

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 04/03/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**RELAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS ESPUMOSOS E
CÉLULAS ESTRELADAS NO DESENVOLVIMENTO DAS
LESÕES HEPÁTICAS INDUZIDAS PELA INGESTÃO DE
Brachiaria spp. EM BOVINOS**

Ana Carolina Ortegal Almeida

Médica Veterinária

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**RELAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS ESPUMOSOS E
CÉLULAS ESTRELADAS NO DESENVOLVIMENTO DAS
LESÕES HEPÁTICAS INDUZIDAS PELA INGESTÃO DE
Brachiaria spp. EM BOVINOS**

Discente: Ana Carolina Ortegãl Almeida

Orientadora: Dra. Daniela Bernadete Rozza

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de concentração: Patologia Animal.

2020

A447r Almeida, Ana Carolina Ortegal
Relação entre macrófagos espumosos e células estreladas no desenvolvimento das lesões hepáticas induzidas pela ingestão de *Brachiaria* spp. em bovinos / Ana Carolina Ortegal Almeida. -- Jaboticabal, 2020
64 p. : tabs., fotos + 1 CD-ROM

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Daniela Bernadete Rozza

1. Medicina veterinária. 2. Patologia veterinária. 3. Bovinos.
4. Macrófagos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: RELAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS ESPUMOSOS E CÉLULAS ESTRELADAS NO DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES HEPÁTICAS INDUZIDAS PELA INGESTÃO DE *Brachiaria* spp. EM BOVINOS

AUTORA: ANA CAROLINA ORTEGAL ALMEIDA

ORIENTADORA: DANIELA BERNADETE ROZZA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp



DANIELA BERNADETE ROZZA

Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

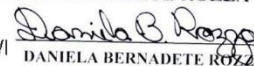
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



DANIELA BERNADETE ROZZA

Profa. Dra. PATRÍCIA PAIVA CORSETTI

Universidade José do Rosário Vellano-Campus Alfenas (UNIFENAS)) / Alfenas/



DANIELA BERNADETE ROZZA

Prof. Dr. FABIANO ANTONIO CADIOLI

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Araçatuba/SP



DANIELA BERNADETE ROZZA

Prof. Dr. LEONARDO AUGUSTO DE ALMEIDA

Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL / Alfenas/MG



DANIELA BERNADETE ROZZA

Jaboticabal, 04 de setembro de 2020



DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA CAROLINA ORTEGAL ALMEIDA – Nascida em 01 de março de 1988, em Gouveia, Minas Gerais. Ingressou em março de 2008 no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV) no Campus de Viçosa - MG, onde se graduou em novembro de 2012. Realizou residência no Programa de Residência em Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista (FMVA-UNESP), Campus de Araçatuba - SP, entre fevereiro de 2013 e janeiro de 2014. Em março de 2014, iniciou Pós-graduação, nível mestrado, em Medicina Veterinária, na área de concentração - Patologia Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV-UNESP), Campus de Jaboticabal - SP, o qual foi concluído em janeiro de 2016. Em março de 2016 iniciou doutorado em Medicina Veterinária, na área de concentração - Patologia Animal, na mesma instituição, com conclusão em setembro de 2020. Atualmente é professora de graduação na Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Campus de Alfenas – MG, onde ministra aulas nos cursos de Medicina Veterinária (disciplinas de Patologia Geral, Patologia Especial e Ornitopatologia), Enfermagem, Farmácia, Nutrição e Biomedicina (disciplina de Patologia Geral).

“É nas experiências, nas lembranças, na grande e triunfante alegria de viver na mais ampla plenitude que o verdadeiro sentido é encontrado”.

Christopher McCandless

À minha mãe, Lucirez (*in memoriam*), exemplo de mulher batalhadora, que mesmo ausente, continua a me inspirar todos os dias. Te amarei para sempre!

