibrogenesis because they increase in number with the progression of fibrosis.

Keyword: Cattle, fascioliasis, fibrogenesis, immunohistochemical

Introdução

A fasciolose é uma enfermidade parasitária que têm como agentes etiológicos *Fasciola hepatica* ou *Fasciola gigantica*, que acomete fígado e vias biliares de muitas espécies animais e humanos, e é considerado um problema de saúde pública em muitas regiões tropicais e subtropicais (ESPINOZA et al., 2010; MARCOS et al., 2007). Os animais se infectam com a ingestão da metacercária nas pastagens contaminadas por moluscos que são os hospedeiros intermediários (PARKINSON; O'NEILL; DALTON, 2007).

Os danos causados por essa infecção levam a grandes prejuízos econômicos à pecuária mundial, com perdas anuais superiores a três bilhões de dólares (ESPINOZA et al., 2010), 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 levar os animais a morte (DUTRA et al., 2010; MAS-COMA; VALERO; BARGUES, 2009; TOSTES et al., 2004).

Essa enfermidade pode se apresentar de forma aguda, causada pela ingestão de um grande número de formas infectantes, ocasionando destruição do parênquima, insuficiência hepática e hemorragia na cavidade peritoneal, ou de forma crônica que é resultado da ação dos trematódeos

adultos nos ductos biliares, devido a migração, onde há inflamação, edema e fibrose dos ductos biliares. Além disso, pode haver distensão, espessamento, fibrose e calcificação dos ductos biliares, o que caracteriza a cirrose biliar progressiva (ADRIEN et al., 2013; BOSTELMANN et al., 2000; TESSELE; BRUM; BARROS, 2013).

A fibrose hepática causada por *F. hepatica* coloca essa infecção parasitária no contexto das doenças crônicas do fígado (MARCOS et al., 2011), visto que a fibrose é uma alteração frequente promovida pelo acúmulo progressivo de componentes da matriz extracelular (MEC), resultando em substituição da arquitetura normal do tecido e comprometimento de sua atividade funcional (FRIEDMAN, 2000).

No fígado há vários elementos celulares capazes de sintetizar e depositar componentes da MEC como os fibroblastos portais (FBP), miofibroblastos (MF) dos vasos, fibroblastos (FB), fibroblastos derivados de medula óssea, hepatócitos, contudo, a ativação das células estreladas hepáticas (CEH) é considerada o evento mais importante na fibrogênese hepática (BATALLER; BRENNER, 2005; GUYOT et al., 2006; MAGNESS et al., 2004; RAMADORI; SAILE, 2004; UCHIO et al., 2002). No entanto, Cassiman e Roskams (2002), relataram que não há evidência clara *in vivo* que as CEH podem ser ativadas ou ainda que as CEH sejam as principais células do fígado produtoras de MEC.

Sabendo disto, Marcos et al. (2011) ainda apontaram que as informações disponíveis sobre a fibrose hepática induzida pela infecção por *F. hepatica* é escassa, tanto em animais quanto em seres humanos, e que a realização de estudos mais aprofundados no controle da infecção, bem como, nos programas de prevenção em áreas endêmicas, serão úteis para limitar a progressão da doença.

Desta forma, objetivou-se caracterizar o imunofenótipo das células que participam da fibrogênese de fígados bovinos frente à infecção por *F. hepatica* buscando obter dados sobre os mecanismos de formação e distribuição da fibrose.

Material e Métodos

1 - Coleta e processamento de material

Foram coletados 74 fígados de bovinos condenados por fasciolose, e um fígado não condenado, no matadouro frigorífico de Atílio Vivácqua, Espírito Santo, sob autorização e fiscalização do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF-ES) no período de dezembro de 2010 a janeiro de 2011.

Os fígados foram avaliados e seccionados seguindo a divisão anatômica de lobo direito e esquerdo. De cada lobo hepático foi coletado um fragmento medindo aproximadamente 2 cm³, que foram fixados em formalina 10% e, em seguida, encaminhados ao Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo para processamento histológico de rotina, coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson, para a avaliação da fibrose hepática segundo Oliveira, Souza e Andrade (2004) e da inflamação.

2 - Técnica imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica foi realizada para detectar o imunofenótipo das células que compõem a fibrose induzida pela infecção por *F. hepatica*. As amostras, anteriormente classificadas no HE, foram resubmetidas à microtomia para obtenção de cortes com 3 µm de espessura, os quais foram depositados sobre lâminas previamente tratadas com cola líquida de poli-L-lisina (P8920-Sigma Chemical CO., St. Louis MO., E.U.A.), e permaneceram na estufa a 60°C por 12 horas para fixação do tecido à lâmina. Estas lâminas foram desparafinização e hidratação, seguida do bloqueio de peroxidases endógenas com solução de água oxigenada 30 volumes diluídos em metanol, na proporção de 1:9, por 15 minutos. Após este procedimento, realizou-se lavagem em água destilada e a recuperação de antigênica.

Para a recuperação antigênica foram utilizadas duas técnicas sendo uma com solução de citrato 10mM pH 6,0, em autoclave microprocessada (Brastec® Q290M22) a 120°C por 30 segundos, para os anticorpos anti-elastina e anti-fibroblasto e uma outra recuperação também com solução de citrato 10mM pH 6,0 em panela de pressão microprocessada (Dako, S2800-1) a 125°C por 30 segundos, para o material utilizando o anticorpo anti- α -SMA.

Após essa etapa, o material foi resfriado em temperatura ambiente por 20 minutos e foi lavado em solução tampão de TRIS (TRIZMA BASE, Sigma Chemical CO., St. Louis MO., E.U.A.) pH 7,40. Em seguida, realizou-se o bloqueio de proteínas inespecíficas com solução de leite em pó Molico® a 3% durante uma hora.

Depois disso, o material foi novamente lavado em solução tampão de TRIS e incubado com cada anticorpo primário em câmara úmida por 18 horas a 4°C, as respectivas diluições dos anticorpos primários foram anti-elastin 1:100, anti-fibroblast marker 1:150 e anti-alpha smooth muscle actin 1:1250. Como controle positivo para o anticorpo α -SMA utilizou-se cordão umbilical humano, para o anticorpo anti-elastina utilizou-se fígado e artéria aorta bovina, e a para o anticorpo anti-ER-TE7 foi utilizado tecido de granulação equino. Como controle negativo foi feita a omissão do anticorpo primário em todas as amostras.

Após a incubação com os anticorpos primários, o material foi lavado em solução de TRIS e, para a amplificação da reação, utilizou-se o sistema de detecção à base de polímeros *NovoLink* (Novocastra, 7280-K) em que o material foi incubado em temperatura ambiente com cada reagente por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente com solução de TRIS e depois tratadas com solução de 3,3'-diaminobenzidina (Liquid DAB, Dako K-3466) durante cinco minutos à temperatura ambiente. O material foi lavado em água corrente seguida de água destilada e contra-corado com hematoxilina de Harris, por 30 segundos. Após isto, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos e submetidas aos processos de desidratação e montagem em resina sintética.

3 - Avaliação imunoistoquímica

A caracterização imunohistoquímica das células que compõem a fibrose hepática, como células estreladas hepáticas (CEH), miofibroblastos (MF) e fibroblastos (FB) foi baseada na morfologia de cada tipo celular e na marcação positiva destas células para cada anticorpo utilizado, conforme exposto na Tabela 1.

As células marcadas positivamente pelos anticorpos propostos foram quantificadas em dois sítios distintos, a saber: espaço porta e parênquima. A quantificação no parênquima baseou-se na contagem de células imunopositivas em cinco campos lineares aleatórios, em microscopia de luz e objetiva de 20x. Após a avaliação foi obtida a quantidade média de células por lobo hepático.

