

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

FABIANA MARIA DO AMARAL BRAVO DE PAULA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DE FÍGADOS BOVINOS
COM FASCIULOSE CRÔNICA**

ALEGRE – ES

2014

FABIANA MARIA DO AMARAL BRAVO DE PAULA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DE FÍGADOS BOVINOS
COM FASCIULOSE CRÔNICA**

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: Prof. 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)

Paula, Fabiana Maria do Amaral Bravo de, 1980-

P324c Caracterização morfológica e histoquímica de fígados bovinos com fasciolose crônica / Fabiana Maria do Amaral Bravo de Paula. – 2014.
67 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 hepática. 3. Cirrose hepática. I. Nunes, Louisiane de Carvalho. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 619

FABIANA MARIA DO AMARAL BRAVO DE PAULA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DE FÍGADOS BOVINOS
COM FASCIULOSE CRÔNICA**

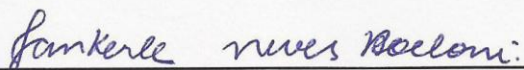
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em diagnóstico e terapêutica das enfermidades clinico-cirúrgicas.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2014.

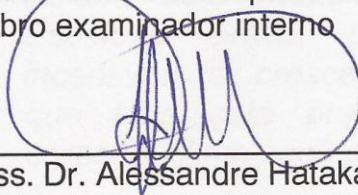
COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof.^a. Dr.^a. Louisiane de Carvalho Nunes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



Prof.^a. Dr.^a. Jankerle Neves Boeloni
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro examinador interno



Prof. Ass. Dr. Alexandre Hataka
Universidade Estadual Paulista
Membro examinador externo

Dedico este trabalho à Fernando Antônio Espinoso Bravo, pessoa linda que me incentivou a crescer intelectualmente, mas, que hoje está presente apenas em meu coração - Amo você pai

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre ao meu lado;

Ao meu esposo Alessandro Araújo de Paula por me estimular a conquistar meus sonhos e por me compreender nos momentos de ausência;

À minha mãe Maria das Graças do Amaral Bravo e minha tia Maura Pacheco do Amaral por estarem sempre ao meu lado me ajudando a cuidar das minhas filhinhas Alessandra Maria Bravo de Paula e Camile Maria Bravo de Paula;

À minha orientadora Dra. Louisiane de Carvalho Nunes por aceitar me orientar e pela paciência;

À Professora Dra. Jankerle Neves Boeloni pelas palavras de conforto;

Aos amigos de laboratório Dyeime Ribeiro de Sousa, Anderson Barros Archanjo e Suzanny Oliveira Mendes pela amizade e auxílio indispensável em todas as etapas do experimento.

Ao professor José Romário de Carvalho pela ajuda nas análises estatísticas;

À amiga de trabalho professora Paula Alvarez Cabanez pela compreensão e colaboração com os encargos didáticos;

Àqueles que direta ou indiretamente me ajudaram na realização desta tarefa.

Muito obrigada a todos.

“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento”.

Platão

RESUMO

PAULA, FABIANA MARIA DO AMARAL BRAVO DE. **CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DE FÍGADOS BOVINOS COM FASCIULOSE CRÔNICA**. 2014. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2014.

A fasciolose bovina produz danos graves ao fígado e é causada pelo parasito *Fasciola hepatica*. Objetivou-se caracterizar as alterações morfológicas e histoquímicas do tecido hepático em bovinos com fasciolose crônica, bem como, identificar os focos de metaplasia. Foram coletados 47 fígados de bovinos condenados por fasciolose e 12 fígados normais utilizados para controle, no matadouro frigorífico de Atílio Vivacqua, ES. Foi feita a contagem de parasitos e coleta de cinco fragmentos de cada lobo, direito e esquerdo, dos fígados acometidos pela enfermidade, totalizando 235 amostras por lobo. O grupo controle foram coletados apenas um fragmento por fígado. Todo material foi fixado em formol a 10% e submetido ao processamento histológico e coloração por HE e PAS. Foi feita a análise microscópica com base na distribuição da fibrose em graus 1, 2 e 3 e no tipo e intensidade do infiltrado inflamatório, seguida da avaliação dos focos de metaplasia. A avaliação estatística foi feita pelo método descritivo e pelo teste de Mann-Whitney com 5% de probabilidade. Não foi verificada diferença entre o número de parasitos por lobo hepático, porém o lobo esquerdo apresentou maior intensidade parasitária. A fibrose foi observada em todas as amostras prevalecendo a de grau 1. Houve diferença significativa entre fígados com *F. hepatica* e fígados normais quanto ao grau de fibrose, tanto para o lobo direito quanto para o esquerdo e entre estes. O infiltrado inflamatório revelou predominância de células mononucleadas de intensidade discreta. Houve diferença entre a intensidade do infiltrado inflamatório entre os lobos direito e esquerdo do fígado. A presença de eosinófilos também foi verificada, porém em menor quantidade. Em relação aos focos de metaplasia observou-se que 53,19% das amostras do lobo direito apresentaram estas

alterações enquanto que, no lobo esquerdo, este percentual foi de 57,45%, entretanto, não foram encontradas diferenças significativas entre a ocorrência de metaplasia entre os lobos direito e esquerdo. Foi observada maior prevalência de produção de muco em intensidade discreta e moderada, no entanto, não houve diferença entre a quantidade de muco produzida entre os lobos hepáticos. Conclui-se que a fibrose é alteração mais marcante em fígados cronicamente infectados por *F. hepatica* sendo mais evidente no lobo hepático esquerdo. O infiltrado inflamatório foi predominantemente mononuclear e discreto e também mais prevalente no lobo esquerdo. Os focos de metaplasia estão presentes nos fígados com fasciolose crônica e possuem diferença na intensidade de muco produzido.

Palavras-chave: *Fasciola hepatica*; Fibrose; PAS

ABSTRACT

PAULA, FABIANA MARIA DO AMARAL BRAVO DE. **MORPHOLOGIC AND HISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE BOVINE LIVER WITH CHRONIC FASCIOLIASIS**. 2014. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2014.

Bovine fascioliasis produces severe damage to the liver and is caused by the parasite *Fasciola hepatica*. This study aimed to characterize the morphological and histochemical changes of the liver tissue with chronic fascioliasis in cattle, as well as identify the foci of metaplasia. Were collected 47 bovine livers condemned for fascioliasis and 12 normal livers used to control in the slaughterhouse from Atilio Vivacqua, ES. Counting parasites and collecting five fragments of each lobe, right and left livers affected by illness, totaling 235 samples per lobe was taken. The control group were collected only a fragment of liver. All material was fixed in 10% formalin and subjected to histological analysis and stained by HE and PAS. Microscopic analysis were based on the distribution of fibrosis in degrees 1, 2 and 3 and in the type and intensity of the inflammatory infiltrate, followed by evaluation of the foci of metaplasia. Statistical evaluation was taken by descriptive method and by Mann-Whitney test at 5% probability. No difference was observed between the number of parasites per lobe but the left lobe showed higher parasitic intensity. Fibrosis was observed in all samples and prevailed grade 1. There was significant difference between degree of fibrosis in the liver with fascioliasis and normal liver and between the hepatic lobes. The inflammatory infiltrate showed a predominance of mononuclear cells of discrete intensity. Was difference between the intensity of the inflammatory infiltrate between the right and left lobes of the liver. The presence of eosinophils was also observed, but at a lower amount. In relation to metaplasia foci was observed that 53.19% of the samples of the right lobe showed these changes while in the left lobe, this percentage was 57.45%, however, no significant differences were found between the occurrence of metaplasia between the right and left lobes. Was observed higher prevalence of mucus production in discrete to

moderate intensity, however, there was no difference between the amount of mucus produced between the hepatic lobes. We conclude that fibrosis is most outstanding change in livers chronically infected with *F. hepatica* and was more evident in the left hepatic lobe. The inflammatory infiltrate was predominantly mononuclear and discrete and also more prevalent in the left lobe. The foci of metaplasia are present in livers with chronic fascioliasis and have differences in the intensity of mucus produced.

Key words *Fasciola hepatica*; Fibrosis; PAS

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1 –	Figura 1. Fotomicrografia de fígado de bovino com fasciolose crônica. A) Fibrose discreta ao redor dos ductos biliares, Grau 1, Lobo direito, Barra=70µm; B) Fibrose moderada com formação de septos incompletos, Grau 2, Lobo direito, Barra=70µm; C) Fibrose com septos proeminentes dividindo o parênquima em lóbulos, Grau 3, Lobo direito, Barra=437,5µm; D) Fibrose Grau 1, Lobo esquerdo, Barra=67,8µm; E) Fibrose Grau 2, Lobo esquerdo, Barra=67,8µm; F) Fibrose Grau 3, Lobo esquerdo, Barra=67,8µm. Coloração de hematoxilina e eosina.....	30
Figura 2 –	Figura 2. Fotomicrografia de fígado de bovino com fasciolose crônica. A) Infiltrado inflamatório discreto, Lobo direito, Barra=70µm; B) Infiltrado inflamatório moderado, Lobo direito, Barra=70µm; C) Infiltrado inflamatório acentuado, Lobo direito Barra=70µm; D) Infiltrado inflamatório discreto, Lobo esquerdo, Barra=72,25µm; E) Infiltrado inflamatório moderado, Lobo esquerdo, Barra=72,25µm; F) Infiltrado inflamatório acentuado, Lobo esquerdo, Barra=72,25µm. Coloração de hematoxilina e eosina.....	34
Figura 3 –	Figura 3. Fotomicrografia de fígado de bovino com fasciolose crônica. A) Foco de metaplasia do epitélio ductal, Barra=74,6µm. Coloração de hematoxilina e eosina; B) Muco em intensidade discreta no interior das células metaplásicas, Barra=23,3µm; C) Muco em intensidade moderada no interior das células metaplásicas, Barra=21,8µm; D) Muco em intensidade acentuada no interior das células metaplásicas, Barra=21,8 µm. Coloração de PAS.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Tabela 1 –	Medianas e percentis dos graus de fibrose nos lobos direito e esquerdo de fígados normais e com fasciolose, Alegre-ES.....	32
Tabela 2 –	Medianas e percentis da intensidade do infiltrado inflamatório nos lobos direito e esquerdo de fígados com fasciolose, Alegre-ES.....	35
Tabela 3 –	Medianas e percentis da presença de metaplasia nos lobos direito e esquerdo de fígados com fasciolose, Alegre-ES.....	37
Tabela 4 -	Medianas e percentis da intensidade da produção de muco PAS positivo nos focos de metaplasia nos lobos direito e esquerdo de fígados com fasciolose, Alegre-ES.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico		Página
Gráfico 1 –	Distribuição dos graus de fibrose nos lobos direito e esquerdo de fígados bovinos infectados com <i>Fasciola hepatica</i> L., Alegre, ES.....	29
Gráfico 2 –	Distribuição das intensidades do infiltrado inflamatório nos lobos direito e esquerdo de fígados bovinos infectados com <i>Fasciola hepatica</i> L., Alegre, ES.....	33
Gráfico 3 –	Distribuição da ocorrência de focos de metaplasia nos lobos direito (A) e esquerdo (B) de fígados bovinos infectados com <i>Fasciola hepatica</i> L., Alegre, ES.....	37
Gráfico 4 -	Distribuição do muco PAS positivo nos focos de metaplasia nos lobos direito (A) e esquerdo (B) de fígados bovinos infectados com <i>Fasciola hepatica</i> L., Alegre, ES.....	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5 CONCLUSÃO	42
6 REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO.....	48

1 INTRODUÇÃO

A fasciolose bovina é uma enfermidade que acomete o fígado e canais biliares de ovinos, caprinos, búfalos, homem e principalmente de bovinos. É causada por *Fasciola hepatica*, um trematódeo achatado dorsoventralmente de corpo foliáceo e com porção anterior em forma de cone (OLIVEIRA; SPÓSITO FILHA, 2009).