AGRADECIMENTOS

À profa. Dra. Daniela Bernadete Rozza pela orientação, paciência, dedicação e apoio nos momentos mais difíceis, principalmente quando eu achei que não iria conseguir. Te considero mais que uma orientadora e mentora, uma grande amiga que levarei para o resto da vida!

Ao curso de Pós-Graduação da FCAV/UNESP – Jaboticabal, pela oportunidade concedida.

Aos professores componentes das bancas de qualificação e defesa, por todas as sugestões pertinentes e extenso conhecimento compartilhado.

Aos parceiros de projeto, que me auxiliaram a desenvolver este trabalho.

A todos os amigos, presentes e distantes, que tanto me estimularam na realização de mais um sonho.

A todas as professoras do Setor de Patologia Veterinária da FMVA/UNESP por terem me ensinado tanto, e por me mostrarem o caminho, mesmo após tantos anos. Minha vida não teria sido a mesma caso tivesse seguido outro rumo!

Aos meus familiares por compreenderem o longo, árduo e contínuo caminho que escolhi, e me apoiarem mesmo nos momentos mais difíceis.

Às minhas avós, que têm me dado apoio incondicional e têm aguardado ansiosamente o fim de mais uma trajetória.

Ao meu avô Rosalvo, que nos deixou durante o período do meu doutorado, mas que sempre me incentivou muito e revelou-se muito orgulhoso das minhas conquistas.

Ao meu avô Lourival, que mesmo tendo partido há tantos anos, sempre foi para mim um exemplo de homem honesto, simples e altruísta.

À minha irmã, Mariana, por ser meu maior apoio, minha melhor amiga, e meu porto seguro, mesmo estando em outro país. Muito obrigada! Te amo muito!

Ao meu pai, que mesmo geograficamente distante desde a minha infância, fez parte de cada etapa da minha vida, sempre me apoiando a ir cada vez mais longe! Dedico este trabalho a você que tão bravamente lutou pela sua vida durante esta fase final! Um exemplo de força, perseverança e luta!

À Alexandra Asanovna Elbakyan, a “Robin Hood da Ciência”, desenvolvedora do site Sci-hub e militante que luta para que todos possam ter acesso ilimitado ao conhecimento. Sem essa batalhadora, todo este processo teria sido muito mais difícil!

À Unifenas, que estimulou meu progresso no doutorado durante a execução do meu trabalho, me permitindo afastamentos sempre que necessário.

Ao meu querido e grande amigo Rafael Magaldi. Aquele parceiro de todas as horas durante a graduação, que partiu recentemente e deixou outro buraco aqui dentro. Dizia que eu era batalhadora, pois corria atrás do que eu queria, mas meu amigo, a real inspiração é você! Nesses curtos anos de existência conseguiu “curtir a vida adoidado” e marcar a vida de cada um que teve a honra de te conhecer! Te amarei para sempre, meu caro!

À minha querida mãe, que mesmo em outro patamar, sempre me foi guia, sempre me inspirou e sempre se mostrou orgulhosa! A você, dedico toda minha vida, mãe, e espero sempre estar à altura de suas grandes ambições, afinal, filha sua tinha que correr atrás das coisas, e ser, acima de tudo, feliz e independente!

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.	3
2.1. <i>Brachiaria</i> spp.	3
2.2. Lesões e sinais clínicos associados à ingestão de <i>Brachiaria</i> spp.....	7
2.3. Macrófagos espumosos	15
2.4. Macrófagos hepáticos	18
2.5. Fibrose hepática.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Critérios para seleção das amostras	25
3.2. Protocolos histopatológicos e imuno-histoquímicos.....	26
3.3. Análise histopatológica e imuno-histoquímica.....	27
3.4. Análise estatística	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Análise histopatológica (Hematoxilina e Eosina)	30
4.2. Análise histopatológica (Tricrômico de Masson)	39
4.3. Análise imuno-histoquímica.....	41
4.3.1. Expressão de α -SMA pelas Células Estreladas Hepáticas.....	41
4.3.2. Expressão de CD163 pelos Macrófagos Espumosos e Células de Kupffer.....	45
4.4. Teste de Correlação de Pearson.....	51
5. CONCLUSÕES	52
6. REFERÊNCIAS	53



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal




CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação imunoistoquímica de macrófagos espumosos e células estreladas no fígado de bovinos alimentados com *Brachiaria spp*" protocolo nº 13.240/16, sob a responsabilidade da Profª Drª Daniela Bernadete Rozza, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP – CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 01 de setembro de 2016.