A análise imunohistoquímica no espaço porta considerou a classificação da fibrose hepática proposta. Em cada nível de classificação foram avaliados a intensidade de marcação e o número de células positivas de estruturas que compõem o espaço porta, como vênula (VP), arteríola (AP) e ducto biliar (DB). A intensidade da marcação foi obtida pela quantificação de cada estrutura observada por espaço porta e pelo número de células imunomarcadas em torno de cada estrutura. Nesta análise também foram observados cinco espaço porta aleatórios em cada lobo hepático.

4 - Análise Estatística

A análise estatística foi feita por análise descritiva com os valores expressos em percentuais e pelo teste de correlação de Spearman com nível de 5% de probabilidade de erro.

Resultados e Discussão

1 - Avaliação histológica

Na análise histológica dos fígados cronicamente infectados por *F. hepatica* observou-se que as amostras classificadas como grau 1 houve fibrose septal discreta, em pequenas áreas do espaço porta com pouco envolvimento do parênquima hepático e infiltrado inflamatório discreto predominantemente periportal (Figuras 1C e 1D).

Nas amostras classificadas como fibrose grau 2 observou-se fibrose portal difusa formando septos fibrosos delgados, geralmente, incompletos no parênquima, proliferação moderada de ductos biliares e infiltrado inflamatório discreto na região periportal (Figuras 2A e 2B). As amostras classificadas como fibrose grau 3 observou-se fibrose portal proeminente com septos fibrosos espessos, frequentemente, ligando um espaço porta a outro, conjuntamente com infiltrado inflamatório moderado predominantemente (Figuras 2C e 2D).

Observou-se que no lobo hepático direito 90,5% (67/74) dos fígados foram classificados como fibrose grau 1; 8,1% (6/74) como fibrose grau 2 e 1,4% (01/74) como fibrose grau 3 e no lobo hepático esquerdo 55,4% (41/74) dos fígados foram classificados como grau 1; 28,4% (21/74) como grau 2 e 16,2% (12/74) como grau 3. O modelo de classificação para a fibrose hepática utilizada neste estudo foi preconizado em pesquisas com *Capillaria hepatica* (OLIVEIRA; SOUZA; ANDRADE,

2004), pois esse modelo tem a vantagem da fibrose desenvolver-se em 100% dos animais infectados, além de sua cronologia pode ser prevista com uma boa margem de confiança (GOMES et al., 2006).

Na medicina humana, grau de estadiamento da fibrose hepática prediz a progressão da lesão, além de avaliar prognóstico e eficácia de tratamento (DESMET et al., 1994). No entanto, há vários modelos semiquantitativos utilizados para classificar a lesão hepática, como a escala de ISHAK, METAVIR, SBP (Sociedade Brasileira de Patologia) e a HAI (Índice de Atividade Histológica), embora nenhuma dessas escalas possa ser considerada livre de apresentar falhas, especialmente, na avaliação do grau de fibrose, devido à dependência da interpretação subjetiva do observador (BURT, 2007).

Na literatura consultada não há uma classificação estabelecida para se avaliar a progressão da lesão hepática em bovinos. Trivilin et al. (2014) propuseram uma categorização para lesão hepática em que avaliou-se além da fibrose, a hiperplasia dos ductos biliares, infiltrado inflamatório e a esclerose de vasos. Entretanto, a classificação proposta por Oliveira, Souza e Andrade (2004) tem sido mais utilizada.

Assim, Marcos et al. (2007) utilizando este método de graduação de lesão, verificaram maior prevalência de alterações hepáticas classificadas como grau 3. Por outro lado, Trivilin et al. (2014), observou maior prevalência de fibrose grau 2. Tais divergências podem ser decorrentes de diferentes critérios morfológicos avaliados, embora também possa ser devido à resposta imune de cada hospedeiro frente à infecção (MEEUSEN; PIEDRAFITA, 2003). Acredita-se que as características epidemiológicas, como temperatura, pluviosidade, altitude dos locais também possam influenciar a progressão da lesão hepática frente ao parasitismo (ALVES et al., 2011).

Apesar disto, muitos autores relataram que na infecção por *Fasciola* sp. as lesões fibróticas mais importantes, são observadas ao redor dos ductos biliares (BOSTELMANN et al., 2000; MARCOS et al., 2007; PHIRI et al., 2006; TRIVILIN et al., 2014), fato que também foi observado neste estudo.

Neste estudo, observou-se que o grau de fibrose tem associação positiva e significativa ($p=0,41$; $p<0,0001$) com o lobo hepático, revelando existir mais fibrose no lobo hepático esquerdo do que no direito.

Tessele, Brum e Barros (2013) avaliaram, macro e microscopicamente, fígados bovinos condenados por fasciolose e observaram que o lobo esquerdo frequentemente encontrava-se atrofiado e com maior presença de fibrose, respaldando os resultados obtidos neste estudo.

Além disso, segundo Shirai et al. (2006) os exemplares de *Fasciola* sp. são predominantemente encontrados no ducto biliar comum do lobo hepático esquerdo, este é o principal ducto ocupando um terço desse lobo hepático. Esse fato pode ser verificado pelas alterações fibróticas marcantes detectadas na superfície visceral.

Stalker e Hayes (2007) também relataram que a fibrose é mais ampla no lobo hepático esquerdo, por ocorrer maior parte da migração parasitária, enquanto o lobo direito mostra hipertrofia

compensatória. Como relatado por Shirai et al. (2006), a presença de um único ramo de veia porta e de um único ducto biliar no lobo hepático esquerdo, paralelo com a superfície visceral e superfície diafragmática, favorece a fibrose atrófica nesta área. Enquanto que, no lobo direito, vários ductos biliares grandes e ramos portais interligam-se uns com os outros, de modo que a infecção em um determinado ducto pode não causar o abaulamento das vias biliares na superfície, mas provocar hipertrofia compensatória em vez de atrofia, mesmo quando muitos canais biliares são afetados.

Diante disso, Hodžić et al. (2013) observaram que em fígados bovinos com fasciolose ocorre perda de continuidade dos ductos biliares menores, no lobo hepático esquerdo, decorrente do resultado da compressão causada por infiltrado inflamatório, edema e proliferação de tecido conjuntivo, esses fatores também poderiam contribuir para que o lobo esquerdo revelasse mais fibrose do que o direito.

Neste trabalho, observou-se correlação positiva e significativa entre o grau de fibrose e a intensidade de inflamação no espaço porta no lobo hepático direito ($\rho=0,25$; $p<0.048$) e esquerdo ($\rho=0,55$; $p<0.0001$).

2 - Avaliação imunoistoquímica

Em relação à caracterização do imunofenótipo das células que compõem a fibrose hepática, observaram-se somente células estreladas hepáticas e miofibroblastos nas amostras avaliadas. Não foram encontrados fibroblastos em nenhum dos fígados avaliados, nem no parênquima e nem no espaço porta, incluindo o fígado normal (Figura 3).

Com base na expressão dos anticorpos utilizados, a distribuição das CEH foi homogênea no parênquima de todos os fígados avaliados (Figura 3C), tanto no lobo direito quanto no lobo esquerdo. Entretanto, com os anticorpos utilizados não foi possível detectar a presença dessas células no espaço porta, pois neste local houve forte expressão de elastina. Assim, considerou-se que no EP encontram-se apenas miofibroblastos, pois foram elastina positiva e α -SMA positivos, tanto no lobo direito quanto no lobo esquerdo.

O anticorpo α -SMA é considerado bom marcador para a detecção de células semelhantes a miofibroblastos, em homem e rato, e um marcador confiável de CEH ativadas que precedem a deposição de tecido fibroso, assim, é útil para monitorizar a eficácia da terapia (CARPINO et al., 2005). Porém, segundo Uchio et al. (2002), até o momento, nenhum marcador permite discriminar totalmente os MF das CEH ativadas, na fase de miofibroblastos.

