

IMUNOFENOTIPAGEM DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM FÍGADOS DE BOVINOS CRONICAMENTE E NATURALMENTE INFECTADOS POR *Fasciola hepatica**

Leonardo Oliveira Trivilin¹⁺, Dyeime Ribeiro de Sousa², Louisiane de Carvalho Nunes¹ e Isabella Vilhena Freire Martins¹

ABSTRACT. Trivilin L.O., Sousa D.R., Nunes L.C. & Martins I.V.F. [Immunophenotyping of inflammatory response in liver of the naturally and chronically infected cattle by *Fasciola hepatica*]. Imunofenotipagem da resposta inflamatória em fígados de bovinos cronicamente e naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(1):41-47, 2013. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, Cx. Postal 16, Alegre, ES 29500-000, Brasil. E-mail: leotrivilin@gmail.com

Fasciolosis is a zoonotic disease caused by a parasite *Fasciola hepatica* that can infect different species of animals, especially ruminants. The aim of this study to evaluate the profile of the immune response in bovine livers naturally and chronically infected by *F. hepatica*, using immunohistochemical technic by lymphocytes T and B, as well IgG plasma cells. Samples were obtained from bovine livers macroscopically positive for flukes. We collected fragments of 4 cm² of each lobe, right and left, of the 100 livers condemned for flukes. The samples were placed in 10% formalin, identified and targeted for general histopathological evaluation of morphological and intensity of inflammatory infiltration. We selected at random, 18 samples (six samples for each intensity of inflammation), which were submitted to immunohistochemical evaluation to T lymphocytes (CD3⁺), B lymphocytes (CD79α⁺) and IgG plasma cell (IgG⁺). The labeled cells by immunohistochemistry were counted in ten port space at random from each lobe. We calculated the mean number of cells per lobe. No significant difference was observed between the expression of T lymphocytes, B lymphocytes and IgG plasma cells in the right lobe (p=0.5817) and left lobe (p=0.9367). Mean T lymphocytes (CD3⁺) of the left lobe has been greater than the right lobe (p=0.019), as well as B lymphocytes (CD79α⁺) (p=0.00018) and IgG plasma cells (p=0.0002). The CD3⁺ T lymphocytes in the left hepatic lobe significantly different (p=0.024) relative to the intensity of infiltration, showing the difference between mild to severe (p<0.05). CD79α⁺ B lymphocytes in the right hepatic lobe showed significant differences (p=0.008) in the different intensities of infiltration being observed between mild and severe (p<0.01) T and B lymphocytes and IgG plasma cells are present in immune response in livers of cattle with chronic fasciolosis, being more evident in the left hepatic lobe. The immunohistochemical assessment was effective in cell immunophenotype characterization of this inflammatory response caused by natural infection becoming important in the study of bovine fasciolosis.

KEY WORDS. Immunohistochemistry, inflammation, fasciolosis.

* Recebido em 12 de março de 2012.

Aceito para publicação em 23 de janeiro de 2013.

¹ Médico-veterinário, DSc. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alto Universitário, Cx. Postal 16, Alegre, ES 29500-000, Brasil. ⁺Autor para correspondência. E-mail: leotrivilin@gmail.com E-mails: louisianecn@yahoo.com.br, ivfmartins@gmail.com

² Médica-veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFES, Alto Universitário, Cx. Postal 16, Alegre, ES 29500-000. E-mail: dyeimester@hotmail.com