Vigência do Projeto	01/10/2016 a 31/12/2019
Espécie / Linhagem	Bovino
Nº de animais	48
Peso / Idade	Variável
Sexo	Variável
Origem	Birigui – SP.

Jaboticabal, 01 de setembro de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

RELAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS ESPUMOSOS E CÉLULAS ESTRELADAS NO DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES HEPÁTICAS INDUZIDAS PELA INGESTÃO DE *BRACHIARIA* SPP. EM BOVINOS

RESUMO - *Brachiaria* spp. é a forragem tropical mais cultivada em vários países; no entanto, muitos relatos de doenças foram descritos em animais devido à toxicidade das saponinas esteroidais presentes na planta. Essas toxinas causam danos principalmente no fígado, que pode apresentar várias lesões histopatológicas, incluindo infiltrados de células de citoplasma espumoso, conhecidas como macrófagos espumosos (ME) e fibrose. A fibrose hepática ocorre principalmente após ativação das células estreladas hepáticas (CEHs) em miofibroblastos fibrogênicos. O objetivo deste estudo foi investigar a ativação de CEHs para verificar a possível associação entre macrófagos espumosos e fibrose hepática em bovinos mantidos em pastagem de *Brachiaria*. Fragmentos de fígado de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp. foram coletados em um abatedouro e destes, 48 foram selecionados na análise histológica considerando a presença de infiltrados de macrófagos espumosos. As amostras foram divididas em 4 escores/grupos (12 animais por grupo), de acordo com a quantidade e tamanho dos infiltrados de macrófagos espumosos no parênquima hepático: 0= ausência de ME e lesões histológicas; 1= discreto; 2= moderado; 3= acentuado. As amostras foram submetidas à análise histopatológica (Hematoxilina e Eosina - HE; Tricrômico de Masson – TM para avaliar a deposição de colágeno) e imuno-histoquímica (α -SMA; CD163). A análise histopatológica revelou infiltrados inflamatórios mononucleares nos tratos portais e fibrose capsular discreta como as lesões mais frequentes. O TM exibiu fibrose discreta a moderada, geralmente envolvendo grupos de macrófagos espumosos, em regiões subcapsulares ou periportais. Houve diferença estatística significativa entre os grupos de infiltrados de macrófagos espumosos e a porcentagem de fibrose ($p= 0,001$) e imunomarcagem de CEHs ($p= 0,002$). Fígados com escore 3 apresentaram maior porcentagem de fibrose e ativação de CEHs quando comparado ao grupo 0, e houve correlação entre estas variáveis e os grupos/escores de macrófagos espumosos. A avaliação de CD163 não revelou alteração de marcação de células de Kupffer entre os grupos, porém revelou grande variação da expressão deste receptor entre os macrófagos espumosos. Não houve correlação entre a expressão de CD163 em macrófagos espumosos e a fibrose hepática. Este estudo conclui que uma quantidade maior de macrófagos espumosos pode estimular a fibrose hepática através da ativação de CEHs, sendo este achado concordante com a literatura que sugere injúria hepática crônica e fibrose em fígados de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp. Os macrófagos espumosos associados à ingestão desta pastagem, apresentam ainda, variação evidente da expressão de CD163, sendo esta expressão maior em grupos com maior quantidade destas células.

Palavras-chave: Fibrose hepática, infiltrado inflamatório mononuclear, fotossensibilização, pastagem, saponinas esteroidais

RELATIONSHIP BETWEEN FOAMY MACROPHAGES AND STELLATE CELLS IN THE DEVELOPMENT OF HEPATIC INJURIES IN CATTLE GRAZING BRACHIARIA SPP.