Visto que, nem todos os MF α -SMA positivos são derivados de CEH ativadas, considerando que além dessas células, os MF de vasos e os FBP podem expressar essa proteína, o que revela a heterogenicidade do miofibroblastos hepáticos (CASSIMAN et al., 2002; RAMADORI; SAILE, 2004).

No presente trabalho foi possível identificar as populações de MF no espaço porta quando estas células encontravam-se marcadas pelo α -SMA e elastina, entretanto, estes poderiam ser derivados de MF de vasos, FB ou de FBP. Tentando esclarecer essa dúvida utilizou-se o anticorpo ER-

TE7 (GOODPASTER et al., 2008) para detectar fibroblastos, no entanto, não houve imunomarcagem dessas células nas amostras analisadas, logo, entende-se que os MF presentes no espaço porta são derivados de MF de vasos.

Uchio et al. (2002) citaram que as células mesenquimais dos vasos presentes nos espaços porta podem ser mais importantes na formação da fibrose do que geralmente tem sido suposto, devido a grande extensão destas quando comparada com as CEH ativadas, podendo desta forma contribuir efetivamente para a fibrogênese hepática. Dados semelhantes foram verificados nestes estudo.

A ausência de FB nas amostras avaliadas pode ser decorrente da ativação dessas células para miofibroblastos (ASAHINA et al., 2009; LIBBRECHT et al., 2002; UCHIO et al., 2002). Uma vez que, na presença de lesão e/ou de células inflamatórias, os FB são estimulados a produzirem fatores TGF- β 1 e PDGF que atuam na transdiferenciação para MF (BATALLER; BRENNER, 2005; SAFADI; FRIEDMAN, 2002).

Zeisberg et al. (2007) observaram FB apenas em fígados normais utilizando um marcador específico para FB, a fibroblast specific protein-1; em torno das veias centrais e na região periportal. Porém, sabe-se que os FBP presentes nos espaços porta, em condições normais, não expressam α -SMA (PAROLA; MARRA; PINZANI, 2008) e são distintos das CEH por expressarem elastina (DUDAS et al., 2007). Contudo, observou-se neste estudo que em fígados bovinos normais há expressão de α -SMA em FBP. Também observamos que as CEH foram encontradas apenas no parênquima hepático e estavam localizadas entre os hepatócitos e espaços de Disse, corroborando com Poonkhum et al. (2011).

Em relação à quantificação das CEH no parênquima a média encontrada foi de 23,9, sendo que no lobo hepático direito foi de 22,9 e no lobo hepático esquerdo foi de 24,8. Quando analisada quantidade de CEH em cada categoria de fibrose hepática grau 1, 2 ou 3 observou-se que não houve associação entre a quantidade de CEH e o grau de fibrose no lobo hepático direito ($\rho=-0,20$; $p=0,09$) nem no lobo hepático esquerdo ($\rho=0,02$, $p=0,85$). Por outro lado, observou-se uma correlação negativa e significativa entre os graus de fibrose ($\rho=-0,44$, $p<0,0001$) e a quantidade de CEH ($\rho=-0,61$, $p<0,0001$) nos lobos hepáticos, direito e esquerdo (Figura 4). Assim, à medida que aumenta a fibrose nos lobos hepáticos, diminui a quantidade de CEH. Ao contrário do que observa-se em cães, onde a intensidade da imunomarcagem para CEH α -SMA positivas na região perissinusoidal pode variar dependendo do grau de fibrose (MILIJANA et al., 2009).

Em cães, a expressão de α -SMA não está relacionada com a ativação das CEH durante a fibrose, uma vez que o α -SMA é expresso também no tecido hepático saudável, como uma molécula constitutiva (IJZER et al., 2006; MEKONNEN; IJZER; NEDERBRAGT, 2007), contrapondo-se ao que é observado em humanos e ratos, onde há aumento das CEH com forte expressão de α -SMA durante a fibrose hepática (CASSIMAN et al., 2002).

Este aumento na CEH também foi demonstrado por Akpolat et al. (2005) e Chu, Shyu e Liaw (2008) em pacientes com hepatite crônica B e C, há uma correlação positiva significativa das CEH

ativadas com o estágio da fibrose. Segundo Schmitt-Graff et al. (1991) as CEH α -SMA positivas são responsáveis pela acúmulo de tecido fibrótico na doença hepática crônica em humanos, pois houve aumento de CEH em pacientes com doença hepática crônica quando comparado com o fígado normal, com correlação positiva entre o seu número e a extensão da fibrose. Resultados semelhantes também foram obtidos por Tsai et al. (2008), que demonstraram aumento na expressão de α -SMA na fibrose hepática quando comparado com o fígado normal.

Neste mesmo contexto, Carpino et al. (2005) demonstraram que houve correlação positiva entre a porcentagem de CEH α -SMA positivas com a progressão da fibrose hepática e sugeriram que a progressão da fibrose não está relacionada com os fatores etiológicos da doença hepática, mas sim, representa uma resposta estereotipada a insultos crônicos.

Por outro lado, Tomanovic, Boricic e Brasanac (2006) relataram, em pacientes com hepatite B crônica, que as CEH podem expressar α -SMA sem ter correlação evidente com a gravidade da lesão hepática. Existe também, estudos que relataram correlação negativa entre o estágio de fibrose e expressão de CEH α -SMA positiva na zona perivenular e no espaço portal (IREDALE et al., 1998). Esta correlação negativa pode ser explicada pela diminuição de CEH ativadas por apoptose (ISSA et al., 2001) que, segundo Beaussier et al. (2007), as CEH são mais susceptíveis a apoptose espontânea e, por isto, há maior acúmulo de miofibroblastos portais sobre as CEH, pelo menos em fibrose biliar.

Estudos em fígados com fasciolose crônica indicaram que existe associação entre a intensidade da infecção e a progressão da fibrose em diversos modelos animais (MARCOS et al., 2011), entretanto, não existem dados concretos avaliando a imunomarcagem das CEH em fígados bovinos com fasciolose e sua correlação com a progressão da fibrose.

Ao avaliar a quantidade de células imunomarcadas nos espaços porta, verificou-se aumento no número de estruturas como: arteríolas (AP), vênulas (VP) e ductos biliares (DB), bem como um aumento no número de camadas entorno de cada uma dessas estruturas, tanto no lobo hepático direito quanto no lobo hepático esquerdo (Figura 5). No entanto, não houve influência de qualquer estrutura do espaço porta, em particular, sobre o grau de fibrose hepática ($p > 0,05$).

Contudo, quando avaliou-se a influência do número de estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) sobre o grau de fibrose, observou-se correlação positiva e significativa ($\rho = 0,51$; $p < 0,0001$) com uma associação moderada, no lobo hepático direito e esquerdo (Figura 6A e B).

Neste estudo, observou-se que na fibrose induzida por *F. hepatica* há proliferação das estruturas portais como vênulas, arteríolas e ductos biliares com positividade para α -SMA e elastina, assim como o aumento do número de camadas, ou seja, miofibroblasto entorno dessas estruturas. Entretanto, não foi possível afirmar qual a estrutura que mais prolifera-se em decorrência do processo fibrótico.

Segundo, Milijana et al. (2009) os MF aumentam conforme o grau de fibrose, entorno dos vasos sanguíneos e ductos biliares em cães, devido a correlação entre o grau de fibrose, a inflamação e a proliferação das vias biliares. Porém, Poonkhum et al. (2011) demonstraram que na fibrose biliar de

cães, que embora exista proliferação de ductos biliares no espaço porta e fibrose, não há imunomarcção para α -SMA nos MF periductais.