De acordo com Bostelmann et al. (2000) na fasciolose aguda, causada pelas formas imaturas dos parasitos, o grande número de trematodas no fígado leva a hepatomegalia, hiperemia do fígado, destruição do parênquima, insuficiência hepática, hemorragia na cavidade peritoneal, hepatite aguda hemorrágica, além da presença de um componente necrótico coagulativo, provavelmente relacionado a algum agente toxigênico liberado pelo parasito. Por outro lado, as formas adultas podem ocasionar fibrose e trauma severo no fígado e ductos biliares (HAROUN; HITLYER, 1986). As lesões fibróticas são as mais importantes alterações patológicas observadas no espaço porta de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* e quanto maior o grau de lesão crônica maior é a distribuição da fibrose pelo parênquima (TRIVILIN, 2010).

Bostelmann et al. (2000) relataram ainda que as lesões causadas por *F. hepatica* aparecem a partir de nove semanas pós-infecção. No terço médio das paredes dos ductos biliares, nota-se espessamento com presença de formações acinares irregulares compostas por epitélio colunar alto, em geral infiltradas por linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos.

Embora a fibrose esteja presente nos quadros de fasciolose crônica, o mecanismo de formação deste processo ainda não está totalmente esclarecido (TRIVILIN, 2010). Desta forma, Friedman e Carmichael (1998) informaram que é importante entender os eventos que levam a formação da fibrose a fim de identificar métodos terapêuticos que possam retardar seu processo de formação. Para isto, é necessário que haja identificação das estruturas, organismos e materiais secretados pelas células (WERNER et al, 2005) e a utilização de técnicas como a histoquímica podem ser importantes na precisão do diagnóstico histopatológico (ALVES et al., 2004). Tais estudos poderiam auxiliar na identificação do principal agente causador da fibrose hepática e estimular pesquisas de identificação de fatores químicos, celulares ou moleculares envolvidos (BARBOSA; ANDRADE, 2010).

Diante do exposto, o presente estudo visa, caracterizar morfológicamente e histoquimicamente fígados de bovinos com fasciolose crônica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fasciolose

A fasciolose é uma enfermidade que acomete o fígado e canais biliares de ovinos, caprinos, búfalos, bovinos e do homem. Tem grande importância veterinária por causar danos diretos ao animal, elevadas perdas econômicas, e, por ser uma zoonose, afeta também a saúde pública. Têm sido diagnosticada nas espécies bovina, caprina, ovina e equina nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (SERRA-FREIRE, 1999).

As perdas econômicas causadas por esta enfermidade foram relatadas recentemente no estado do Espírito Santo, Brasil, e chegaram a R\$ 649.187,50 (seiscentos e quarenta e nove mil cento e oitenta e sete reais e cinquenta centavos), o que corresponde a \$381.875 (trezentos e oitenta e um mil oitocentos e setenta e cinco dólares). Apenas no ano de 2009, as perdas foram de aproximadamente 132 mil dólares (BERNARDO et al., 2011).

O agente etiológico é *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) um trematódeo achatado dorsoventralmente de corpo foliáceo, coloração avermelhada e com porção anterior em forma de cone (OLIVEIRA; SPÓSITO FILHA, 2009). É um parasita pertencente ao filo Platyhelminthes, classe Trematoda, sub-classe Digenae, ordem Echinostomida, família Fasciolidae, gênero *Fasciola* (URQUHART et al., 1998).

Os ovos apresentam formato oval, tem em média 70-90 µm de largura por 130-145 µm de comprimento e coloração amarelo-acastanhado. Dentro do ovo encontra-se uma estrutura denominada miracídio. Esta, possui o tegumento recoberto por cílios, os quais são mais largos na porção anterior e afilados na posterior (OLIVEIRA et al., 2008).

Os miracídios liberados necessitam infectar um hospedeiro intermediário, no caso, moluscos do gênero *Lymnaea* (ECHEVARRIA, 2004). No Brasil são encontradas três espécies destes moluscos: *Lymnaea columella*, *Lymnaea viatrix* e *Lymnaea cubensi*. *L. columella* é encontrado em todas as regiões do Brasil e *L. viatrix* é restrito a região sul do Brasil, com prevalência no estado do Rio Grande do

Sul. Estas duas espécies podem ser encontradas em córregos de águas límpidas e de correnteza fraca. Além deste habitat, a espécie *Lymnaea viatrix* também é encontrada em solos argilosos e canais de irrigação com pouca água. Enquanto que o molusco *Lymnaea cubensi* é uma espécie comum no sudeste do Brasil, tem como habitat margens de riachos de águas límpidas e correnteza forte (OLIVEIRA; SPÓSITO FILHA, 2009; SERRA-FREIRE, 2008).

Uma vez dentro destes moluscos, o miracídio sofrerá três estágios: esporocisto, rédia e cercária. Na água, a cercária deixa o caramujo e passa a se movimentar ativamente e depois se fixa a um substrato onde perde a cauda e encista, originando a metacercária infectante (ECHEVARRIA, 2004 URQUHART et al. 1998).

Bovinos que pastejam em áreas de banhados, mananciais, pequenos córregos, lugares onde são encontrados moluscos do gênero *Lymnaea*, estão suscetíveis a ingerir a forma infectante (OLIVEIRA; SPÓSITO FILHA, 2009).

A dispersão da doença acontece devido à transferência de animais parasitados de locais onde a doença é enzoótica para localidades indenes (REID; DARGIE, 1995). Por isso há registros da ocorrência de *F. hepatica* em todas as regiões do Brasil (SERRA-FREIRE et al., 1995).

A fasciolose é considerada uma zoonose com ampla distribuição geográfica e mundial. É mais frequente nas Américas Central e do Sul, norte da África e países mediterrâneos (REID; DARGIE, 1995). Desde 1739, Jehan de Brie referenciou a fasciolose hepática como uma doença dos animais domésticos da Europa (BORAY, 1966). Nos Estados Unidos é uma enfermidade rara, por isso, o diagnóstico não é realizado com frequência (TOLAN; ROBERT, 2011).

No Brasil, foram notificados casos de fasciolose bovina nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, com exceção do Espírito Santo (SERRA-FREIRE et al., 1995). Porém, Carneiro (2010), constatou em seu estudo que os municípios da região sul do Espírito Santo apresentam altas prevalências de *F. hepatica* em ovinos, caprinos e bubalinos tornando esta região um possível foco de dispersão da parasitose. Isto porque no Espírito Santo a baixa altitude influencia a ocorrência de fasciolose, pois grande parte das propriedades rurais estão em áreas planas, o que favorece o desenvolvimento de hospedeiros intermediários. Além disso, a posição geográfica, a presença de duas bacias hidrográficas importantes, como o rio Itabapoana e o rio Itapemirim,

permitem que a doença se espalhe, não só no Espírito Santo, mas também em outros estados (ALVES, et al., 2011).

Em um estudo com 90 amostras de fezes de búfalos no município de Pariquera-Açu, em São Paulo, verificou-se que 18,89% das amostras foram positivas para ovos de *F. hepatica*. A disseminação da doença nestes animais estava ligada à presença dos moluscos do gênero *Lymnaea* (OLIVEIRA et al., 1994).

Em estudo semelhante realizado em Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro, onde nove propriedades foram visitadas para rastreamento da fasciolose, foi constatado que uma delas havia a presença de moluscos do gênero *Lymnaea*. No que se refere à infecção tanto do bovino quanto do molusco, confirmou-se o estabelecimento de um foco de fasciolose hepática para tal município. Com isto, verificou-se a possibilidade da distribuição da parasitose ser muito mais ampla do que a registrada, porque a epidemiologia da enfermidade depende de fatores biológicos, climáticos e manejo inadequado dos animais que ao permanecerem sem tratamento, contribuem para a contaminação do pasto, através da eliminação de ovos nas fezes (GOMES et al., 2002).

A infecção por *F. hepatica* causa queda no ganho de peso nos animais jovens, anemia severa, queda na produtividade e lesões irreversíveis no parênquima hepático, podendo levar à morte. Os animais também apresentam diminuição do apetite, mucosas e pele pálidas, edema submandibular, abdome dilatado, respiração acelerada e diarreia (URQUHART et al., 1998; OLIVEIRA; SPÓSITO FILHA, 2009).

Durante o exame de palpação da região abdominal há dor, o fígado encontra-se aumentado e pode ser observada ascite (ALVES; MARTINS, 2013).

2.2 Alterações macroscópicas do fígado causadas pela *Fasciola hepatica*

Em geral o fígado na fase aguda da fasciolose apresenta-se dilatado, com cápsula espessada e coberto por fibrina. Ao corte, há focos hemorrágicos difusos e parasitos jovens. A migração das formas jovens de *F. hepatica* causam trajetos hemorrágicos formados por parênquima hepático necrótico, que, macroscopicamente, apresentam coloração vermelho-escuro (RIET-CORREA, 2001; CARLTON; McGAVIN, 1998). Além disso, é observado um componente necrótico

coagulativo importante, provavelmente correlacionado a algum agente toxigênico liberado pelo parasito (BORDIN, 1995).

Na fase crônica, segundo Riet-Correa (2001), o fígado apresenta-se pálido, com o lobo ventral esquerdo reduzido, há presença de colangite crônica associada à obstrução dos ductos biliares, os quais levam à ectasia e estenose dos ductos. Além disso, há hiperplasia das paredes dos ductos causada pela fibrose periductal. É observada também colangiohepatite, causada por parasitos adultos.