ABSTRACT - *Brachiaria* spp. is the most cultivated tropical forage in several countries; however, many disease reports have been described in animals due to the toxicity of steroidal saponins present in the plant. These toxins cause damage mainly to the liver, which can present several histopathological lesions, including infiltrates of cells with foamy cytoplasm, known as foamy macrophages (FM), and fibrosis. Liver fibrosis occurs mainly after activation of hepatic stellate cells (HSCs) in fibrogenic myofibroblasts. The objective of this study was to investigate the activation of HSCs to verify the possible association between foamy macrophages and hepatic fibrosis in cattle kept in *Brachiaria* pasture. Liver fragments of cattle fed with *Brachiaria* spp. were collected in a slaughterhouse and from these, 48 were selected in histological analysis considering the presence/absence of foamy macrophage infiltrates. The samples were divided into 4 scores/groups (12 animals per group), according to the amount and size of foamy macrophage infiltrates in the liver parenchyma: 0 = absence of FM (and no histological lesions); 1= mild; 2= moderate; 3= intense. The samples were submitted to histopathological analysis (Hematoxylin and Eosin - HE; Masson's trichrome - MT to assess collagen deposition) and immunohistochemistry (α -SMA; CD163). Histopathological analysis revealed mononuclear inflammatory infiltrates in the portal tracts and mild capsular fibrosis as the most frequent lesions. MT exhibited mild to moderate fibrosis, usually involving groups of foamy macrophages, in subcapsular or periportal regions. There was a significant statistical difference between the groups of foamy macrophage infiltrates and the percentage of fibrosis ($p= 0.001$) and immunostaining of HSCs ($p= 0.002$). Livers with score 3 showed a higher percentage of fibrosis and activation of HSCs when compared to group 0, and there was a correlation between these variables and the groups of foamy macrophages. The evaluation of CD163 did not reveal changes in the labeling of Kupffer cells between the groups, but it did reveal a great variation in the expression of this receptor between foamy macrophages. There was no correlation between CD163 expression in foamy macrophages and liver fibrosis. This study concludes that a larger amount of foamy macrophages can stimulate hepatic fibrosis through the activation of HSCs, which is consistent with the literature that suggests chronic liver injury and fibrosis in livers of cattle fed with *Brachiaria* spp. The foamy macrophages associated with the ingestion of this pasture, also presented an evident variation in the expression of CD163, being this expression superior in groups with a greater quantity of these cells.

Keywords: Hepatic fibrosis, mononuclear inflammatory infiltrate, photosensitization, signal grass, steroidal saponins

LISTA DE ABREVIATURAS

α -SMA – “*Alpha Smooth Muscle Actin*” (Alfa Actina de Músculo Liso)

°C – Graus Celsius

AST – Aspartato Aminotransferase

CCL2 (MCP-1) – Proteína Quimiotática de Monócitos 1

CCR2 – Receptor de Quimiocina Tipo 2

CD68 – Cluster de Diferenciação 68 – Proteína de membrana lisossomal

CD133 – Cluster de Diferenciação 133 – Proeminina-1

CD163 - Cluster de Diferenciação 163 – *Hemoglobin-Haptoglobin Scavenger Receptor*

CD206 – Cluster de Diferenciação 206 – *C-type Manose Receptor 1*

CD209 – Cluster de Diferenciação 209 – *Dendritic Cell Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin*

CEH – Célula Estrelada Hepática

CXCR3 – Receptor de Quimiocina Tipo 3

DAB – 3,3-Diaminobenzidina

DAMPs – Moléculas Padrão Associadas a Dano Tecidual – *Damage-Associated Molecular Pattern*