RESUMO. A fasciolose é uma zoonose causada por *Fasciola hepatica*, um trematodeo digenético, que pode infectar diferentes espécies animais, especialmente ruminantes. Objetivou-se com este estudo avaliar o perfil da resposta imune frente à infecção por *F. hepatica* em fígados de bovinos cronicamente e naturalmente acometidos, por meio da imunofenotipagem dos linfócitos T e B e dos plasmócitos produtores de IgG. As amostras foram obtidas de fígados de bovinos macroscopicamente positivos para fasciolose. Foram coletados fragmentos de aproximadamente 4 cm² de cada lobo, direito e esquerdo, de 100 fígados condenados por fasciolose. As amostras foram acondicionadas em formalina 10%, devidamente identificadas e direcionadas para avaliação histopatológica geral das alterações morfológicas e intensidades do infiltrado inflamatório, sendo selecionadas, aleatoriamente, 18 amostras (seis amostras para cada intensidade de inflamação), as quais foram submetidas a avaliação imunistoquímica para linfócito T (CD3⁺), linfócito B (CD79α⁺) e plasmócito produtor de IgG (IgG⁺). As células marcadas pela imunistoquímica foram contadas em dez espaços porta, aleatoriamente, de cada lobo hepático. Foram calculadas as médias do número de células por lobo hepático. Não foi observada diferença significativa entre a expressão de linfócitos T, linfócitos B e plasmócitos produtores de IgG no lobo direito (p=0,5817) e também lobo esquerdo (p=0,9367). A média de linfócitos T (CD3⁺) do lobo esquerdo foi maior que do lobo direito (p=0,019), assim como para linfócitos B (CD79α⁺) (p=0,00018) e para os plasmócitos produtores de IgG (p=0,0002). Os linfócitos T CD3⁺ no lobo hepático esquerdo diferiram significativamente entre si (p=0,024) em relação à intensidade de infiltração, mostrando diferença entre as intensidades leve e severa (p<0,05). Os linfócitos B CD79α⁺ no lobo hepático direito apresentaram diferença significativa (p=0,008) nas diversas intensidades de infiltração, sendo verificada entre leve e severa (p<0,01). Linfócitos T e B, e células plasmáticas produtoras de IgG estão presentes na resposta imune de fígados bovinos com fasciolose crônica, sendo mais evidentes no lobo hepático esquerdo. A avaliação imunistoquímica mostrou-se eficaz na caracterização do imunofenótipo celular presente na resposta inflamatória causada pela infecção natural tornando-se importante no estudo da fasciolose bovina.

PALAVRAS-CHAVE. Imunistoquímica, inflamação, fasciolose.

INTRODUÇÃO

A fasciolose é uma zoonose causada por *Fasciola hepatica*, um trematodeo digenético, que pode infectar diferentes espécies animais, especialmente ruminantes (WHO 1995). Em várias espécies animais, as lesões hepáticas produzidas por esse parasito são geralmente similares e fortemente associadas ao número de metacercárias ingeridas, sendo que na fase migratória observa-se uma extensa reação inflamatória local (Tliba et al. 2002). Fatores como carga parasitária, fase de desenvolvimento do parasito, tipo e idade do hospedeiro, localização e condição das pastagens e época do ano influenciam na variabilidade da patogenia e sintomatologia provocada pela infecção por este parasito (Boray 1969).

As respostas imune, celular e humoral, ganham extrema importância na rejeição da infecção por *F. hepatica* e também no desenvolvimento efetivo da resistência a reinfecções (Piedrafita et al. 2004). De acordo com Meeusen et al. (1995), nas infecções por *F. hepatica* a resposta imune mediada por células tem sido descrita em termos de resposta proliferativa de linfócitos em sangue periférico contra antígenos do parasito (*in vitro*), além da resposta celular ocorrendo no parênquima hepático. Os bovinos apresentam alguma resistência à infecção pelo parasito, no entanto, ainda são incapazes de produzir uma resposta imune suficientemente forte para resistir contra todos os parasitos permanecendo, assim, suscetíveis à reinfecção (Clery et al. 1996).

Deste modo, diversos estudos foram conduzidos no intuito de avaliar a resposta imune à *F. hepatica* em ovinos (Meeusen et al. 1995, Chauvin & Boulard 1996). A resposta imune no parênquima hepático de caprinos com fasciolose também tem sido estudada com o uso da técnica de imunistoquímica (Martínez-Moreno et al. 1999, Pérez et al. 2002). A marcação das células envolvidas na resposta imune celular e humoral na infecção por *Fasciola gigantica* em fígados de bovinos e bubalinos também foi demonstrada pela imunistoquímica (Molina & Skerratt 2005). Assim, raros são os estudos imunistoquímicos em fígados de bovinos infectados com *Fasciola hepatica*. A caracterização do infiltrado inflamatório em fígados de bovinos naturalmente infectados e de forma crônica torna-se uma ferramenta importante nos estudos referentes à resposta imune desta espécie animal, bem como no entendimento da patogênese da fasciolose em ruminantes.