Fabris et al. (2007) e Richardson et al. (2007) demonstraram correlação direta entre a intensidade da reação ductal com a gravidade da fibrose, em figados de humanos e em modelos animais numa variedade de etiologias, que incluem a hepatite viral C e a esteatose hepática não-alcóolica. Ramm et al. (2004), verificaram que em doenças colestáticas do fígado, a fibrose portal é decorrente da reação ductal, onde o epitélio ductal expressa proteínas que atraem e ativam as CEH levando à deposição de colágeno.

Embora, segundo Clouston et al. (2005), não existem provas de que a reação ductal promova diretamente a fibrose portal, uma vez que encontraram reação ductal mesmo sem fibrose portal (estágio 0), sugerindo que essa reação ductal precede a fibrose e que essa possa ser um estímulo comum que impulsiona as CEH e os MF a produzirem fibrose independentemente, ou que, a reação seja simplesmente um subproduto da fibrose portal.

Verificou-se que o número de camadas em volta de cada estrutura do espaço porta, apresenta correlação positiva e significativa do com o grau de fibrose ($\rho=0,19$, $p<0,0001$), tanto no lobo hepático direito quanto esquerdo (Figura 7A e B), porém uma associação fraca. Estes dados revelam que quanto maior o número de camadas em volta de determinada estrutura do espaço porta maior é o grau de fibrose.

Notou-se ainda que o número de camadas em cada estrutura do espaço porta apresenta uma correlação positiva, moderada e significativa com a quantidade de estruturas do espaço porta avaliadas ($\rho=0,35$, $p<0,0001$); ou seja, a proliferação destas estruturas pode ser explicada pelo aumento do número de camadas de fibrose em torno dessas ou vice-versa. Além disso, observou-se que no lobo hepático esquerdo houve uma correlação positiva e significativa do número de camadas em cada estrutura do espaço porta ($\rho=0,15$, $p<0,0012$), entretanto, uma associação fraca.

A proliferação de tecido conjuntivo no espaço porta tem grande influencia na fibrose hepática não só em doenças das vias biliares, mas outras doenças hepáticas crônicas que inclui as doenças virais e álcool (CLOUSTON et al., 2005), assim, Tomanovic et al. (2009) encontraram uma correlação positiva e significativa entre o estágio de fibrose e a expressão α -SMA neste local em pacientes com hepatite viral crônica tipo C.

Segundo Libbrecht et al. (2002), as células que residem na parede da artéria portal contribuem para reparar os danos no espaço porta. Kinnman e Housset (2002), Magness et al. (2004) e Uchio et al. (2002) também relataram que os MF derivados de pequenos vasos portais proliferam entorno de ductos biliares contribuindo para a fibrose hepática. Estes dados confirmam os encontrados por Beaussier et al.(2007) que verificaram uma grande quantidade de células fibrogênicas no fígado α -SMA positivas derivadas, principalmente, de células mesenquimais do espaço porta, sendo que ocorreu maior acúmulo de tecido fibroso em torno de estruturas septais/portal e ductais, tal fato

também foi verificado no presente estudo em que os MF foram observados exclusivamente nos espaços porta.

Estes achados também foram demonstrados por Kinnman et al. (2000) em ratos e humanos na fibrose biliar. Estes autores verificaram que ocorre elevada expressão de α -SMA nos MF peribiliares dos espaços porta. Entretanto, Novo et al. (2009) sugerem que a forte imunomarcação α -SMA na fibrose hepática crônica observada nos MF do tecido conjuntivo, da túnica média hiperplásica de vasos e nas células do músculo liso extravascular, podem ser consequência da angiogênese patológica durante a progressão da lesão.

Conclusão

As células que participam da fibrogênese de fígados bovinos frente à infecção por *F. hepatica* são as CEH e os MF. Que estão presentes no parênquima hepático em fígados com qualquer grau de fibrose.

Agradecimentos

Ao suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Procad e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) pela bolsa concedida.

Referências

- ADRIEN, M.L.; SCHILD, A.L.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; FISS, L.; RUAS, J.; GRECCO, F.; RAFFI, M. Acute fasciolosis in cattle in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 705-709, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100736X201300060000&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 11 de Jan. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600003>.
- AKPOLAT, N.; YAHSI, S.; GODEKMERDAN, A.; YALNIZ, M.; DEMIRBAG, K. The value of α -SMA in the evaluation of hepatic fibrosis severity in hepatitis B infection and cirrhosis development: a histopathological and immunohistochemical study. **Histopathology**, v. 47, n. 3, p.276–280, 2005.
- ALVES, D. P.; CARNEIRO, M. B.; MARTINS, I. V. F.; BERNARDO, C. C.; DONATELE, D. M.; PEREIRA JÚNIOR, O. S.; ALMEIDA, B. R.; AVELAR, B. R.; LEÃO, A. G. C. Distribution and factors associated with *Fasciola hepatica* infection in cattle in the south of Espírito Santo State, Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. 271-276, 2011.
- ASAHINA, K.; TSAI, L.Y.; LI, P.; ISHII, M.; MAXSON, R.E.; SUICOV, H.M.; TSUKAMOTO, H. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. **Hepatology**, v. 49, n. 3, p. 998-1011, 2009.

- BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 2, p. 209–218, 2005.
- BEAUSSIER, M.; WENDUM, D.; SCHIFFER, E.; DUMONT, S.; REY, C.; LIENHART, A.; HOUSSET, C. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. **Laboratory Investigation**, v. 87, n. 3, p. 292-303, 2007.
- BOSTELMANN, S. C. W.; LUZ, E.; SOCCOL, V. T.; CIRIO, S. M. Histopatologia comparativa em fígados de bovinos, bubalinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*. **Archives of Veterinary Science**, v. 5, p. 95-100, 2000.
- BRUNT, E. M. **Non-alcoholic fatty liver disease**. In: BURT, A. D.; PORTMANN, B. C.; FERREL, L. D. editors. *MacSween's pathology of the liver*. 5th ed. London: Churchill-Livingstone; 2007. p. 367-98.
- CARPINO, G.; MORINI, S.; GINANNI CORRADINI, S.; FRANCHITTO, A.; MERLI, M.; SICILIANO, M.; GENTILI, F.; ONETTI MUDA, A.; BERLOCO, P.; ROSSI, M.; ATTILI, A. F.; GAUDIO, E. Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation. **Digestive and Liver Disease**, v. 37, n. 5, p. 349-356, 2005.
- CASSIMAN, D.; LIBBRECHT, L.; DESMET, V.; DENEFF, C.; ROSKAMS, T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. **Journal of Hepatology**, v. 36, n. 2, p. 200–209, 2002.
- CASSIMAN, D.; ROSKAMS, T. Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research. **Journal of Hepatology**, v. 37, n. 4, p. 527–535, 2002.
- CHU, C. M.; SHYU, W. C.; LIAW, Y. F. Comparative studies on expression of alpha smooth muscle actin in hepatic stellate cells in chronic hepatitis B and C. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 53, n. 5, p. 1364-1369, 2008.
- CLOUSTON, A. D.; POWELL, E. E.; WALSH, M. J.; RICHARDSON, M. M.; DEMETRIS, A. J.; JONSSON, J. R. Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. **Hepatology**, v. 41, n. 4, p. 809–818, 2005.
- DESMET, V. J.; GERBER, M.; HOOFNAGLE, J. H.; MANNS, M.; SCHEUER, P. J. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. **Hepatology**, v. 19, n. 6, p. 1513-1520, 1994.
- DUDAS, J.; MANSUROGLU, T.; BATUSIC, D.; SAILE, B.; RAMADORI, G. Thy-1 is an in vivo and in vitro marker of liver myofibroblasts. **Cell and Tissue Research**, v. 329, n. 3, p. 503–14, 2007.
- DUTRA, L. H.; MOLENTO, M. B.; NAUMANN, C. R. C.; BIONDO, A. W.; FORTES, F. S.; SAVIO, D.; MALONE, J. B. Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using geographic information systems. **Veterinary Parasitology**, v.169, n. 1-2, p. 76–81, 2010.
- ESPINOZA, J. R.; TERASHIMA, A.; HERRERA-VELIT, P.; MARCOS, L. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v. 27, n. 4, p. 604-12, 2010.