EGF – Fator de Crescimento Epidermal

GGT – Gama Glutamiltransferase

h - Horas

HE – Corante Hematoxilina e Eosina

HH – Corante Hematoxilina de Harris

HIMF – Fator mitogênico induzido por hipóxia

IFN- γ - Interferon gama

IGF-1 – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1

IL - Interleucina

IL- β 1 – Interleucina Beta 1

Inf.: Infiltrado

Infl.: Inflamatório

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade – *Low Density Lipoprotein*

LPS - Lipopolissacarídeo

Ly6C – Complexo Antígeno Linfocitário 6

M-CSF – Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos

ME – Macrófagos Espumosos

MEC – Matriz Extracelular

MGL-1 – *Galactose-Type C-Type Lectin*

MMP-1 – Metaloproteinase 1 (colagenase)

M1 – Macrófago Classicamente Ativado

M2 – Macrófago Alternativamente Ativado

min – Minutos

mL - Mililitro

PBS – Tampão Fosfato-Salino

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

pH – Potencial Hidrogeniônico

ROI – *Regions of Interest* (Áreas de interesse)

TGF- α - Fator de Transformação do Crescimento Alfa

TGF- β – Fator de Transformação do Crescimento Beta

TIMP-1 – Inibidor tecidual de Metaloproteinases 1

TLR – *Toll Like Receptor*

TM – Corante Tricrômico de Masson

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

UV – Ultravioleta

μ L – Microlitro

VAP-1 – Proteína de Adesão Vascular 1

VEGF – Fator de Crescimento Vascular Endotelial

Ym1 (Chi3l3) - *Chitinase-3-like Protein 3*

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Frequência das alterações histopatológicas observadas nos fígados de bovinos alimentados com <i>Brachiaria</i> spp.....	31
Tabela 2. Localização e distribuição do infiltrado inflamatório mononuclear observado em fígados de bovinos alimentados com <i>Brachiaria</i> spp.....	34

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> . (Fonte: Paciullo et al., 2016)	4
Figura 2. Fotossensibilização hepatógena provocada pelo consumo de <i>Brachiaria</i> spp. em bovino. Note que as lesões eritematosas, ulcerativas e crostosas ocorrem em região de pele despigmentada, principalmente na região dorsal. (Fonte: Seixas et al., 2016)	10
Figura 3. Um grupo de macrófagos espumosos (seta) é observado no parênquima hepático de um bovino alimentado com <i>Brachiaria</i> spp. Note que os hepatócitos apresentam discreta degeneração hidrópica. Barra: 100µm Hematoxilina e Eosina. (Fonte: Almeida, 2016)	16
Figura 4. Metodologia de análise colorimétrica do plugin “Colour Deconvolution” no software Fiji. A - Delimitação de canal vermelho para análise de CEHs imunomarcadas (coloração DAB/HH). Notar que os núcleos das células são “deletados” para que o software não os contabilize na área de interesse (ROI). B - Delimitação de canal verde para análise de porcentagem de fibrose na coloração de TM. Em vermelho está evidenciada a ROI pela ferramenta “Threshold”	29
Figura 5. Fotomicrografias de fígado de bovino alimentado com <i>Brachiaria</i> spp., pertencente ao grupo 3, apresentando acentuado infiltrado inflamatório mononuclear no espaço-porta. A - Barra: 50µm. B - Notar que o infiltrado mononuclear é composto principalmente por linfócitos (*). Barra: 10µm. Hematoxilina e Eosina	32
Figura 6. Fotomicrografia de fígado de bovino alimentado com <i>Brachiaria</i> spp., pertencente ao grupo 3. Observar um pequeno grupo de macrófagos espumosos (seta) associado a infiltrado inflamatório mononuclear discreto composto por linfócitos (cabeça de seta) e discreta degeneração hidrópica de hepatócitos circunjacentes (*). Barra: 10µm. Hematoxilina e Eosina	33
Figura 7. Fotomicrografias de fígados de bovinos alimentados com <i>Brachiaria</i> spp., pertencentes ao grupo 3. A - Observa-se área focalmente extensa de fibrose capsular e subcapsular associada a neovascularização, proliferação de ductos biliares e infiltrado inflamatório mononuclear. Barra: 50µm. B – Área focal mostrando proliferação de ductos biliares (*) associados a um grupo de macrófagos espumosos (seta). Barra: 10µm. Hematoxilina e Eosina.....	37