Diante do exposto, objetivou-se com este estudo avaliar o perfil da resposta imune frente à infecção

por *F. hepatica* em fígados de bovinos cronicamente e naturalmente acometidos, por meio da imunofenotipagem dos linfócitos T e B e dos plasmócitos produtores de IgG.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas foram obtidas de fígados de bovinos de várias idades, de ambos os sexos e de regime alimentar variado, com peso vivo aproximado de 450 Kg. Todos os animais eram provenientes do Sul do Estado do Espírito Santo e abatidos no matadouro frigorífico de Atilio Vivácqua, ES, macroscopicamente positivos para fasciolose pela observação do parasito no fígado, no período de março a julho de 2008.

Foram coletados fragmentos de aproximadamente 4 cm² da superfície visceral de cada lobo direito (formato retangular) e esquerdo (formato triangular) de 100 fígados condenados por fasciolose. As amostras foram acondicionadas em formalina 10%, devidamente identificadas e direcionadas para avaliação histopatológica.

As lâminas contendo os cortes corados pelo método Hematoxilina-Eosina (HE) foram submetidas a uma avaliação microscópica geral das alterações morfológicas e observadas as intensidades do infiltrado inflamatório quanto à presença ou ausência e intensidade (leve = +, moderada = ++ ou severa = +++).

Após classificação da intensidade do infiltrado inflamatório, foram selecionadas aleatoriamente 18 amostras, sendo seis amostras para cada intensidade de inflamação, as quais foram submetidas a avaliação imunistoquímica. Cortes seriados dos tecidos foram submetidos à técnica de complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) para linfócito T (CD3⁺), linfócito B (CD79⁺) e plasmócito produtor de IgG (IgG⁺). Detalhes dos anticorpos primários utilizados estão na Tabela 1.

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

Tabela 1. Detalhes dos anticorpos primários utilizados para a análise imunistoquímica.

Anticorpo Primário	Clone	Produção	Diluição	Origem (Referência Comercial)
Anti-CD3 (NCL-CD3-PS1)	PS1	Camundongo	1:100	Novocastra Laboratories
Anti-CD 79 α (NCL-CD79 α -192)	11D10	Camundongo	1:50	Novocastra Laboratories
Anti-Immunoglobulina G (NCL-IgGP)	-	Coelho	1:1500	Novocastra Laboratories

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

Passou-se ao bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com a imersão das lâminas em solução de leite em pó desnatado (MOLICO[®], Nestlé) a 3% em tampão TRIS por uma hora. Em seguida, as lâminas foram lavadas em solução TRIS durante cinco minutos. A incubação ocorreu em bandeja com tampa por 18 horas a 4°C.

Seguiu-se a lavagem dos cortes com tampão TRIS e incubação com o anticorpo secundário e sistema de visualização. Utilizou-se *kit* Super ABC EasyPath (Erviegas) com anticorpo secundário biotilado anti-imunoglobulina de camundongo e coelho, na diluição 1:100 e aplicação do Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase, ambos incubados por 30 minutos cada em temperatura ambiente, segundo normas do fabricante.

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

As células imunomarcadas foram quantificadas em dez espaços porta escolhidos aleatoriamente, de cada lobo hepático, sob microscopia de luz com objetiva de 40x. Após a contagem foi calculado a média total de células por lobo hepático em cada intensidade de inflamação.

A análise estatística incluiu Análise de Variância (ANOVA) para fator único ($\alpha=5\%$) para avaliação da diferença entre as células positivamente marca-

das para cada anticorpo e em cada lobo hepático. O teste *t* de Student ($\alpha=5\%$) foi usado para comparar a positividade das células entre os lobos direito e esquerdo e entre as intensidades de infiltração linfoplasmocitária.

RESULTADOS

Em relação ao local onde as células imunorreativas estavam localizadas, este estudo revelou maior presença dos tipos celulares inflamatórios nos espaços porta e próximo aos vasos sanguíneos. O resultado da contagem média das células imunomarcadas nos espaços porta aos anticorpos utilizados nas amostras pertencentes às intensidades de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário leve, moderado e severo está disposto na Tabela 2. A Figura 1 ilustra a imunomarcação pelo anticorpo CD3⁺.

Independentemente da intensidade de infiltrado linfoplasmocitário (leve, moderado ou severo), no lobo direito não foi observada diferença significativa entre a expressão de linfócitos T, linfócitos B e plasmócitos produtores de IgG ($p=0,5817$). O mesmo foi observado no lobo esquerdo ($p=0,9367$). Deste modo, não houve predominância de uma subpopulação de linfócitos sobre a outra em cada lobo hepático. Por outro lado, quando comparado o número de células imunomarcadas e entre os lobos hepáticos direito, notou-se diferença significativa.