As formas juvenis da *F. hepatica* migram pelo parênquima hepático onde causam traumas e aumento da enzima glutamato desidrogenase, que é liberada como consequência da destruição dos hepatócitos. Já as formas adultas atuam nos canalículos biliares onde exercem ações irritantes e hematófagas, ocasionando uma forte perturbação no metabolismo, principalmente no que diz respeito ao ferro. A presença dos parasitos nos canalículos e as lesões causadas por eles provoca um aumento da enzima glutamiltranspectidase (MORALES; MORALES, 2004).

Em um estudo com infecção experimental com metacercárias de *F. hepatica* em ratos observaram-se migrações de 1-2 mm de diâmetro no parênquima hepático e, após a segunda semana de infecção notou-se hemorragia. Os fígados revelaram também aumento das vias biliares e áreas de necrose (BEYTUT; AKÇA; GÖKÇE, 2011).

Durante a análise macroscópica também é observada acentuada atrofia do lobo esquerdo secundária à infestação por *F. hepatica* em relação ao lobo direito (TESSELE; BRUM; BARROS, 2013)

2.3 Alterações microscópicas do fígado causadas por *Fasciola hepatica*

A microscopia de fígados condenados por fasciolose revela hiperplasia de ductos biliares, infiltração por linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos que varia de moderada a intensa, além da presença de mastócitos. É observada necrose com tecido de granulação e macrófago com hemossiderina, formações acinares irregulares compostas por epitélio colunar alto, distribuídas no terço médio da parede (BOSTELMANN et al., 2000). A medida que ocorre a progressão da lesão inflamatória observa-se que há um aumento progressivo do número de linfócitos T, B e plasmócitos produtores de IgG (TRIVILIN et al., 2013).

Observa-se também destruição, citólise, metaplasia dos hepatócitos e colangite crônica, hipertrofia dos canais induzidas pelos espinhos da superfície dorsal do trematóide, fibrose hepática causada pela destruição dos cordões de hepatócitos (SERRA-FREIRE, 2008).

Em bovinos, Trivilin (2010) acrescentou ainda que as lesões fibróticas são as mais importantes lesões encontradas no espaço porta de bovinos cronicamente infectados por *F. hepatica* e que quanto maior o grau de lesão crônica maior será a distribuição da fibrose pelo parênquima hepático. Marcos et al. (2007) ressaltaram que a inflamação crônica do fígado aumenta o risco de desenvolvimento de fibrose.

Estudos em ratos infectados por *Fasciola* revelaram túneis migratórios com grande quantidade de sangue, fibrina e restos celulares. O infiltrado inflamatório ao redor dos túneis migratórios variou de escasso a moderado. Os neutrófilos foram as células predominantes, com presença de eosinófilos, alguns macrófagos, plasmócitos, linfócitos e células gigantes multinucleadas (BEYTUT; AKÇA; GÖKÇE, 2011).

Em estudo experimental em esquilos-da-mongólia (*Meriones unguiculatus*) inoculados com metacercárias de *F. hepatica* foram verificados pulmão, fígado, baço, rins, pâncreas, intestino e linfonodos e notou-se que o fígado foi o órgão mais lesado, indicando o tropismo que o parasito apresenta durante seu desenvolvimento. Neste órgão a análise mostrou a presença de inflamação com predominância de células polimorfonucleares, como neutrófilos e eosinófilos, necrose hemorrágica, áreas de fibrose geradas por ovos, formas imaturas e adultas de *F. hepatica*, além da presença de linfócitos e macrófagos na maioria das lesões crônicas (MENDES; VASCONCELOS; LIMA, 2012).

2.4 Fibrose hepática

A fibrose é o processo de cicatrização de uma lesão. Este processo surge na tentativa de proteger o tecido, restringindo os danos no local da lesão, porém, ao fazê-lo, ocorre uma distorção na arquitetura hepática normal, fazendo com que a função hepática seja prejudicada (FRIEDMAN, 1993).

O processo fibrótico hepático é reversível, enquanto que a cirrose é irreversível (FRIEDMAN; CARMICHAEL, 1998). A fibrose é um processo patológico

progressivo em que múltiplos eventos celulares e moleculares levam à deposição de uma grande quantidade de proteína no espaço extracelular (ARTHUR, 2000). Bilate (2007) explicou que o processo de formação da fibrose inicia-se quando uma lesão no tecido provoca vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Isto acarretará um extravasamento de leucócitos para o local da inflamação. Além disso, há mediadores que participam da resposta inflamatória como as quimiocinas que realizam quimiotaxia de leucócitos, enzimas plasmáticas que aumentam a permeabilidade vascular, plasminina que degrada coágulos em produtos quimiotáticos e ativa proteínas do sistema complemento, mediadores lipídicos e leucotrienos que participam do processo de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular e, por fim, as citocinas que estimulam a expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, facilitando a migração de leucócitos.

Quando a fibrose hepática encontra-se em um estágio avançado, o fígado exhibe cerca de seis vezes mais colágenos do tipo I, III e IV, com presença de fibronectina, elastina, laminina, ácido hialurônico e proteoglicanos (BATALLER; BRENNER, 2005). Os elementos capazes de sintetizar e depositar uma variedade de substância na matriz são fibroblastos portais, miofibroblastos dos vasos e hepatócitos, porém, as células estreladas hepáticas (CEHs) são consideradas células-chave na produção da fibrose (BATALLER; BRENNER, 2005; GEERTS, 2001; SAFADI; FRIEDMAN, 2002; SEGAWA et al., 2002).

Oliveira; Souza; Andrade (2004) realizaram uma classificação histológica para a fibrose hepática provocada pelo parasito *Capillaria hepatica* de maneira semi-quantitativa em que os focos fibróticos foram divididos em graus: Grau 1 (+), quando a fibrose aparece discretamente ao redor dos ductos não acometendo grandes extensões do parênquima hepático; Grau 2 (++) , quando a fibrose é moderada formando septos fibrosos incompletos e Grau 3 (+++), quando a fibrose é severa e revela septos fibrosos proeminentes que dividem o parênquima hepático em lóbulos.

2.5 Metaplasia de ductos biliares

Os ductos biliares são revestidos por epitélio cúbico simples baixo, os ductos hepáticos são compostos por epitélio colunar simples e os ductos biliares interlobulares são revestidos por epitélio simples cúbico ou colunar (SAMUELSON,

2007). Porém, em situações adversas como doenças infecciosas, estresse ambiental, lesões crônicas e ação hormonal, a célula suscetível é induzida a sofrer alteração, modificando sua resposta a estimulações, além de ampliar a resposta a agressões infecciosas futuras por ação sinérgica das vias de sinalização, processo este denominado metaplasia (PINTO; TODO-BOM, 2009; SHAIKH; BILQEES; KHAN, 2004; SLACK, 1986).

A metaplasia é definida como a modificação de um tipo de tecido adulto em outro da mesma linhagem. Na vesícula biliar é observada a metaplasia pilórica, que são glândulas de padrão pilórico, dispersas na lâmina própria da mucosa, revelando mucinas neutras (BRASILEIRO FILHO, 2006).

Em um estudo com 67 fígados de gamos (*Dama dama*) infectados pela *Fascioloides magna* observou-se espessamento do epitélio hepático com metaplasia da mucosa e um grande número de células calciformes (MARINKOVIĆ et al., 2013).

Na fasciolose quando o parasita invade o parênquima hepático causa lesões migratórias agudas que tendem a ser traumáticas e, além disso, é secretado um componente necrótico coagulativo provavelmente correlacionado a algum agente toxigênico liberado pelo parasito (BORDIN, 1995). Tessele, Brum e Barros (2013) também citaram que dentro dos ductos hepáticos há presença de material marrom escuro que apresenta-se viscoso, formados por flocos de bile, células epiteliais de revestimentos ductal descamadas, bile, fragmentos e ovos de trematóides.

Bostelmann et al (2000) verificaram que fígados bovinos infectados com *F. hepatica* mostram espessamento das paredes dos ductos biliares com formações acinares irregulares compostas por epitélio colunar alto, distribuídas no terço médio da parede, infiltradas por linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos. Trivilin (2010), em um estudo semelhante, descreveu a presença de formações acinares em ductos biliares de médio calibre em 18% das lâminas analisadas.

Os fígados de bovinos com fasciolose também revelaram hiperplasia de ductos biliares (MARCOS et al., 2007) e, por isto, Trivilin (2010) verificou 89% dos fígados com hiperplasia de canalículos biliares, sendo que 53,93% apresentaram hiperplasia em dois e três canalículos e em 46,7% foram observados mais de quatro canalículos proliferados. Sugere-se que este processo seja estimulado pela prolina, substância produzida por *F. hepatica* (CAMPBELL et al., 1981).

Várias técnicas histológicas têm sido utilizadas para avaliar as alterações histopatológicas em fígados infectados por *F. hepatica* (MARCOS et al., 2007;

PFISTER; MEIERHOFER, 1986). Entretanto, na literatura consultada, não foram encontrados dados sobre a utilização de técnicas histoquímicas para caracterizar os focos de metaplasia dos ductos biliares e suas secreções.

A histoquímica e a citoquímica envolvem a identificação de componentes químicos específicos no tecido e na célula, respectivamente. Esse componente pode ser geral ou específico e a coloração de polissacarídeos pelo PAS passa a ser um bom exemplo de componente geral. Os componentes ricos em glicose são expostos ao ácido levando à oxidação de grupamentos 1,2 glicol das moléculas de glicose em aldeídos que por sua vez reagem com o reagente de Schiff e resultam em uma coloração de fucina púrpura em uma grande parte dos polissacarídeos. Contudo, quando há necessidade de maior seletividade dos polissacarídeos pode se utilizar outros procedimentos histoquímicos como a degradação enzimática ou a marcação com lectina (SAMUELSON, 2007).

Pfister e Meierhofer (1986) utilizaram para diagnóstico histoquímico as colorações de hematoxilina-eosina (HE), safranina e ácido periódico de Schiff (PAS) em ratos infectados por metacercária de *F. hepatica* em que a coloração de HE foi empregada na contagem de eosinófilos, neutrófilos, plasmócitos e linfócitos, safranina para coloração dos mastócitos em mucosas (MMC).

Em análise histológica de moluscos infectados por *F. hepatica* utilizou-se HE para evidenciar estruturas acidofílicas e basofílicas, PAS para estruturas constituídas de mucopolissacarídeos neutros e tricrômico de Masson para demonstração de tecido fibroso (GOMES, 1985).

O Alcian blue é outro corante que possui afinidade pelos polissacarídeos sulfatados da matriz cartilaginosa (GERÔNIMO; LEITE, 2011) que tem sido utilizado para marcar glicosaminoglicanos (BRASILEIRO FILHO, 2006) e células mucossecretoras, como as do esôfago, estômago e intestino (VIEIRA-LOPES et al., 2014). Entretanto, na literatura consultada não foram encontradas citações com o emprego destas colorações em fígados com fasciolose podendo sua utilização ser útil na identificação de muco.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção, coleta e fixação das amostras

Para a realização do experimento, foram feitas três visitas técnicas no matadouro frigorífico de Atilio Vivacqua, ES durante o período de fevereiro a março de 2012, onde foram coletadas amostras de 47 fígados bovinos condenados por fasciolose e de 12 fígados normais.