- Figura 8. Fotomicrografia de fígado de bovino alimentado com *Brachiaria* spp., pertencente ao grupo 2. Delicada deposição de fibras colágenas (setas) envolvendo um grupo de macrófagos espumosos localizado próximo à veia centrolobular. Barra: 10µm. Tricrômico de Masson40
- Figura 9. Fotomicrografias de fígados de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp. **A** – Fígado do grupo 3. Proliferação de tecido conjuntivo fibroso (fibras colágenas eosinofílicas) formando pontes entre espaços-porta (pontes portais - setas) associado a infiltrado inflamatório mononuclear. Barra: 100µm. Hematoxilina e Eosina. **B** – Fígado do grupo 2. Proliferação de tecido conjuntivo fibroso (fibras colágenas em azul) formando pontes entre espaços-porta (pontes portais - setas). Barra: 100µm. Tricrômico de Masson.....41
- Figura 10. Fotomicrografias de fígados de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp. com imunomarcção de α -SMA em CEHs. **A** - Fígado do grupo 3 – Evidente positividade de CEHs ao redor de um infiltrado médio de macrófagos espumosos (*). Forte imunomarcção é observada ao longo dos sinusoides (setas). Barra: 10µm. **B** – Fígado do grupo 2 – Discreta delimitação dos sinusoides pelas CEHs (setas). Barra: 10µm. **C** – Fígado do grupo 1- Forte positividade para CEHs ao longo dos sinusoides. Notar imunomarcção positiva de CEHs envolvendo um pequeno grupo de macrófagos espumosos (seta). Barra: 50µm. **D** – Fígado do grupo 0 - Delicada imunomarcção de CEHs ao longo dos sinusoides (setas). Barra: 10µm. Kit Novolink. Cromógeno DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris.....42
- Figura 11. Médias para porcentagem de fibrose no Tricrômico de Masson (A) e imunomarcção de CEHs para α -SMA (B) em fígados de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp. **A** - Notar a maior proporção de fibrose em fígados com maior escore de macrófagos espumosos (grupos 3 e 2) ($p=0,001$). Não houve diferença estatística entre os grupos 0 e 1. **B** - Médias para porcentagem de CEHs revelou diferença de imunomarcção entre os grupos/escores de macrófagos espumosos ($p=0,002$). Fígados dos grupos 3 e 1 apresentaram maior imunomarcção para CEHs enquanto os fígados dos grupos 2 e 0 mostraram menor imunomarcção. (A-B – Teste de Comparações Pareadas de Tukey – Confiança de 95%)43
- Figura 12. Médias de imunomarcção para CD163 em macrófagos espumosos (A) e células de Kupffer (B) em fígados de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp. **A** – Há evidente maior média de contagem de macrófagos espumosos imunopositivos para CD163 nos grupos com maior escore de ME ($p=0,003$). **B** - Médias para porcentagem imunomarcção de células de Kupffer não revelou diferença entre os grupos/escores de macrófagos espumosos ($p=0,001$). (A-B – Teste de Comparações Pareadas de Tukey – Confiança de 95%)46

Figura 13. Fotomicrografias de fígados de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp. Imunomarcção de ME (*) e células de Kupffer (setas) para CD163. **A** - Fígado do grupo 3 – Positividade variável para CD163 em um grupo de macrófagos espumosos. Note que, no mesmo grupo, alguns macrófagos espumosos expressam CD163 (coloração amarronzada) enquanto outros não expressam. Barra: 10µm. **B** – Fígado do grupo 3 – Forte marcação para CD163 em um grupo de macrófagos espumosos. **C** – Fígado do grupo 2 – Um pequeno grupo de macrófagos espumosos apresenta fraca imunomarcção para CD163. Note que as células de Kupffer (setas) ao redor apresentam expressão mais forte. **D** – Fígado do grupo 1 – Um grupo médio de macrófagos espumosos não expressa CD163. As células de Kupffer apresentam expressão para CD163, tanto entremeadas aos macrófagos espumosos, quanto nos sinusoides. Note que há infiltrado inflamatório de linfócitos juntos aos ME. Kit Novolink. Cromógeno DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris.....48