Tabela 2. Valores médios do número de células CD3⁺, CD79 α ⁺ e IgG⁺ em espaço porta de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* caracterizados em cada intensidade de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário.

Amostra	CD3 ⁺		CD79 α ⁺		IgG ⁺	
	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo
Infiltrado leve						
A	5.7	15.6	6.8	11.5	5.4	10.8
B	13	12.5	5.2	11	6.2	9.7
C	3.7	11	8.1	15.3	10.2	14
D	13.3	11.7	9.2	27.1	9.8	15.8
E	7.6	12.1	8	12.5	8	19.3
F	6.2	15.6	8.4	15.6	8.4	13
Infiltrado moderado						
G	4.9	12.2	9.1	24.6	13.4	34
H	6.7	6.6	7	8.5	7.9	28.5
I	20.6	31.2	15.8	21.9	5.1	16.7
J	14.8	21.4	9	18	9	28.7
K	17.3	21.8	14.2	17.5	6.8	11.5
L	5.2	12.8	7.1	12	6.1	9.5
Infiltrado acentuado						
M	17.6	47.5	14.6	35.1	22.1	31.8
N	14.3	28.2	11.4	19.3	5.5	18.2
O	16.2	24.4	10.4	15.3	20.4	34.6
P	5	19.7	13	20.7	14.9	16.6
Q	12.1	23.3	13.7	19	6.3	29.3
R	34.3	19.5	17.8	28	9	15.7

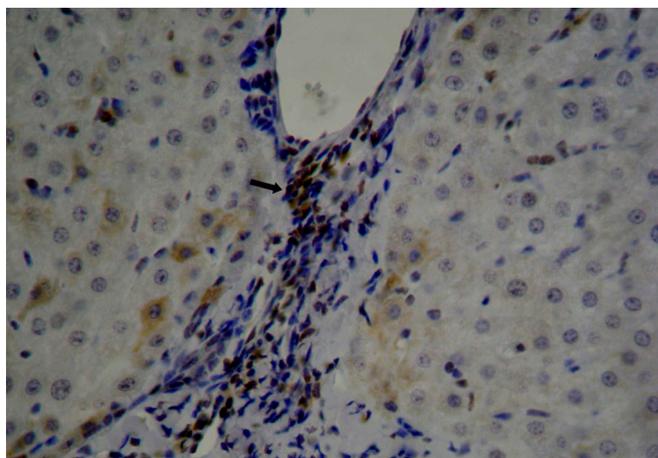


Figura 1. Fotomicrografia de fígado bovino cronicamente e naturalmente infectado por *Fasciola hepatica* demonstrando infiltrado inflamatório periportal severo, lobo esquerdo. Espaço porta com linfócitos imunomarcados com o anticorpo CD3⁺ (seta). IHQ, ABC. Obj. 20X.

Os resultados revelaram que a média de linfócitos T (CD3⁺) do lobo esquerdo foi maior que do lobo direito ($p=0,019$). O mesmo foi observado na comparação da média de linfócitos B (CD79 α ⁺) ($p=0,00018$) e para os plasmócitos produtores de IgG ($p=0,0002$). Estes resultados podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Médias das células imunorreativas aos anticorpos anti-CD3, anti-CD79 e anti-IgG em espaço porta de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* por infecção natural.

Lobo Hepático	Tipo Celular		
	CD3 ⁺	CD79 α ⁺	IgG ⁺
Direito	12,1389a	10,4889a	9,6944a
Esquerdo	19,2833b	18,4944b	19,8722b

Os linfócitos T CD3⁺ nas diferentes intensidades de infiltração inflamatória no lobo hepático esquerdo diferiram significativamente entre si ($p=0,024$), mostrando diferença entre as intensidades leve e severa ($p<0,05$). Entretanto, no lobo hepático direito não foi observada diferença entre essas células em cada intensidade de infiltração ($p=0,1674$).