No próprio matadouro, os fígados foram avaliados macroscopicamente para verificação da presença ou ausência de parasitos e divididos em dois lobos, direito e esquerdo, conforme estrutura anatômica. Cada lobo foi seccionado transversalmente a cada um centímetro para verificação e contagem dos parasitos.

Dos fígados condenados foram coletados cinco fragmentos de 2cm² de tecido hepático de cada lobo, direito e esquerdo, totalizando 470 subamostras, que corresponderam a 235 subamostras por lobo. Dos fígados normais, por determinação do matadouro frigorífico, foi coletado apenas um fragmento de 2cm² da porção média, totalizando 12 amostras que foram utilizadas como controle das análises microscópicas.

Todos os fragmentos foram devidamente identificados e fixados em solução de formol a 10% e direcionados ao Laboratório de Patologia Animal da UFES para avaliação microscópica.

3.2 Processamento histológico e histoquímico das amostras

No Laboratório de Patologia Animal todos os fragmentos foram recortados, armazenados em cassetes plásticos e submetidos ao processamento histológico de rotina para inclusão em parafina. Em seguida, foram submetidos à microtomia para a secção de cortes de três micrômetros de espessura que foram depositados em

lâminas histológicas. Os cortes em lâminas foram corados pelos métodos de Hematoxilina e eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS).

3.3 Avaliação histológica e histoquímica

Para a avaliação histológica utilizou-se o material corado por HE no qual foram avaliadas a distribuição da fibrose e o tipo e a intensidade do infiltrado inflamatório, seguida da identificação dos focos de metaplasia.

Para a avaliação da distribuição da fibrose utilizaram-se os critérios estabelecidos por Oliveira, Souza e Andrade (2004) em que as alterações são divididas em graus, a saber: grau 1 (+), quando a fibrose aparece discretamente ao redor dos ductos não acometendo grandes extensões do parênquima hepático; grau 2 (++), quando a fibrose é moderada formando septos fibrosos incompletos e grau 3 (+++), quando a fibrose é severa e revela septos fibrosos proeminentes que dividem o parênquima hepático em lóbulos.

Para a avaliação do infiltrado inflamatório foram utilizados critérios semelhantes aos descritos por Trivilin (2010) de forma semi-quantitativa com atribuição de escore de intensidade, a saber: discreto (+), moderado (++) e severo (+++).

A identificação dos focos de metaplasia em cada amostra foi feita utilizando-se o parâmetro de presença e ausência desta alteração.

Somente o material que continha focos de metaplasia foi utilizado para a coloração pelo PAS. Desta forma, avaliou-se a presença e ausência da produção de muco, bem como, a quantidade de muco depositada nas células em relação à intensidade de coloração. A intensidade da coloração foi avaliada também por análise subjetiva semi-quantitativa com atribuição de escores da mesma forma que para o infiltrado inflamatório: discreta (+), moderada (++) e severa (+++) marcação pelo corante.

3.4 Análise estatística

Todas as variáveis avaliadas (grau de fibrose, intensidade parasitária, infiltrado inflamatório, foco de formação acinar e produção de muco) foram submetidas a estatística descritiva com os valores expressos em percentuais.

Com base nos cinco fragmentos das 47 amostras, totalizando 235 subamostras por lobo hepático, foi realizada avaliação do grau de fibrose, infiltrado inflamatório, foco de formação acinar e produção de muco, comparando-se o lobo direito com o esquerdo pelo teste de Mann-Whitney a nível de 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação macroscópica dos fígados observou-se que 100% (47/47) apresentaram fibrose caracterizada por depressão do parênquima e/ou espessamento da parede dos ductos biliares maiores. Em 80,85% (38/47) foram encontrados parasitos no momento da coleta. No lobo direito observaram-se formas juvenis e adultas do parasito e as formas jovens variaram de um a 16 exemplares e as adultas de um a 45 exemplares. No lobo esquerdo as formas jovens quantificadas variaram de um a 34 exemplares enquanto que as adultas de um a 45. Embora neste estudo não tenha sido observada diferença entre o número de parasitos por lobo hepático foi evidente que o lobo esquerdo apresentou maior intensidade parasitária.

Em um estudo onde foram coletados 100 fragmentos do lobo esquerdo e lobo direito de fígados bovinos condenados por fasciolose, Trivilin et al. (2013) perceberam que em todas as amostras a intensidade de infiltrado inflamatório avaliadas acometiam mais do lobo hepático esquerdo, revelando que na fasciolose crônica, as lesões mais significativas concentram-se nesse lobo hepático. Ressaltaram ainda que, a inflamação observada variou de discreta a severa e sempre esteve associada à presença dos parasitos nos ductos biliares.

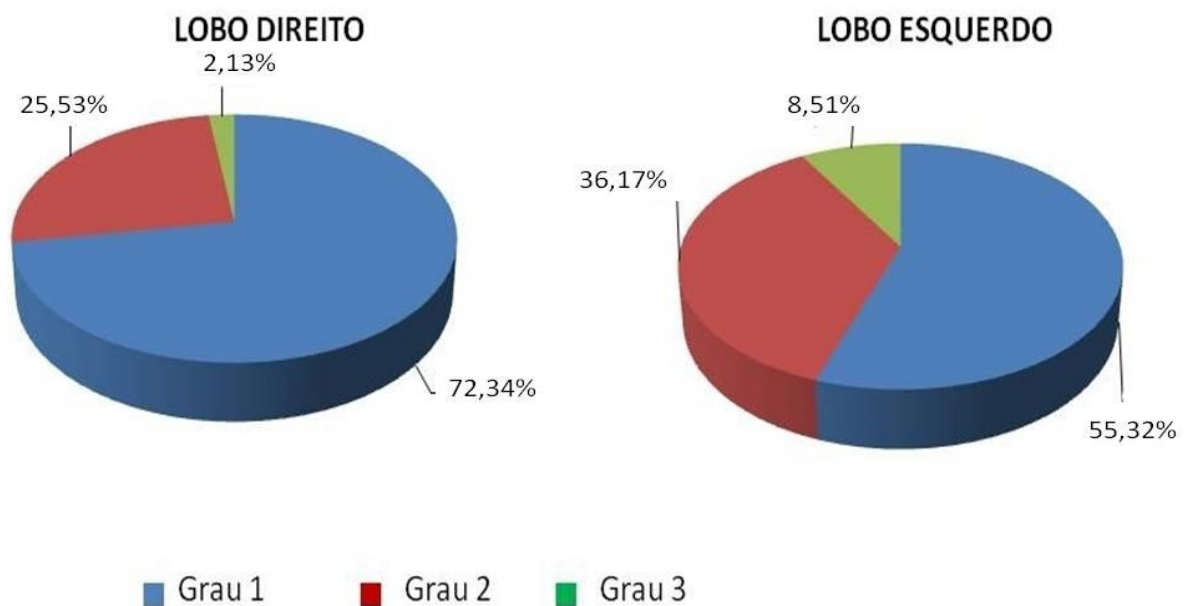
Apesar de Trivilin et al. (2013) não realizarem a contagem do número de parasitos encontrado nos ductos biliares, tais autores sugeriram que existe relação entre a presença de parasitos e lesões mais significativas.

Marcos et al. (2007) observaram 24 amostras de fígados bovinos frescos e concluíram que todos os fígados infectados pela *F. hepatica* tinham pelo menos um grau de fibrose hepática. O estudo também indicou que o número de fasciolas no fígado estava relacionado ao grau de fibrose, e que os casos positivos para cirrose mostrou uma densidade parasitária maior que o grupo diagnosticado sem cirrose. Os autores afirmaram ainda que um número mínimo de 38 fasciolas pode representar um nível suficiente para causar cirrose hepática em bovinos.

Quanto mais rápido for realizado o diagnóstico da presença de *F. hepatica* em fígados bovinos o tratamento será mais efetivo evitando que sejam desenvolvidas lesões fibróticas severas bem como cirrose hepática.

A análise histopatológica das lâminas coradas pelo método de hematoxilina-eosina (HE) revelou a presença de fibrose (Gráfico 1) em todas as amostras. De acordo com a classificação do grau de fibrose observou-se que, no lobo direito, 72,34%(34/47) das amostras revelaram fibrose grau 1, 25,53%(12/47) grau 2 e 2,13% (1/47) grau 3. No lobo esquerdo 55,32% (26/47) tiveram fibrose grau 1, 36,17% (17/47) grau 2, 8,51% (4/47) grau 3. Os resultados demonstraram prevalência de fibrose discreta.

Gráfico 1. Distribuição dos graus de fibrose nos lobos direito e esquerdo de fígados bovinos infectados com *Fasciola hepatica* L., Alegre, ES.



A Figura 1 ilustra a distribuição da fibrose nos fígados com fasciolose.