- FABRIS, L.; CADAMURO, M.; GUIDO, M.; SPIRLI, C.; FIOROTTO, R.; COLLEDAN, M.; TORRE, G.; ALBERTI, D.; SONZOGNI, A.; OKOLICSANYI, L.; STRAZZABOSCO, M. Analysis of liver repair mechanisms in Alagille syndrome and biliary atresia reveals a role for notch signaling. **American Journal of Pathology**, v. 171, n. 2, p. 641–653, 2007.
- FRIEDMAN, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 4, p.2247-2250, 2000.
- GOMES, A. T.; CUNHA, L. M.; BASTOS, C. G.; MEDRADO, B. F.; ASSIS, B. C. A.; ANDRADE, Z. A. *Capillaria hepatica* in rats: focal parasitic hepatic lesions and septal fibrosis run independent courses. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 895-898, 2006.
- GOODPASTER, T.; LEGESSE-MILLER, A.; HAMEED, M. R.; AISNER, S. C.; RANDOLPH-HABECKER, J.; COLLER, H. A. An immunohistochemical method for identifying fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 56, p. 347–358, 2008.
- GUYOT, C.; LEPREUX, S.; COMBE, C.; DOUDNIKOFF, E.; BIOULAC-SAGE, P.; BALABAUD, C.; DESMOULIERE, A. Hepatic fibrosis and cirrhosis: The (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, n. 2, p. 135–151, 2006.
- HODŽIĆ, A.; ZUKO, A.; AVDIĆ, R.; ALIĆ, A.; OMERAGIĆ, J.; JAŽIĆ, A. Influence of *fasciola hepatica* on serum biochemical parameters and vascular and biliary system of sheep liver. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 8, n. 1, p. 92-98, 2013.
- IJZER, J.; ROSKAMS, T.; MOLENBEEK, R. F.; ULTEE, T.; PENNING, L. C.; ROTHUIZEN, J.; INGH, T. V. D. Morphological characterisation of portal myofibroblasts and hepatic stellate cells in the normal dog liver. **Comparative Hepatology**, v. 5, n. 7, p.1-9, 2006.
- IREDALE, J. P.; BENYON, R. C.; PICKERING, J.; MCCULLEN, M.; NORTHROP, M.; PAWLEY, S.; HOVELL, C.; ARTHUR, M. J. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 3, p. 538-549, 1998.
- ISSA, R.; WILLIAMS, E.; TRIM, N.; KENDALL, T.; ARTHUR, M. J.; REICHEN, J.; BENYON, R. C.; IREDALE, J. P. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. **Gut**, v. 48, n. 4, p. 548-557, 2001.
- KINNMAN, N.; HULTCRANTZ, R.; BARBU, V.; REY, C.; WENDUM, D.; POUPON, R.; HOUSSET, C. PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. **Laboratory Investigation**, v. 80, n. 5, p. 697-707, 2000.
- KINNMAN, N.; HOUSSET, C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. **Frontiers in bioscience**, v. 1, n. 7, p. 496-503, 2002.
- LIBBRECHT, L.; CASSIMAN, D.; DESMET, V.; ROSKAMS, T. The correlation between portal myofibroblasts and development of intrahepatic bile ducts and arterial branches in human liver. **Liver**, v. 22, n. 3, p: 252–258, 2002.

- MAGNESS, S. T.; BATALLER, R.; YANG, L.; BRENNER, D. A. A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations. **Hepatology**, v. 40, n. 5, p. 1151-1159, 2004.
- MARCOS, L. A.; MACHICADO, A.; ANDRADE, R.; SAMALVIDES, F.; SANCHEZ, J.; TERASHIMA, A. Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle. **Journal of Helminthology**, v. 81, n. 4, p. 381-386, 2007.
- MARCOS, L.A.; TERASHIMA, A.; YI, P.; ANDRADE, R.; CUBERO, F. J.; ALBANIS, E.; GOTUZZO, E.; ESPINOZA, J. R.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of liver fibrosis associated with experimental *Fasciola hepatica* infection: roles of Fas2 proteinase and hepatic stellate cell activation. **Journal Parasitology**, v. 97, n. 1, p.82-7. 2011.
- MAS-COMA, S.; VALERO, M. A.; BARGUES, M. D. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. **Advances in Parasitology**, v.69, p.44-68, 2009.
- 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.
- MEKONNEN, G. A.; IJZER, J.; NEDERBRAGT, H. Tenascin-C in chronic canine hepatitis: immunohistochemical localization and correlation with necro-inflammatory activity, fibrotic stage, and expression of alpha-smooth muscle actin, cytokeratin 7, and CD3+ cells. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 803–813, 2007.
- MILIJANA, K.; GLEDI C, D.; KUKOLJ, V.; KNEZEVIC, D. J.; JOVANOVIC, M.; JANA, K.; SANJA, A. K. Expression of α -SMA, desmin and vimentin in canine liver with fibrosis. **Acta Veterinaria (Beograd)**, v. 59, n. 4, p. 361-370, 2009.
- NOVO, E.; DI BONZO, L. V.; CANNITO, S.; COLOMBATTO, S. & PAROLA, M. Hepatic myofibroblasts: A heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 11, p.2089-93, 2009.
- OLIVEIRA, L.; SOUZA, M. M.; ANDRADE, Z. *Capillaria hepatica*-induced hepatic fibrosis in rats: paradoxical effect of repeated infections. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 2, p. 123–127, 2004.
- PARKINSON, M.; O'NEILL, S. M.; DALTON, J.P. Endemic human fasciolosis in the Bolivian Altiplano. **Epidemiology and Infection**, v. 135, n. 4, p. 669–674, 2007.
- PAROLA, M.; MARRA, F.; PINZANI, M. Myofibroblast—like cells and liver fibrogenesis: emerging concepts in a rapidly moving scenario. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, n. 1-2, p. 58–66, 2008.
- PHIRI, A. M.; PHIRI, I. K.; SIKASUNGE, C. S.; CHEMBENSOFU, M.; MONRAD, J. Comparative fluke burden and pathology in condemned and noncondemned cattle livers from selected abattoirs in Zambia. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 4, p. 275-281, 2006.