Isto também foi verificado nos linfócitos B CD79 α ⁺ nas diferentes intensidades de infiltração no lobo hepático esquerdo em que não foi observada diferença significativa ($p=0,1458$). No entanto, os linfócitos B CD79 α ⁺ nas diferentes intensidades de infiltração no lobo hepático direito apresentaram diferença significativa ($p=0,008$), sendo a intensidade leve diferente da severa ($p<0,01$). Em relação aos plasmócitos produtores de IgG⁺, não foram observadas diferenças entre as intensidades de infiltração linfoplasmocitária. Esses dados estão disponíveis na Tabela 4.

Tabela 4. Médias das células imunorreativas aos anticorpos anti-CD3, anti-CD79 e anti-IgG em espaço porta de fígados bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica* por infecção natural em diferentes intensidades de infiltração inflamatória.

Lobo Hepático	Tipo Celular e Intensidade Inflamatória								
	CD3			CD79			IgG		
	Leve	Moderado	Severo	Leve	Moderado	Severo	Leve	Moderado	Severo
Direito	8.25a	11.583a	16.583a	7.617f	10.367fg	13.483g*	8.0i	8.05i	13.033i
Esquerdo	13.083a	17.667ab	27.1b*	15.5f	17.083f	22.9f	13.767i	21.483i	24.367i

* Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si.

DISCUSSÃO

Bostelmann et al. (2000) verificaram na fasciolose em bovinos, que os tipos celulares predominantes nos espaços porta são linfócitos e plasmócitos. Na análise histopatológica das amostras avaliadas neste estudo foi possível a observação de infiltrado inflamatório formado por população mista, ou seja, polimorfonucleados e mononucleados, porém, sem a distinção entre os tipos celulares pertencentes a estes últimos.

Para a distinção dos tipos celulares presentes no infiltrado inflamatório mononuclear utilizou-se a técnica de imunistoquímica que auxilia na detecção da histogênese celular. Desta forma, neste estudo testou-se os anticorpos anti-CD3, anti-CD79 α e anti-IgG afim de verificar a presença desses tipos celulares no infiltrado inflamatório em fígados de bovinos cronicamente infectados e de forma natural. A molécula CD3 está presente em linfócitos T maduros, compondo o complexo TCR-CD3. Da mesma forma, a molécula CD79 compõe o complexo receptor em linfócitos B. A escolha desses anticorpos baseou-se em outros experimentos nos quais se procurou avaliar o tipo de resposta e a dinâmica da resposta em ovinos e caprinos (Pérez et al. 1999, Pérez et al. 2002).

A presença de linfócitos T (CD3⁺) e linfócitos B (CD79 α ⁺) no infiltrado inflamatório de fígado de bovinos cronicamente infectados por *F. hepatica* reflete o envolvimento destas células na resposta imune durante a infecção. Segundo Molina e Skerratt (2005) na fasciolose bovina há o envolvimento da resposta celular e humoral na tentativa de debelar a infecção.

Martínez-Moreno et al. (1999) avaliaram a resposta imune de caprinos primariamente e secundariamente infectados com *F. hepatica*, encontrando a presença de linfócitos T (CD3⁺) e células I-IgG e o número médio de células T encontrado variou de 13,5 a 32,3, enquanto células produtoras de IgG variaram de 9,1 a 22,6 células. Molina e Skerratt (2005) relataram que em bovinos o número de lin-

fócitos T (CD3⁺) foi significativamente maior na terceira semana pós-infecção, entre 170 e 180 células em média, porém, o número de células declinou até a sexta semana pós-infecção quando cessou o experimento. Já o número de linfócitos B (CD79b⁺) foi maior que o controle a partir da sétima semana pós-infecção, aumentando progressivamente até o final do experimento. Estes dados denotam o envolvimento da resposta imune celular e humoral na fasciolose crônica, sendo que a resposta por linfócitos T apresenta-se mais intensa nas primeiras semanas pós-infecção, e à medida que declina em quantidade, há o aumento considerável dos linfócitos B.

Neste estudo, tanto no infiltrado inflamatório do lobo direito, quanto no lobo esquerdo, há um aumento progressivo do número de linfócitos T, B e plasmócitos produtores de IgG à medida em que se observa a severidade da lesão inflamatória. Assim, os dados encontrados por Molina e Skerratt (2005) são diferentes daqueles encontrados neste estudo. Porém, ressalta-se que, por se tratar de fígados crônicos e naturalmente infectados, há um determinado desbalanço do número de células inflamatórias, não apresentando desta forma, diferença significativa entre elas.