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se consolidou em 2018 como o país de maior rebanho bovino do mundo, com mais de 221 milhões de cabeças de gado, dos quais 81,45% são voltados para agropecuária de corte. Apesar da alta produtividade, somente 12,6% dos animais abatidos em 2018 foram terminados em confinamento, sendo o restante criado de forma extensiva. As áreas de pastagens totalizaram 162,5 milhões de hectares em 2018, evidenciando o perfil extensionista da agropecuária nacional (ABIEC, 2019). Devido à alta adaptabilidade e produtividade em condições de clima tropical, gramíneas do gênero *Brachiaria* são as mais dominantes no Brasil, e representam mais de 50% das áreas de pastagens brasileiras (Demarchi et al., 2016). Ainda, segundo Jank e colaboradores (2014) *Brachiaria* spp. é a forrageira tropical mais cultivada extensivamente na América Latina, Ásia, Austrália e Pacífico Sul, sendo que somente no Brasil, seu cultivo excede 99 milhões de hectares.

A *Brachiaria* spp. é considerada uma pastagem de qualidade para produção animal (Low, 2015), pois apresenta alta produção de matéria seca, é de fácil cultivo e apresenta boa adaptação em diferentes solos durante todo o ano (Riet-Correa et al., 2011). Apesar disso, há diversos relatos de intoxicação por *Brachiaria* spp., que relatam condição corporal ruim, fotossensibilização e perda de peso em animais de produção ao longo dos anos, principalmente no Brasil (Barbosa et al., 2006; Sousa et al., 2010; Albernaz et al., 2010; Riet-Correa et al., 2010; Riet-Correa et al., 2011; De Oliveira et al., 2013; Low, 2015). Entre 1979 e 2009 mais de 100 surtos de intoxicação por *Brachiaria decumbens* foram relatados à Escola de Veterinária e Ciência Animal da Universidade Estadual Paulista (Unesp), e mais de 20 surtos foram relacionados a *B. brizantha* (Riet-Correa et al., 2011). As injúrias teciduais provocadas pela *Brachiaria* spp. são associadas à presença de saponinas esteroidais, glicosídeos relacionados a mecanismos de defesa da planta, que agem como uma barreira química protetora contra insetos e outros predadores (Muniandy et al., 2020). Estas toxinas causam danos celulares principalmente no fígado, e a severidade das lesões histopatológicas aumentam com o tempo de exposição à *Brachiaria* spp. (Low, 2015; Muniandy et al., 2020).

Na histologia, os danos hepáticos associados à ingestão de *Brachiaria* spp. são caracterizados por degeneração hidrópica de hepatócitos, necrose centrolobular ou aleatória, colangio-hepatite, por vezes associada à presença de cristais birrefringentes bloqueando ductos biliares, proliferação de ductos biliares e a presença de macrófagos espumosos (Driemeier et al., 1998; Driemeier et al., 1999; Cruz et al., 2001; Brum et al., 2007; Sousa et al., 2010; Albernaz et al., 2010; Riet-Correa et al., 2010; Riet-Correa et al., 2011; De Oliveira et al., 2013; Ogliari et al., 2018).

Os macrófagos espumosos são distribuídos aleatoriamente pelo parênquima hepático, arranjados em grupos ou isolados, localizados principalmente próximo à veia centrolobular (Driemeier et al., 1998; Driemeier et al., 1999; Riet-Correa et al., 2010). Estas células não se coram pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS), se coram fracamente pelo *Red Oil O* (Driemeier et al., 1998) e apresentam imunomarcagem positiva para MAC387 (Faccin et al., 2016) e CD68 (Araújo et al., 2017), sendo, portanto, realmente macrófagos.