- POONKHUM, R.; PRADIDARCHEEP, W.; NILBU-NGA, S.; CHAUNCHAIYAKU, S. Distribution of Hepatic Myofibroblasts and Type I and III Collagen in Rat Liver Cirrhosis Induced by Thioacetamide. **International Journal of Morphology**, v. 29, n. 2, p. 501-508, 2011.
- RAMADORI, G.; SAILE, B. Portal tract fibrogenesis in the liver. **Laboratory Investigation**, v.84, n. 2, p.153–159, 2004.
- RICHARDSON, M. M.; JONSSON, J. R.; POWELL, E. E.; BRUNT, E. M.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. BHATHAL, P. S.; DIXON, J. B. Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. **Gastroenterology**, v. 133, p. 80–90, 2007.
- SAFADI, R.; FRIEDMAN, S. L. Hepatic fibrosis—role of hepatic stellate cell activation. **The Medscape Journal of Medicine**, v.4, n. 3, p. 27, 2002.
- SCHMITT-GRAFF, A.; KRUGER, S.; BOCHARD, F.; GABBIANI, G.; DENK, H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. **The American Journal of Pathology**, v. 42, p.1233, 1991.
- SHIRAI, W.; SATO, T.; SHIBUYA, H.; NAITO, K.; TSUKISE, A. Anatomicopathological study of vascular and biliary system using cast samples of *Fasciola*-infected bovine livers. **Journal of veterinary medicine. The physiology, pathology, clinical medicine**, v. 53, n. 5, p. 239-245, 2006.
- STALKER, M. J.; HAYES, M. A. **Liver and biliary system**. In: Maxie M.G. (Ed.), JUBB, KENNEDY & PALMER'S. Pathology of Domestic Animals. 5 ed. Academic Press; San Diego, 2007. 297-388p.
- TESSELE, B.; BRUM, J.S.; BARROS, C. S. L. Lesões parasitárias encontradas em bovinos abatidos para consumo humano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v .33, n. 7, p. 873-889, 2013.
- TOMANOVIC, N.; BORICIC, I.; BRASANAC, D. Immunohistochemical analysis of alpha-SMA and GFAP expression in liver stellate cells. **Vojnosanitetski Pregled**, v. 63, n. 6, p. 553-557, 2006.
- TOMANOVIC, N. R.; BORICIC, I.V.; BRASANAC, D. C.; STOJSIC, Z. M.; DELIC, D. S.; BRMBOLIC, B. J. Activated liver stellate cells in chronic viral c hepatitis: histopathological and immunohistochemical study. **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, v. 18, n. 2, p. 163-167, 2009.
- TOSTES, R.A.; SANTAREM, V.A.; ALBERTI, H.; SANCHES, O.C. Casos autóctones de *Fasciola hepatica* na região de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n. 3, p.961-962, 2004.
- TRIVILIN, L. O.; SOUSA, D. R.; NUNES, L. C.; ROCHA, N. S.; MARTINS, I. V. Histopathology aspects and fibrosis evaluation of bovine naturally infected livers by *Fasciola hepatica*. **Archives of Veterinary Science**, v.19, n.1, p.61-69, 2014.

TSAI, J. H.; LIU, J. Y.; WU, T. T.; HO, P. C.; HUANG, C. Y.; SHYU, J. C.; HSIEH, Y. S.; TSAI, C. C.; LIU, Y. C. Effects of silymarin on the resolution of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 15, n. 7, p. 508–514, 2008.

UCHIO, K.; TUCHWEBER, B.; MANABE, N.; GABBIANI, G.; ROSENBAUM, J.; DESMOULIÈRE, A. Cellular retinol-binding protein-1 expression and modulation during in vivo and in vitro myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells and portal fibroblasts. **Laboratory Investigation**, v. 82, p. 619–628, 2002.

ZEISBERG, M.; YANG, C.; MARTINO, M.; DUNCAN, M. B.; RIEDER, F.; TANJORE, H.; KALLURI, R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 32, 23337-233347, 2007.

TABELA 1 – Caracterização do imunofenótipo de cada tipo celular envolvido na fibrose hepática em bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* de acordo com a positividade para cada anticorpo.

Tipo celular	Anticorpo anti- α -SMA	Anticorpo anti-elastina	Anticorpo anti-fibroblasto
CEH	+	-	-
MF	+	+	-
FB	-	+	+

+ Marcação imunohistoquímica positiva; - Ausência de marcação imunohistoquímica. *Adaptado Ramadori e Saile (2004)

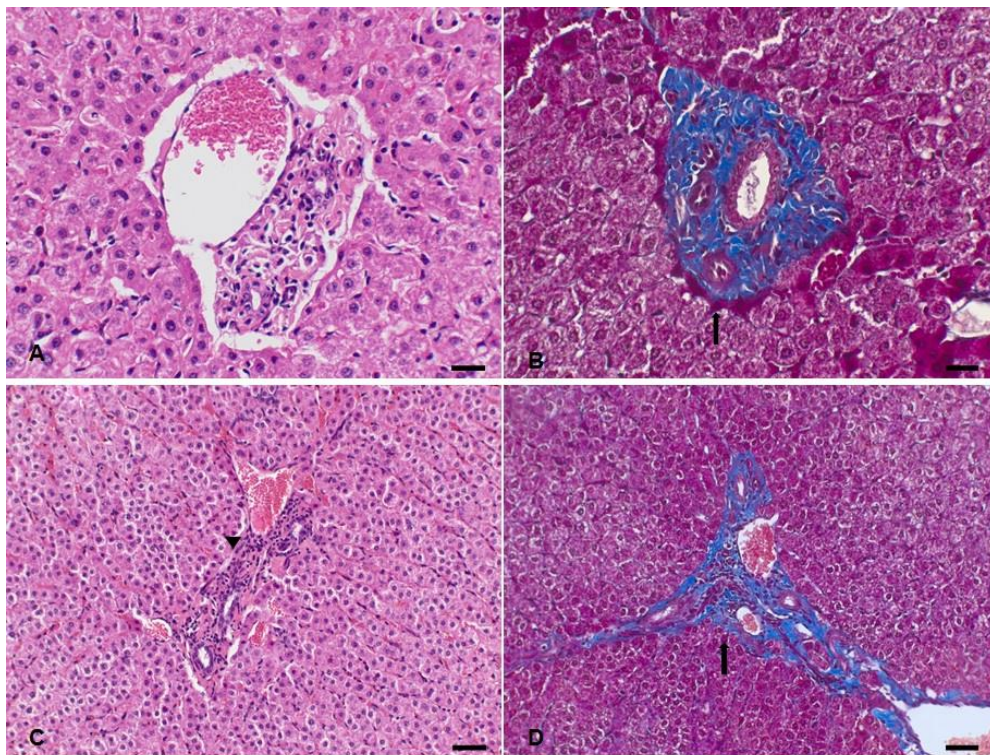


Figura 1 - Fotomicrografia de fígado bovino. A) Fígado não condensado por fasciolose no matadouro frigorífico, com degeneração moderada e congestão discreta. Hematoxilina e eosina (HE), barra 6,4 μ m. B) Tecido conjuntivo ao redor das estruturas do espaço porta (seta) em fígado não condensado por fasciolose no matadouro frigorífico. Tricrômico de Masson, barra 6,4 μ m. C) Infiltrado inflamatório discreto na região portal (cabeça de seta) em fígado condensado por fasciolose. Fibrose grau 1. HE, barra 14,5 μ m. D) Fibrose portal discreta (seta), grau 1, em fígado condensado por fasciolose. Tricrômico de Masson, barra 14,5 μ m.