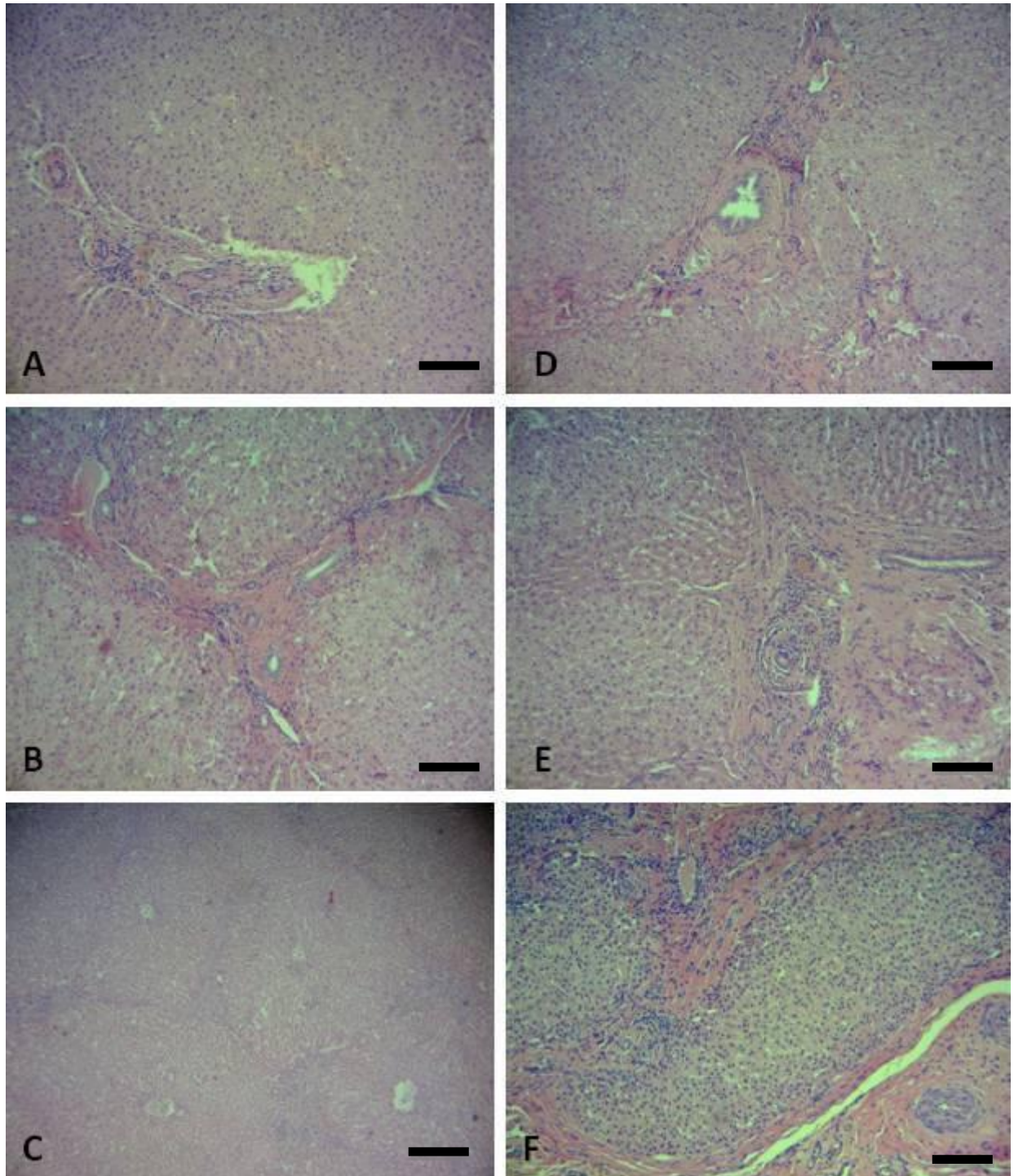


Figura 1. Fotomicrografia de fígado de bovino com fasciolose crônica. A) Fibrose discreta ao redor dos ductos biliares, Grau 1, Lobo direito, Barra=70 μ m; B) Fibrose moderada com formação de septos incompletos, Grau 2, Lobo direito, Barra=70 μ m; C) Fibrose com septos proeminentes dividindo o parênquima em lóbulos, Grau 3, Lobo direito, Barra= 437,5 μ m; D) Fibrose Grau 1, Lobo esquerdo, Barra=67,8 μ m; E) Fibrose Grau 2, Lobo esquerdo, Barra=67,8 μ m; F) Fibrose Grau 3, Lobo esquerdo, Barra=67,8 μ m. Coloração de hematoxilina e eosina.

Marcos et al. (2007) também encontraram lesões fibróticas em todos os fígados avaliados, entretanto, os dados de prevalência foram distintos sendo encontradas 17% das amostras com grau 1, 17% grau 2 e 66% grau 3. Estes autores verificaram predominância de lesões fibróticas mais graves. A diferença entre os resultados obtidos pode estar relacionada a maior intensidade parasitária verificada por Marcos et al. (2007), bem como, aos diversos fatores epidemiológicos envolvidos na infecção dos bovinos. Acredita-se ainda que no Peru existam condições climáticas que favoreçam este parasitismo.

Bostelmann et al. (2000) compararam fígados de bovinos, bubalinos e ovinos infectados por *F. hepatica* e constataram que o grau de fibrose da parede dos ductos biliares dos bovinos e bubalinos é maior que dos ovinos, devido a idade de abate dessas espécies serem diferentes. O abate dos bubalinos ocorre entre 24 a 30 meses e dos bovinos em torno de 36 meses.

Neste estudo foi possível identificar o parasito microscopicamente em apenas duas amostras hepáticas sendo uma com fibrose grau 1 e outra de grau 2. Devido ao baixo número de amostras não foi possível fazer uma correlação entre este achado e a existência de lesões fibróticas.

Diferentemente do que foi observado neste estudo, na análise histopatológica do fígado de uma alpaca adulta, macho, de idade desconhecida, a lesão mais proeminente foi uma extensa área de hiperplasia biliar e granulomas multifocais contendo ovos de parasitas que eram compatíveis com *F. hepatica*. Estes mesmos autores ainda citaram que a resposta fibrótica foi mínima na área de hiperplasia biliar, porém, era grande em torno das zonas de formação de granulomas. (HAMIR; SMITH, 2002).

No entanto, segundo Trivilin (2010), as lesões fibróticas são as alterações mais importantes encontradas no espaço porta de bovinos cronicamente infectados por *F. hepatica* e observou que quanto maior o grau de lesão crônica, maior será a distribuição da fibrose pelo parênquima hepático.

Com base nos dados observados verificou-se diferença significativa entre fígados com *F. hepatica* e fígados normais quanto ao grau de fibrose, tanto para o lobo direito quanto para o esquerdo e entre estes. Estes dados estão dispostos na Tabela 1.

Conforme esperado, houve diferença significativa entre a fibrose existente nos fígados com fasciolose e os fígados normais, sendo que nos fígados normais, não

houve deposição de tecido conjuntivo. Em relação a comparação entre os graus de fibrose por lobo hepático observou-se que, no lobo esquerdo, a fibrose foi mais significativa. Estes achados também foram observados por Trivilin (2010) que verificou que o lobo esquerdo era mais acometido pelas lesões fibróticas e vasculares que o lobo direito em estudo no Espírito Santo e por Tessele, Brum e Barros (2013) que encontraram lesões significativamente mais graves no lobo esquerdo quando comparada com o direito. Estes autores demonstraram atrofia severa do parênquima do lobo esquerdo em bovinos infectados por fasciolose no Rio Grande do Sul.

Tabela 1 - Medianas e percentis dos graus de fibrose nos lobos direito e esquerdo de fígados normais e com fasciolose, Alegre-ES.

Tratamentos	Lobo direito (Dir)	Lobo esquerdo (Esq)	U	Ri [Dir; Esq]	n ₁ ; n ₂	p
	Mediana (P25; P75) ¹	Mediana (P25; P75) ¹				
Fígado com Fasciola (FF)²	1,0 (1,0; 2,0) aB	1,0 (1,0; 2,0) aA	23912,0	[51642,0; 59043,0]	235;235	0,006
Controle (Cont)	0,0 (0,0; 0,0) bA	0,0 (0,0; 0,0) bA	1300,5	[2626,5; 2626,5]	60;60	1,000
U	510,0	663,0				
Ri [FF; Cont]	[39205; 1836]	[39205; 1836]				
n₁; n₂	60;235	60;235				
p	<0,001	<0,001				

¹ Medianas seguidas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$);

² Medianas seguidas por mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$);

P25 e P75 = Percentis 25 e 75%;

U = Estatística do Teste de Mann-Whitney;

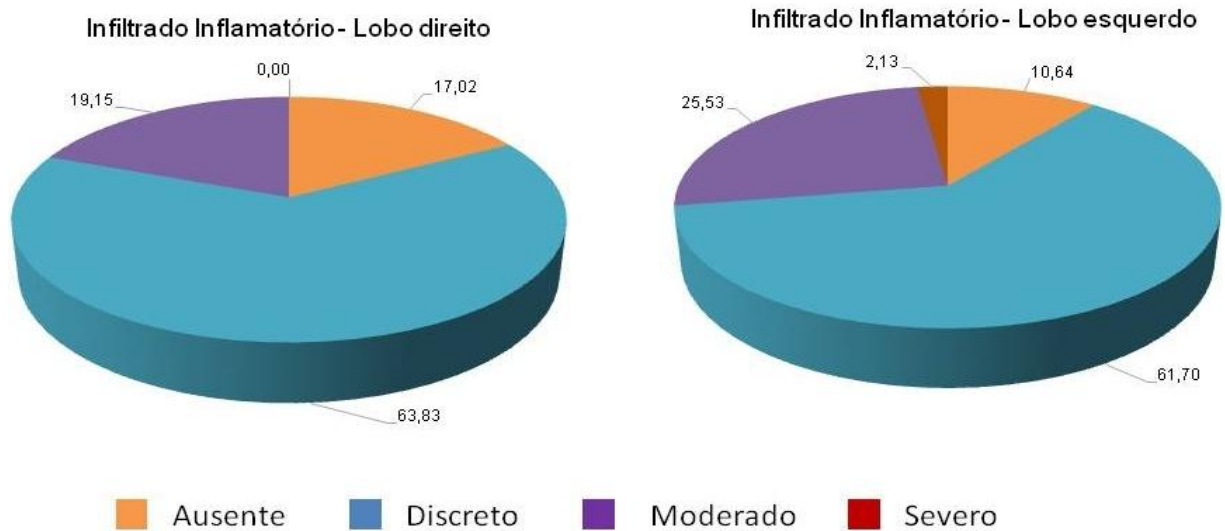
Ri = Soma dos postos das amostras;

n₁ e n₂ = Número de observações de cada amostra 1 e 2.

Em relação à avaliação do infiltrado inflamatório presente nos fígados observou-se predominância de células mononucleadas. No lobo esquerdo 61,70% (29/47) das amostras revelaram inflamação discreta, 25,53% (12/47) moderada e 2,13% (1/47) severa. Entretanto, em 10,64% (5/47) das amostras deste lobo não houve qualquer lesão inflamatória. No lobo direito 63,83% (30/47) das amostras revelaram infiltrado inflamatório discreto, 19,15% (9/47) moderado e nenhuma amostra revelou inflamação severa. Em 17,20% (8/47) das amostras do lobo

esquerdo não houve processo inflamatório. Estes dados estão dispostos no Gráfico 2 e na Figura 2.

Gráfico 2. Distribuição das intensidades do infiltrado inflamatório nos lobos direito e esquerdo de fígados bovinos infectados com *Fasciola hepatica* L., Alegre, ES.