Pensa-se que parasitos podem diminuir a resposta imune do hospedeiro. Segundo Gomez-Munoz et al. (2004), a habilidade do parasito em diminuir a resposta do hospedeiro pode induzir doença crônica pelo prolongamento da sua presença no local da infecção. Geralmente, infecções helmínticas são caracterizadas pela supressão de linfócito T helper 1 (Th1) e indução de citocinas características de linfócitos T helper 2 (Th2) (Clery et al. 1996).

No entanto, linfócitos T tornam-se importantes na resposta inflamatória na fasciolose, pois influencia de forma significativa a presença de outros tipos celulares. Isso porque o papel do linfócito T na resposta imune celular está na ligação entre a detecção do antígeno e a produção de anticorpos pelos linfócitos B. De acordo com Tizard (2008) nos processos infecciosos crônicos, os diferentes subtipos

de linfócitos T são recrutados para o local de acometimento como forma de debelar a infecção. No caso dos bovinos, a produção de IgG₁ é controlada por citocinas liberadas por células Th2, ao passo que IgG₂ tem produção controlada por citocinas liberadas por células Th1 (Mulcahy e Dalton 2001). Neste estudo, estes subtipos de células T não foram avaliados.

A produção de imunoglobulina G é realizada por linfócitos B maduros e reativos denominados plasmócitos. Segundo Molina e Sekerratt (2005), a produção de anticorpos específicos por animais infectados também podem ser influenciadas pela ativação de células T durante a infecção. Isso porque linfócitos T são vistos no fígado de animais durante a infecção por *F. hepatica* (Martinez-Moreno et al. 1999, Pérez et al. 1999).

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

Pérez et al. (1998) verificaram que o anticorpo CD79 mAb reagiu com células plasmáticas e linfócitos localizados principalmente nas zonas fibrosas da lesão hepática e vesícula biliar de caprinos. O anticorpo IgG reagiu com células plasmáticas associadas à lesão hepática crônica, principalmente nos espaços porta. Apesar de serem espécies diferentes, o que se percebeu neste estudo foi a predileção das células inflamatórias pelas regiões onde as lesões fibróticas eram-se evidentes, como é o caso do espaço porta. Por este motivo, a contagem das células imunorreativas foi realizada nos espaços porta escolhidos aleatoriamente de cada lobo hepático.

Em todas as intensidades de infiltrado inflamatório avaliadas notou-se maior acometimento do lobo hepático esquerdo, revelando que na fasciolose crônica, nos fígados bovinos, as lesões mais significativas concentram-se nesse lobo hepático. Isso pode

justificar a média de linfócitos T (CD3⁺), linfócitos B (CD79α⁺) e plasmócitos produtores de IgG, encontrados neste estudo, foi significativamente maior no lobo esquerdo que no direito.

Partindo-se do princípio de que nas infecções recentes ocorre maior produção de anticorpos contra antígenos de secreção/excreção liberados durante a migração feita pelo parasito no parênquima hepático, Molina e Skerratt (2005) relataram que a infiltração de linfócitos T e B, células plasmáticas, eosinófilos e mastócitos em lesões hepáticas causadas por *F. gigantica* indica o desenvolvimento de uma resposta imune local. De acordo com estes mesmos autores, provavelmente, esta resposta seja induzida pelo aumento de antígenos liberados pelos parasitos na medida em que crescem, ou seja, o envolvimento da resposta do hospedeiro se dá desde o início da infecção persistindo até o momento em que os parasitos alcançam os ductos biliares. Porém, em relação à produção de anticorpos, células de memórias contra os antígenos do parasito continuam sua produção.

O aparecimento de IgG contra proteínas do produto de secreção e excreção dos parasitos em alpacas infectadas com *F. hepatica* culminou com níveis mais elevados na oitava semana pós-infecção quando houve o aparecimento de ovos nas fezes, porém, à medida em que a infecção se tornava crônica houve um leve declínio do nível de IgG (Timoteo et al. 2005). O estudo de Mulcahy e Dalton (2001) com bovinos revelaram que com o progresso e cronicidade da doença, os níveis séricos de IgG₁ cessaram e lentamente declinam. Desta mesma forma, no presente estudo, observou-se um aumento médio de plasmócitos produtores de IgG à medida que se intensificava a infiltração inflamatória.