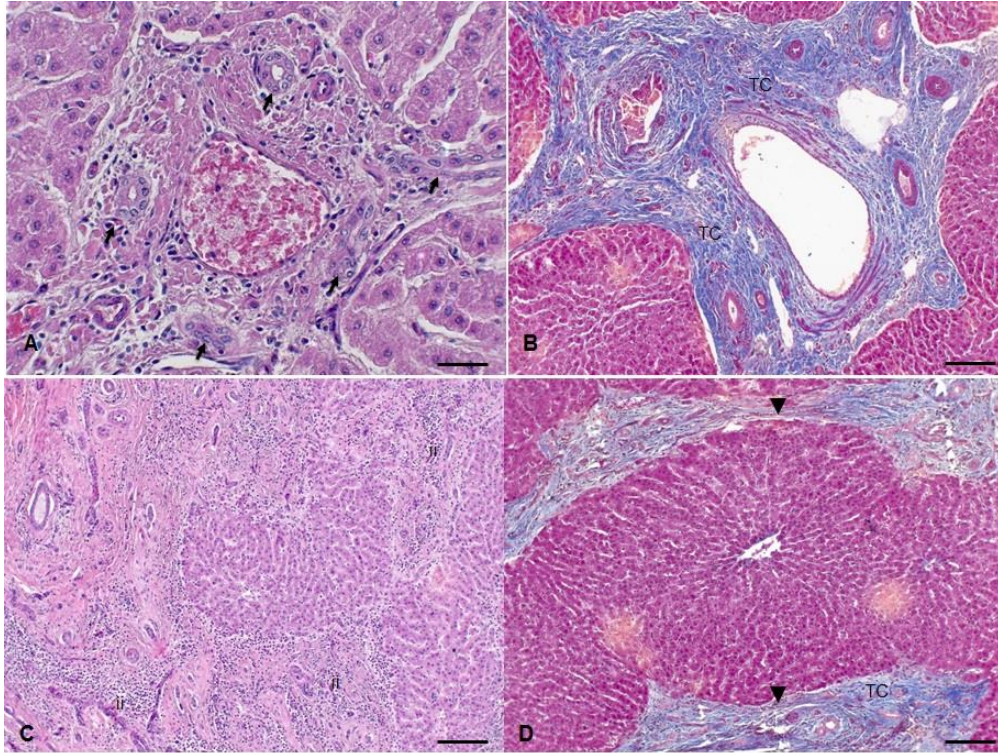


Figura 2 - Fígado bovino condensado por fasciolose. A) Espaço porta com proliferação de ductos biliares (setas), fibrose grau 2. HE, barra 6,4 μm . B) Tecido conjuntivo (TC) distribuído difusamente, formando septos delgados entorno do espaço porta, na fibrose grau 2. Tricrômico de Masson, barra 46,5 μm . C) Fibrose grau 3 apresentando infiltrado inflamatório (ii) intenso na região do espaço porta. HE, barra 46,5 μm . D) Fibrose grau 3, revelando tecido conjuntivo (TC) em ponte, unindo um espaço porta a outro (cabeça da seta). Tricrômico de Masson, barra 46,5 μm .

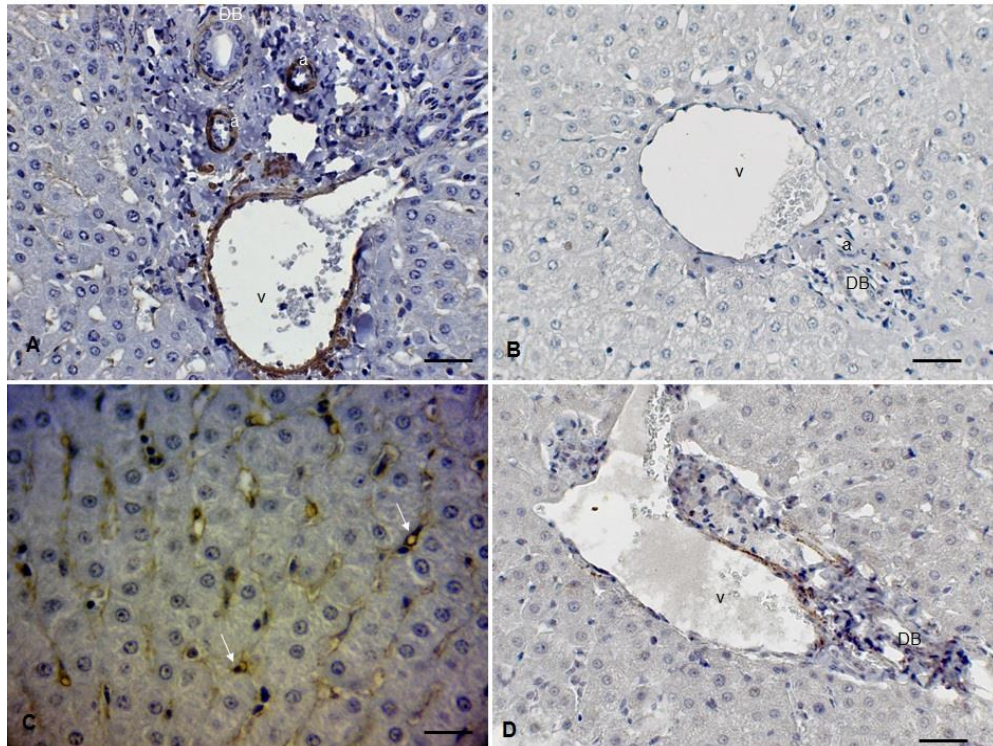


Figura 3 - Imunoistoquímica de fígado bovino condenado por fasciolose. A) Miofibroblastos em torno de arteríolas (a), vênulas (v) e ductos biliares (DB), imunomarcados com o anticorpo α -SMA, barra 14,5 μ m. B) Região de espaço porta com arteríola (a), vênula (v) e ducto biliar (DB) com ausência de imunomarcção para fibroblasto. Anticorpo ER-TE7, barra 14,5 μ m. C) Células estreladas hepáticas α -SMA positivas (setas) com predominante distribuição no parênquima, fibrose grau 1. Barra 6,4 μ m. D) Miofibroblastos imunomarcados com elastina em torno de vênulas (v) e arteríolas (a) e ductos biliares (DB). Anticorpo anti-Elastina, barra 14,5 μ m.

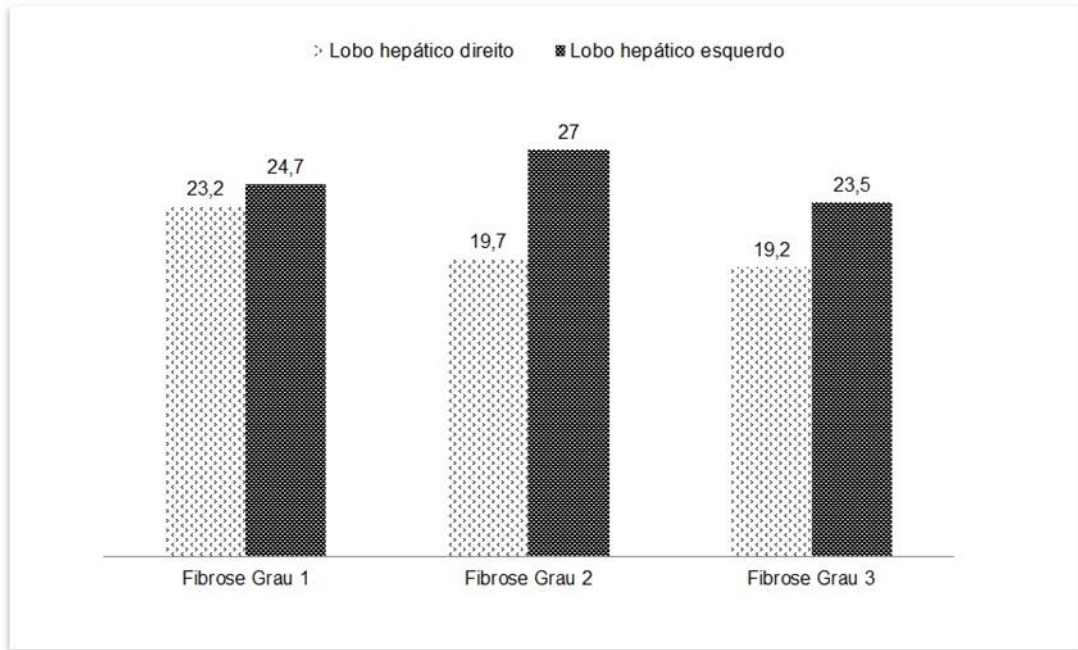


Figura 4 - Valores médios de células estreladas hepáticas (CEH) encontradas em fígados bovinos condenados por fasciolose por grau de fibrose e por lobo hepático.