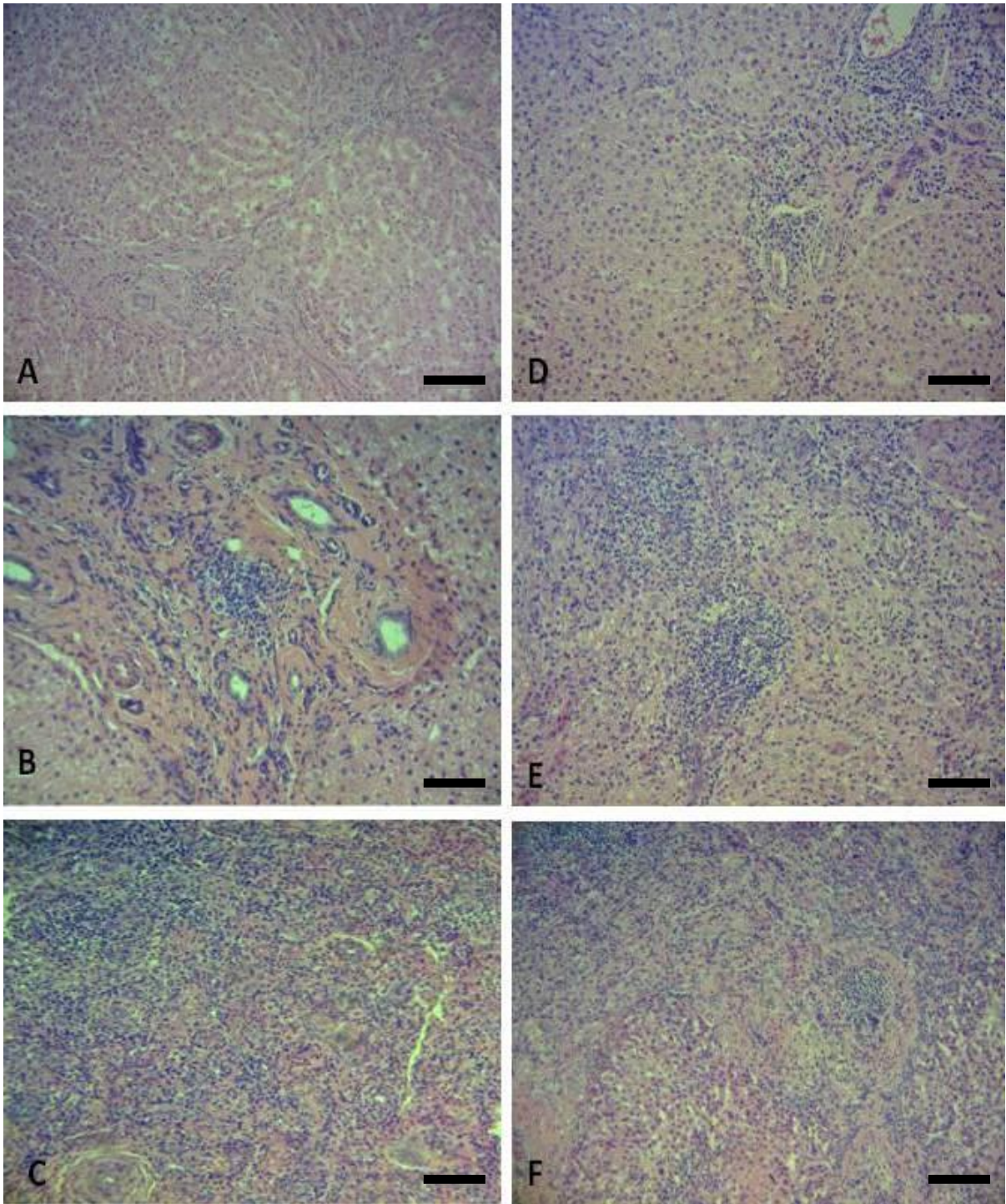


Figura 2. Fotomicrografia de fígado de bovino com fasciolose crônica. A) Infiltrado inflamatório discreto, Lobo direito, Barra=70 μ m; B) Infiltrado inflamatório moderado, Lobo direito, Barra=70 μ m; C) Infiltrado inflamatório acentuado, Lobo direito Barra=70 μ m; D) Infiltrado inflamatório discreto, Lobo esquerdo, Barra=72,25 μ m; E) Infiltrado inflamatório moderado, Lobo esquerdo, Barra=72,25 μ m; F) Infiltrado inflamatório acentuado, Lobo esquerdo, Barra=72,25 μ m. Coloração de hematoxilina e eosina.

Houve diferença entre a intensidade do infiltrado inflamatório entre os lobos direito e esquerdo do fígado. No lobo esquerdo houve maior resposta inflamatória, no entanto, as lesões prevaleceram de forma discreta ou moderada (Tabela 2).

Tabela 2 – Medianas e percentis da intensidade do infiltrado inflamatório nos lobos direito e esquerdo de fígados com fasciolose, Alegre-ES.

Tratamentos	Infiltrado Inflamatório
	Med (P25; P75) ¹
Lobo direito (DIR)	1,0 (0,0; 1,0) b
Lobo esquerdo (ESQ)	1,0 (1,0; 2,0) a
U	24514,5
Ri [DIR; ESQ]	[52244,5; 58440,5]
n ₁ ; n ₂	235; 235
p	0,0177

¹ Medianas seguidas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

U = Estatística do Teste de Mann-Whitney;

Ri = Soma dos postos das amostras;

n₁; n₂ = Número de observações de cada amostra 1 e 2;

Trivilin (2010) também encontrou infiltrado inflamatório na maioria das amostras. E, assim como o presente estudo, graduou os resultados quanto à intensidade, em discreta, moderada e severa verificando infiltrado inflamatório discreto em 50,53%, moderado em 32,63% e severo em 16,84%. Este autor também verificou ausência de inflamação em 5% das amostras avaliadas. Tal pesquisa reforça o presente estudo no sentido de que a intensidade predominante foi à discreta seguida da moderada e severa.

Porém, Marcos et al. (2007) relataram em estudo com fígados infectados pela *F. hepatica* que a maior frequência foi de inflamação severa. Os resultados discrepantes entre as pesquisas podem estar relacionados a existência de animais em diferentes fases da infecção que, por tratarem-se de estudos em fígados provenientes de matadouros, não é possível estabelecer o estágio exato da infecção. Também se acredita que a maior carga parasitária verificada no estudo de Marcos et al. (2007) possa ter contribuído para uma maior resposta inflamatória.

Em uma pesquisa onde seis grupos de ovelhas foram infectados com duas doses de metacercária de *F. hepatica* e algumas deste grupo foram reinfectadas e tratadas com triclabendazol, percebeu-se que, o infiltrado inflamatório e as lesões

hepáticas eram mais severas em grupos infectados primária e secundariamente com doses múltiplas do que no grupo infectado com doses maiores, mesmo com o número total de metacercárias administrado tendo sido maior neste grupo. Isto sugere que as infecções múltiplas induzem não só proteção, mas a resposta imune induzida por antígenos de ovos ou parasitas os quais causam sérios danos hepáticos (ORTEGA et al., 2002).

A presença de eosinófilos também foi verificada no infiltrado inflamatório dos fígados avaliados neste estudo, porém em menor quantidade. No lobo direito, apenas 8,51% (4/47) das amostras revelaram infiltrado predominantemente eosinofílico, enquanto que, no lobo esquerdo, estas células foram verificadas em 12,76% (6/47) das amostras.

Em humanos com fasciolose, Marcos et al. (2008) afirmaram que a hipereosinofilia pode acontecer na metade ou final das infecções agudas e a eosinofilia leve em casos de infecção precoce. A metade dos pacientes crônicos pode ter ausência de eosinofilia. Por isso, estes autores sugeriram que a contagem normal de eosinófilos em muitos pacientes não pode ser utilizada para fins de rastreio, em áreas endêmicas.

Em ratos o infiltrado inflamatório ao redor dos túneis migratórios variou de escasso a moderado e consistiu, principalmente, da infiltração maciça de eosinófilos e neutrófilos, alguns macrófagos, plasmócitos e linfócitos (BEYTUT; AKÇA; GÖKÇE, 2011). Bostelmann et al. (2000) verificaram infiltração por linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos de intensidade moderada a intensa, com presença de mastócitos em fígados parasitados por *F. hepatica* de bovinos, bubalinos e ovinos.

Em relação aos focos de metaplasia observou-se que 53,19% (25/47) das amostras do lobo direito apresentaram estas alterações enquanto que, no lobo esquerdo, este percentual foi de 57,45% (27/47). Estes dados estão dispostos no Gráfico 3. Com relação à análise estatística não foram encontradas diferenças significativas entre a ocorrência de metaplasias entre os lobos direito e esquerdo (Tabela 3).

Gráfico 3. Distribuição da ocorrência de focos de metaplasia nos lobos direito (A) e esquerdo (B) de fígados bovinos infectados com *Fasciola hepatica* L., Alegre, ES.

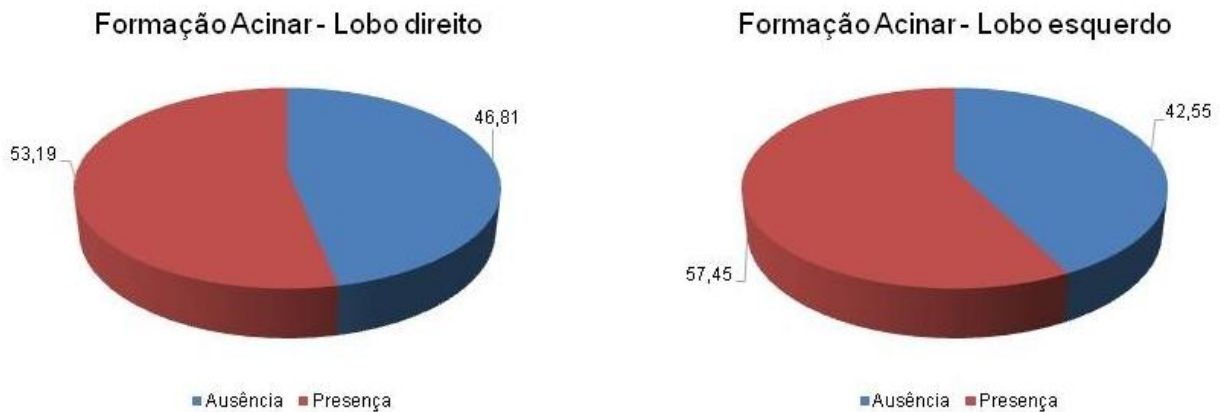


Tabela 3 – Medianas e percentis da presença de metaplasia nos lobos direito e esquerdo de fígados com fasciolose, Alegre-ES.

Tratamentos	Formação Acinar
	Mediana (P25; P75) ^{ns}
Lobo direito (DIR)	1,0 (0,0; 1,0) a
Lobo esquerdo (ESQ)	1,0 (0,0; 2,0) a
U	986,5
Ri [DIR; ESQ]	[2162,5; 2493,5]
n ₁ ; n ₂	47; 47
p	0,1126

^{ns} Diferença não significativa pelo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

U = Estatística do Teste de Mann-Whitney;

Ri = Soma dos postos das amostras;

Bostelmann et al. (2000) encontraram resultados semelhantes quando observaram a presença de formações acinares irregulares em amostras de fígados bovinos infectados por *F. hepatica*. Estas, eram compostas por epitélio colunar alto, distribuídas no terço médio da parede. Neste mesmo estudo, os fígados de bubalinos também apresentaram formações acinares revestidas por epitélio colunar alto e infiltradas por linfócitos, plasmócitos e eosinófilos. Porém, nas amostras de

fígados de ovinos, observou-se que em nenhuma delas havia a presença de formação acinar. Trivilin (2010) encontrou formações acinares em ductos biliares de médio calibre em fígados bovinos com fasciolose.