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

Neste estudo, a inflamação observada variou de discreta a severa e sempre esteve associada à presença dos parasitos nos ductos biliares. Isto demonstra a existência da reação do hospedeiro frente à invasão parasitária com resposta inflamatória não

tão intensa quanto nas observadas em outras espécies animais, mesmo sendo essa infecção crônica, onde espera-se para bovinos, uma presença menor de células inflamatórias e evidência maior de lesões fibróticas.

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

CONCLUSÕES

Linfócitos T e B, e células plasmáticas produtoras de IgG estão presentes na resposta imune de fígados bovinos cronicamente e naturalmente infectados por *F. hepatica*, sendo mais evidentes no lobo hepático esquerdo. É possível verificar que quanto maior é a severidade da lesão crônica, maior é a resposta imune celular composta pelas diferentes subpopulações de linfócitos. A avaliação imunohistoquímica mostrou-se eficaz na caracterização do imunofenótipo celular presente na resposta inflamatória causada pela infecção natural tornando-se importante no estudo da fasciolose bovina.

Agradecimentos. À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) pelo suporte financeiro deste estudo. A CAPES pela concessão de bolsa de auxílio à pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boray J.C. Experimental fascioliasis in Australia. *Adv. Parasitol.*, 7:95-120, 1969.
- Bostelmann S.C.W., Luz E., Thomaz Soccol V. & Cirio S.M. Histopatologia comparativa em fígados de bovinos, bubalinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*. *Arch. Vet. Sci.*, 5:95-100, 2000.
- Chauvin A. & Boulard C. Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasite*, 3:209-215, 1996.
- Clery D., Torgerson P. & Mulcahy G. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.*, 62:71-82, 1996.
- Ferre I., Ortega-Mora L.M. & Rojo-Vázquez F.A. Serum and bile antibody responses (IgG and IgA) during subclinical *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vet. Parasitol.*, 68:261-267, 1997.
- 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*. *Vet. Parasitol.*, 120:199-214, 2004.
- Martínez-Moreno A., Jimenez-Luque V., Moreno T., Redondo E.S., de las Mulas J.M. & Perez J. Liver pathology and immune response experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. *Vet. Parasitol.*, 82:19-33, 1999.
- Meeusen E., Lee C.S., Rickard M.D. & Brandon M.R. Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. *Parasite Immunol.*, 17:537-545, 1995.
- Molina E.C. & Skerratt L.F. Cellular and humoral responses in liver of cattle and buffaloes infected with a single dose of *Fasciola gigantica*. *Vet. Parasitol.*, 131:157-163, 2005.
- Mulcahy G. & Dalton J.P. Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Res. Vet. Sci.*, 70:83-86, 2001.
- Pérez J., de las Mulas J.M., De Lara F.C., Gutierrez-Palomino P.N., Becerra-Martel C. & Martinez-Moreno A. Immunohistochemical study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in primary and secondary infected goats. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 64:337-348, 1998.
- Pérez J., de las Mulas J.M., Carrasco L., Gutierrez-Palomino P.N., Martinez-Cruz M.S. & Martinez-Moreno A. Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes in goats infected with one or more doses of *Fasciola hepatica*. *J. Comp. Pathol.*, 120:199-210, 1999.
- Perez J., Ortega J., Moreno T., Morrondo P., Lopez Sandez 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. *J. Comp. Pathol.*, 127:30-36, 2002.
- Piedrafita D., Raadsma H.W., Prowse R. & Spithill T.W. Immunology of the host-parasite relationship in fasciolosis (*Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*). *Can J. Zool.*, 82:233-250, 2004
- Timoteo O., Maco Jr V., Maco V., Neyra V., Yi P.J., Leguía G. & Espinoza J.R. Characterization of the humoral immune response in alpacas (*Lama pacos*) experimentally infected with *Fasciola hepatica* against cysteine proteinases Fas1 and Fas2 and histopathological findings. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 106:77-86, 2005.
- Tizard I.R. *Imunologia Veterinária - Uma introdução*. 8ª ed. Roca Biomedicina, São Paulo, 2008.
- Tliba O., Moire N., Vern Y.L., Boulard C., Chauvin A. & Sibille P. Early hepatic immune response in rats infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Res.*, 33:262-270, 2002.
- WHO. Study group on the control of foodborne trematode infections. Control of foodborne trematode infections: report of a WHO study group. *Report Technical Series*, Geneva, 1995. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_849_\(part1\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_849_(part1).pdf)>. Acesso em: Mai 2009.