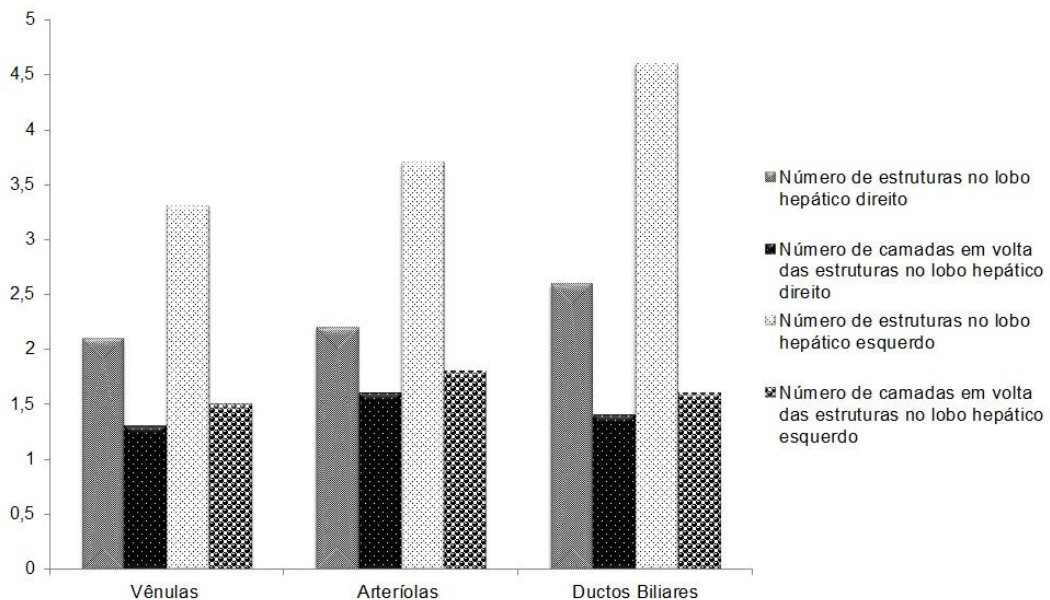


Figura 5 - Valores médios da quantidade de estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) e do número de camadas de miofibroblastos entorno dessas estruturas por lobo hepático em fígados bovinos infectados por *F. hepatica*.

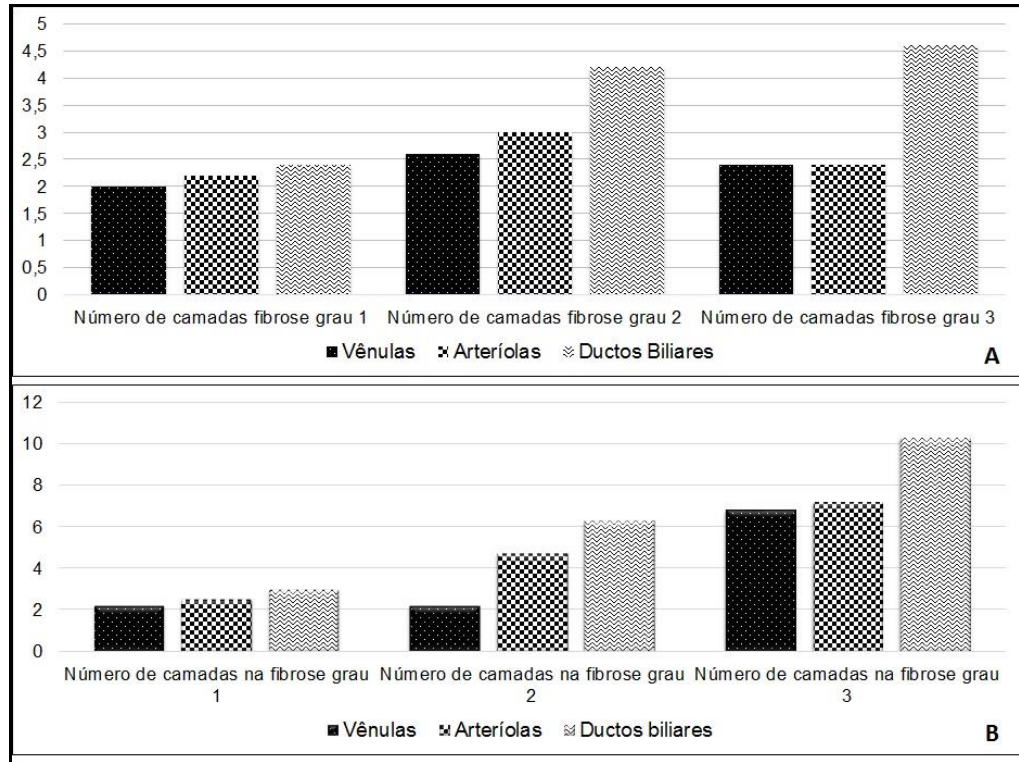


Figura 6 - Valores médios do número de estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) encontradas em cada lobo hepático em relação ao grau de fibrose. A) Número de estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) no lobo hepático direito. B) Número de estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) no lobo hepático esquerdo.

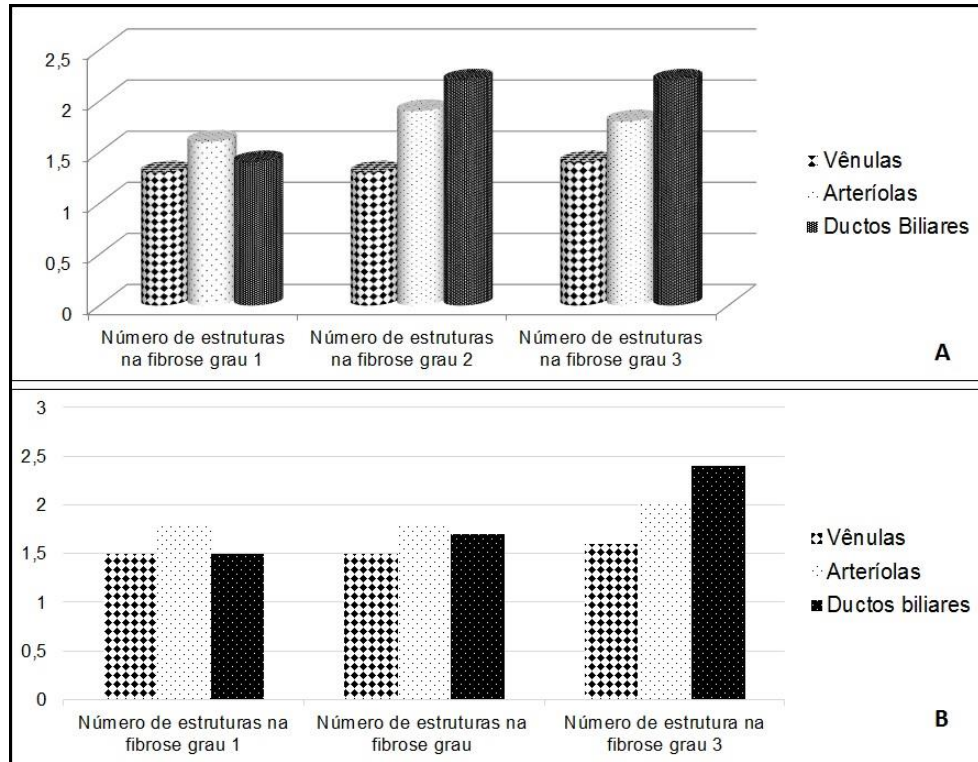


Figura 7 - Valores médios do número de camadas em volta das estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) encontradas em cada lobo hepático em relação ao grau de fibrose. A) Número de camadas em volta das estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) no lobo hepático direito. B) Número de camadas em volta das estruturas (vênulas, arteríolas e ductos biliares) no lobo hepático esquerdo.