A formação acinar foi encontrada nos estudos de Ross, Todd; e Dow (1966) onde a partir de nove semanas pós-infecção pela *F. hepatica*, houve formação de estruturas acinares irregulares na porção interna e revestida por epitélio colunar alto, além de infiltração eosinofílica na porção média externa.

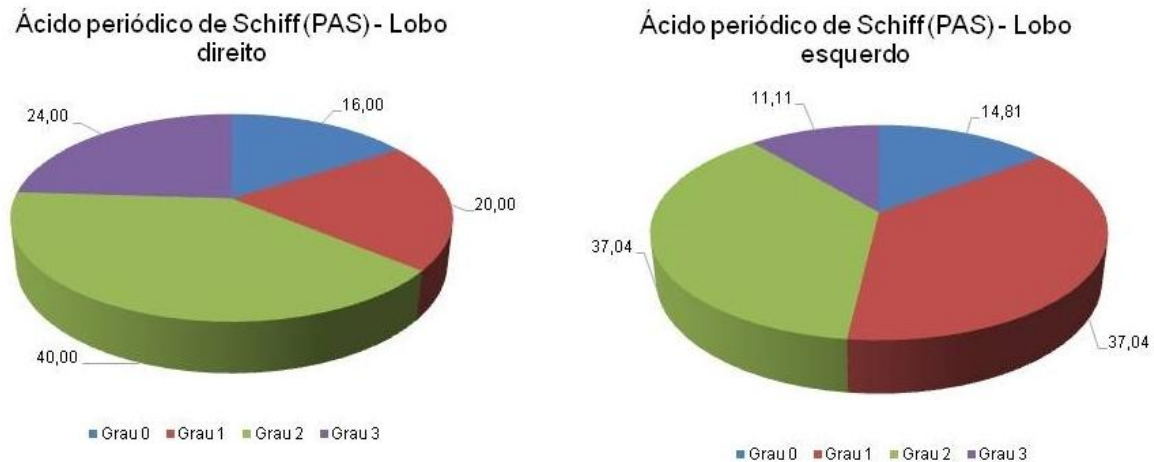
Por outro lado, na análise histológica de fígados de bovinos com fasciolose de Marcos et al. (2007) foram relatadas fibrose, cirrose, células inflamatórias e espessamento de ductos. Porém, não foram descritas as formações acinares. Estudos de infecção experimental por *Fasciola* em ratos também não foram relatadas formações acinares (BEYTUT; AKÇA; GÖKÇE, 2011).

Acredita-se que a ausência de dados sobre as formações acinares nos estudos de infecção natural ou experimental com *F. hepatica* sejam decorrentes das diferenças de descrição histológica entre os autores. Nota-se que as alterações que ocorrem nos ductos são, na maioria dos casos, descritas como hiperplasia ductal, embora, muitas vezes, este processo tenha sofrido diferenciação celular para metaplasia.

Brasileiro Filho (2006) relatou que na vesícula biliar observa-se metaplasia pilórica, que são glândulas de padrão pilórico, dispersas na lâmina própria da mucosa. Marinković et al. (2013) verificaram em um estudo com 67 fígados de gamos (*Dama dama*) infectados pela *Fascioloides magna* espessamento do epitélio hepático com metaplasia da mucosa e um grande número de células caliciformes. Entretanto, em fígados com fasciolose, existem poucos dados sobre a metaplasia dos ductos biliares.

Em relação à análise da presença e intensidade da marcação pelo PAS observou-se que das amostras com foco de metaplasia no lobo direito, 16,00% (4/25) não apresentaram marcação pelo PAS, 20,00% (5/25) marcação com intensidade discreta, 40,00% (10/25) moderada e 24% (6/25) acentuada. No lobo esquerdo, 14,81% (4/27) não apresentaram marcação pelo PAS, 37,04% (10/27) marcação com intensidade discreta, 37,04% (10/27) moderada e 11,11% (3/27) acentuada. Estes dados revelam que as células metaplásicas presentes nos focos fibróticos decorrentes da fasciolose crônica produzem muco uma vez que houve a marcação pelo PAS (Gráfico 4).

Gráfico 4. Distribuição do muco PAS positivo nos focos de metaplasia nos lobos direito (A) e esquerdo (B) de fígados bovinos infectados com *Fasciola hepatica* L., Alegre, ES.



Em relação à intensidade de marcação pelo PAS constatou-se não houve diferença entre a quantidade de muco produzida entre os lobos hepáticos, embora tenha sido observada maior prevalência de produção de muco em intensidade discreta e moderada (Tabela 4). A Figura 3 ilustra os focos de metaplasia observado nas amostras.

Tabela 4. Medianas e percentis da intensidade da produção de muco PAS positivo nos focos de metaplasia nos lobos direito e esquerdo de fígados com fasciolose, Alegre-ES.

Tratamentos	PAS
	Mediana (P25; P75) ^{ns}
Lobo direito (DIR)	2,0 (1,0; 3,0) a
Lobo esquerdo (ESQ)	1,0 (1,0; 2,0) a
U	279,0
Ri [DIR; ESQ]	[721,0; 657,0]
n ₁ ; n ₂	25; 27
p	0,142

^{ns} Diferença não significativa pelo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

U = Estatística do Teste de Mann-Whitney;

Ri = Soma dos postos das amostras;

n₁; n₂ = Número de observações de cada amostra 1 e 2;

n₁; n₂ = Número de observações de cada amostra 1 e 2;

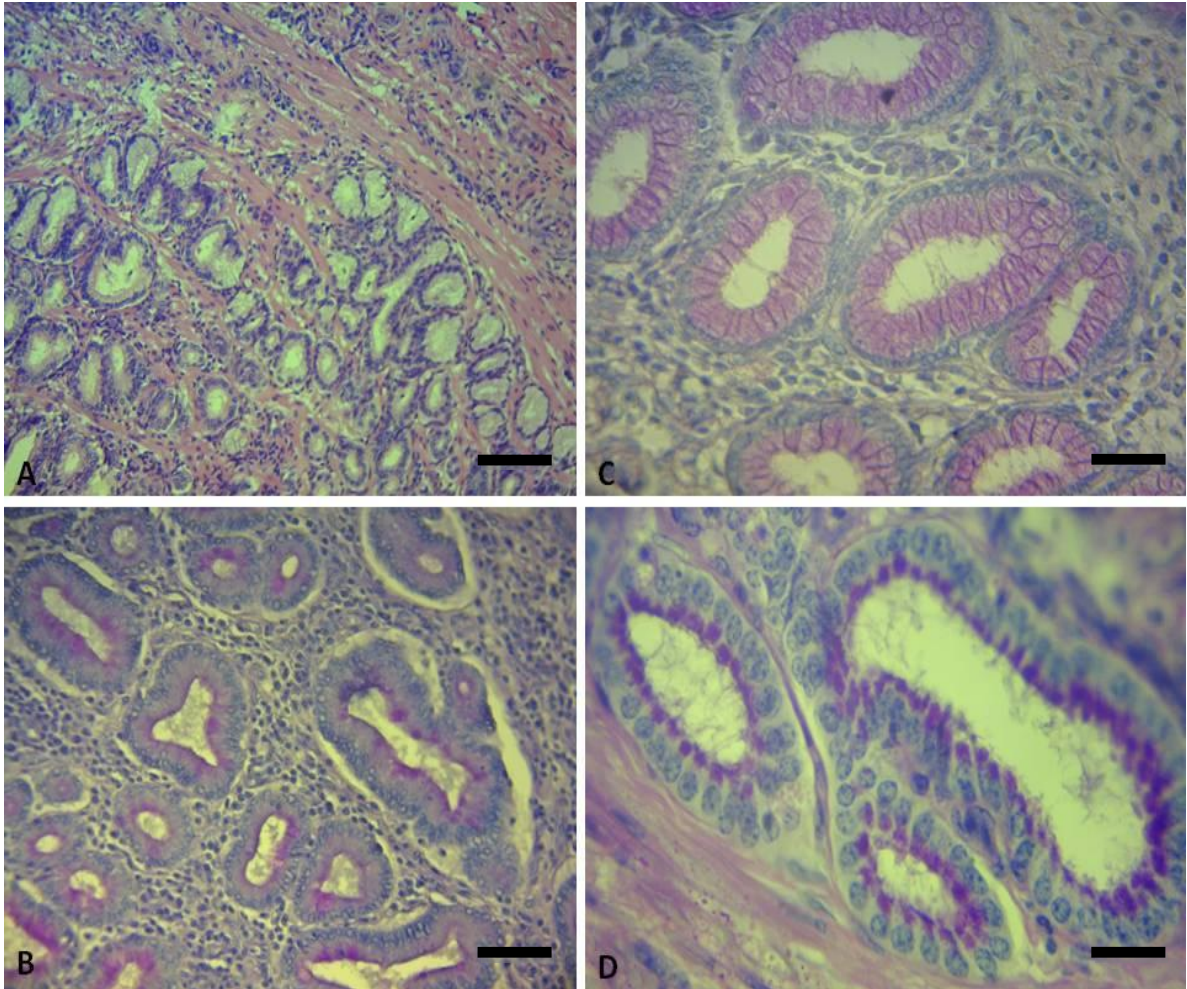


Figura 3. Fotomicrografia de fígado de bovino com fasciolose crônica. A) Foco de metaplasia do epitélio ductal, Barra=74,6 μ m. Coloração de hematoxilina e eosina; B) Muco em intensidade discreta no interior das células metaplásicas, Barra=23,3 μ m; C) Muco em intensidade moderada no interior das células metaplásicas, Barra=21,8 μ m; D) Muco em intensidade acentuada no interior das células metaplásicas, Barra=21,8 μ m. Coloração de PAS.

Notou-se neste estudo que nem todas as células marcaram positivamente com o PAS. Isto demonstra que podem existir diferentes tipos de substâncias produzidas pelas células metaplásicas dos ductos biliares frente ao parasitismo por *F. hepatica*.

Outro fator que pode contribuir para este achado é que o PAS não cora seletivamente os polissacarídeos. Neste método de coloração, os componentes ricos em glicose são expostos ao ácido levando à oxidação de grupamentos 1,2 glicol das moléculas de glicose em aldeídos que por sua vez reagem com o reagente de Schiff e resultam em uma coloração de fucina púrpura. Contudo, quando há necessidade de maior seletividade dos polissacarídeos pode se utilizar outros

procedimentos histoquímicos como a degradação enzimática ou a marcação com lectina (SAMUELSON, 2007). Bonapaz et al. (2010) citaram que o PAS é mais específico para sialomucinas e sulfomucinas enquanto que o Alcian blue cora seletivamente as sulfomucinas.

O Alcian blue é um corante que possui afinidade pelos polissacarídeos sulfatados da matriz cartilaginosa (GERÔNIMO; LEITE, 2011) que tem sido utilizado para marcar glicosaminoglicanos (BRASILEIRO FILHO, 2006) e células mucossecretoras, como as do esôfago, estômago e intestino (VIEIRA-LOPES et al., 2014). Entretanto, na literatura consultada não foram encontradas citações com o emprego destas colorações em fígados com fasciolose podendo sua utilização ser útil na identificação de muco.

Brasileiro Filho (2006) relatou que na vesícula biliar observa-se metaplasia pilórica e que as células metaplásicas secretam mucinas neutras. Katayama (1996) citaram que nos processos de colangite proliferativa crônica com consequente litíase há aumento na produção de mucinas ácidas, num primeiro momento, seguida do aumento da produção de mucinas neutras e, que a avaliação qualitativa e quantitativa destas mucinas, pode explicar o processo de formação dos quadros de litíases.

Não foi possível estabelecer relação entre os achados histológicos decorrentes da infecção por *F. hepatica* e o aumento da produção de muco indicando que há necessidade de estudos mais aprofundados que levem em consideração a avaliação qualitativa das mucinas, pois conforme descrito por Katayama (1996), há primeiro o envolvimento de mucinas ácidas nos quadros inflamatórios e, neste estudo, só foram avaliadas as mucinas neutras.

5 CONCLUSÕES

- A fibrose é alteração mais marcante em fígados cronicamente infectados por *F. hepatica* sendo mais evidente no lobo hepático esquerdo;
- O infiltrado inflamatório foi predominantemente mononuclear e discreto e mais prevalente no lobo esquerdo;
- Os focos de metaplasia estão presentes nos fígados com fasciolose crônica e possuem diferença na intensidade de muco produzido.

6 REFERÊNCIAS

- 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. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.17, n.3, p.271-276, 2011.
- ALVES, D.P.; MARTINS, I.V.F. Atualizações no controle parasitário da fasciolíase em bovinos. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.16, p.323-351, 2013.
- ALVES, V.A.F.; LEANDRO, L.O.; VASSALLO, J.; PEREIRA, E.M.; KANAMURA, C.T.; WAKAMATSU, A.; SANTOS, R.T.M.; NONOGAKI, S. Controle de qualidade interlaboratorial em imuno-histoquímica: citoceratinas e receptor de estrógeno como modelos. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v.40, n.3, p.175-183, 2004.
- 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.
- BARBOSA, V.L.C.; ANDRADE, Z.A. *Capillaria hepatica* - induced septal fibrosis in rats: a contribution to the study of liver fibrogenesis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.5, p.504-507, 2010.
- BATALLER, R.; BRENNER, D.A. Liver fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, v.115, n.2, p.209-218, 2005.
- BERNARDO C.C.; CARNEIRO, M.B.; AVELAR, B.R.; DONATELE, D.M.; MARTINS, I.F.M.; 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.
- BEYTUT, E.; AKÇA, A.; GÖKÇE, H.I. Pathological and immunohistochemical evaluation of the effects of interferon gamma (IFN- γ) and aminoguanidine in rats experimentally infected with *Fasciola hepatica*. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v.35, n.4, p.243-253, 2011.
- BILATE, A.M.B. Curso básico atualizado de imunologia para o reumatologista: Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v.8, n.2, p.47-51, 2007.
- BONAPAZ, R.S.; ULIANA, C.H.; SANTOS, F.N.; SILVA, A.V.; ARAÚJO, E.J.A.; SANT'ANA, D.M.G. Effects of infection with *Toxoplasma gondii* oocysts on the intestinal wall and the myenteric plexus of chicken (*Gallus gallus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.787-792, 2010.

BORAY, J.C. Studies on the relative susceptibility of some Lymnaeids to infections with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* and on the adaptation of *Fasciola* spp. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.60, n.1, p.114-124, 1966.

BORDIN, E.L. Revisão da anatomia patológica da fasciolose bovina. **A Hora Veterinária**, n.1, p.33-35,1995.

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.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia**.7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1472p.

CAMPBELL, A.J.; SHEERS, M.; MOORE, R.J.; EDWARDS, S.R.; MONTAGUE, P.E. Proline biosynthesis by *Fasciola hepatica* at different developmental stages *in vivo* and *in vitro*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.3, n.2, p.91-101, 1981.

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

CARNEIRO, M.B. **Estudo epidemiológico da *Fasciola hepatica* em ovinos, caprinos e bubalinos em municípios da região sul do Espírito Santo**. 2010. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2010.

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

FRIEDMAN, S.L. Seminars in medicina of the Beth Israel, hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. **The New England Journal of Medicine**, v.328, p.1828-1835, 1993.

FRIEDMAN, W.E.; CARMICHAEL, J.S. Heterochrony and developmental innovation: evolution of female gametophyte ontogeny in *Gnetum*. **Evolution**, v.52, p.1016-1030, 1998.

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.

GERÔNIMO, S.; LEITE, T.R. The paraffin gel used as a storage medium for small vertebrates diaphanized. **Science in Health**, v.2, n.1, p.17-19, 2011.

GOMES, D.C. **Interrelação entre *Fasciola hepática* L., 1758 e *Lymnaea columela* Say, 1817: Susceptibilidade e patogenia**. 1985. 94f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1985.

GOMES, F.F.; OLIVEIRA, F.C.R.; PILE, E.A.; LOPES C.W.G. Estabelecimento de foco de fasciolose hepática em propriedade do município de Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.11, n.2, p.53-56, 2002.

HAMIR, A.N.; SMITH, B.B. Severe biliary hyperplasia associated with liver fluke infection in an adult alpaca. **Veterinary Pathology**, v.35, n.5, p.592-594, 2002.

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

KATAYAMA, F. Alterations of the mucin components in bile duct epithelium associated with proliferating cholangitis an experimental study. **Hokkaido Igaku Zasshi**, v.71, p.585-598, 1996.

MARCOS, L.A.; TAGLE, M.; TERASHIMA, A.; et al. Natural history, clinicoradiologic correlates, and response to triclabendazole in acute massive fascioliasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.78, n.2, p.222-227, 2008.

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

MENDES, E.A.; VASCONCELOS, A.C.; LIMA, W.S. Histopatologia of *Fasciola hepática* infection in *Meriones unguiculatus*. **Revista de Patologia Tropical**, v.41, n.1, p.55-62, 2012.

MORALES, G.A.; MORALES, L.P. *Fasciola hepatica* y distomatosis hepatica bovina en Venezuela. **Red de Helminthologia para America Latina y el Caribe**, 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 na outbreak in Almirante Tamandaré, Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, s.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.

OLIVEIRA, S.M.; FUJII, T.U.; FUJII, T.; OLIVEIRA, W. Fasciolose hepática em búfalos no Município de Pariquera-Açu, Vale do Ribeira, São Paulo. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v.15, p.37, 1994.

OLIVEIRA, S.M.; SPÓSITO FILHA, E. Fasciolose Hepática. **Biológico**, v.71, n.1, p.5-7, 2009.

ORTEGA, J.; PERIS, B.; CORPA, J.M.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; SÁNCHEZ-ANDRADA, R.; PÉREZ, J. Fasciolosis experimental ovina: efecto de reinfecciones y

tratamiento en la respuesta inmune humoral y celular local. **Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia**, p.733-739, 2002.

PFISTER, K.; MEIERHOFER, B. Celular responses in the small intestine and liver of *Fasciola hepática* – infected rats. **Mitt Osterr Ges Tropenmed Parasitol**, v.8, p.73-86, 1986.

PINTO, A.M.; TODO-BOM, A. A intervenção da célula epitelial na asma. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v.15, n.3, p.461- 472, 2009.

PINZANI, M.; ROSSELLI M.; ZUCKERMAN. Liver cirrhosis. **Best practice and research clinical gastroenterology**, v.25, n.2, p.281-290, 2011.

REID, J.F.S.; DARGIE, J.D. Como os estágios adultos da *Fasciola hepatica* afetam a saúde e a produtividade do bovino. **A Hora Veterinária**, n.1, p.23-26, 1995.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C.; LEMOS, R.A. **Doenças de ruminantes e equinos**. 2. ed. - São Paulo: Varela, 2001. 999p.

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

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.

SAMUELSON, D.A. **Tratado de histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 527p.

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.

SERRA-FREIRE, N.M. Epizootiologia da fasciolose hepática no Brasil e o avanço da zoonose pouco discutida. *In*: Semana Capixaba do Médico Veterinário, 35. Encontro Regional de Saúde Pública em Medicina Veterinária, 3. Guarapari, 2008.

SERRA-FREIRE, N.M. Fasciolose hepática no Brasil: Análise Retrospectiva e Prospectiva. **Caderno Técnico-Científico da Escola de Medicina Veterinária**, v.1, p.9-70, 1999.

SERRA-FREIRE, N.M.; BORDIN, E.L.; LESSA, C.S.S.; BORDIN, E.L.; LESSA, C.S.S.; SCHERER, P.O.; FARIAS, M.T.; MALACCO, H.A.; CORREIA, T.C.; TSUMI, J.A. Reinvestigação sobre a distribuição da *Fasciola hepatica* no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.1, p.19-21, 1995.

SHAIKH, A A.; BILQEES, F.M.; KHAN, M.M. Bile duct hyperplasia and associated abnormalities in the buffaloes infected with *Fasciola gigantica*. **Pakistan Journal of Zoology**, v.36, n.3, p.231-237, 2004.

SLACK, J.M.W. Epithelial metaplasia and the second anatomy. **The Lancet**, v.328, n.8501, p.268-271, 1986.

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.

TOLAN, J.R.; ROBERT, W. Fascioliasis due to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* infection: an update on this 'Neglected' Neglected Tropical Disease. **LabMedicine**, v.42, n.2, p.107-116, 2011.

TRIVILIN, L.O. **Avaliação Histopatológica e Imunoistoquímica de Fígados de Bovinos Cronicamente Infectados por *Fasciola hepática***. 2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2010.

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 hepática*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.35, n.1, p.41-47, 2013.

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

VIEIRA-LOPES, D.A.; NASCIMENTO, A.A.; SALES, A.; VENTURA, A.; NOVELLI, I.A.; SOUSA, B.M.; PINHEIRO, N.L. Histologia e histoquímica do tubo digestório de *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae). **Acta Amazonica**, v.44, n.1, 2014.

WERNER, B.; CAMPOS, A.C.; NADJI, M.; TORRES, L.F.B. Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.41, n.5, p.353-364, 2005.