Alguns estudos têm demonstrado que *Brachiaria* spp. causa injúria hepática crônica (Riet-Correa et al., 2010; Faccin et al., 2016; Ogliari et al., 2018) e alta condenação de fígados bovinos em abatedouros devido a fibrose, chegando por vezes a prejuízos superiores a 100 mil reais por ano em cada abatedouro (Faccin et al., 2015). Sabe-se que a Célula Estrelada Hepática (CEH) é, após ativação, a principal célula fibrogênica no fígado, devido à sua transdiferenciação em miofibroblastos (Tsuchida e Friedman, 2017).

Após injúria hepática, as CEHs mudam seu fenótipo para miofibroblastos, que são proliferativos, inflamatórios e quimiotáticos, caracterizados por elevada produção de matriz extracelular (Tsuchida e Friedman, 2017). Diferentes tipos de agentes tóxicos produzem mediadores que induzem um estado inflamatório nas células hepáticas. Os hepatócitos lesados e células biliares liberam DAMPS que ativam células de Kupffer e desencadeiam o recrutamento de células T ativadas. O meio inflamatório leva à ativação das CEHs em miofibroblastos fibrogênicos. O processo é autossuficiente, pois as CEHs secretam citocinas que perpetuam seu estado ativado. Se a injúria persiste, há acúmulo de CEHs ativadas, que sintetizam grande quantidade de MEC, com consequente fibrose (Bataller e Brenner, 2005).

Macrófagos hepáticos desempenham um papel chave na iniciação e progressão da fibrose pois produzem respostas inflamatórias quando há necrose de hepatócitos (Li et al., 2016) e podem expressar grandes quantidades de TGF-beta, a mais importante citocina fibrogênica (Koyama e Brenner, 2017).

Muito pouco se sabe sobre a real atuação dos macrófagos espumosos no desenvolvimento de lesão hepática em animais alimentados com gramíneas do gênero *Brachiaria*. Assim, a hipótese deste estudo é que os macrófagos espumosos auxiliam no desencadeamento das lesões hepáticas crônicas que resultam em fibrose exacerbada através da ativação de CEHs. Portanto, os objetivos deste estudo foram: detectar CEHs ativadas por imuno-histoquímica e comparar sua ativação a um escore de infiltrados de macrófagos espumosos no parênquima hepático; avaliar a ativação dos macrófagos espumosos e células de Kupffer e; verificar se há associação entre a presença de macrófagos espumosos e a fibrose hepática em bovinos alimentados com *Brachiaria* spp.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo concluem que houve maior imunodeteção de células estreladas hepáticas ativadas e maior porcentagem de deposição de fibras colágenas (fibrose) em fígados com maior quantidade de macrófagos espumosos, principalmente quando comparado com fígados sem macrófagos espumosos. Estes achados estão em concordância com a literatura que sugere relação de injúria hepática crônica e fibrose em fígados de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp. Houve maior expressão de CD163 nos fígados de animais com maior quantidade de macrófagos espumosos, que em animais com quantidade moderada e discreta destas células.

6. REFERÊNCIAS

- Abdullah AS, Lajis NH, Bremner JB, Davies NW, Mustapha W, Rajion MA (1992) Hepatotoxic constituents in the rumen of *Brachiaria decumbens* intoxicated sheep. **Veterinary and Human Toxicology** 34:154-155.
- ABIEC. **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne**. Perfil da Pecuária no Brasil – Relatório Anual de 2019. Disponível em: <<http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2019/>>. Acesso em: 28 jan. 2020.
- Albernaz TT, Silveira JAS, Silva NS, Oliveira CHS, Reis ASB, Oliveira CMC, Duarte MD, Barbosa JD (2010) Photosensitization of sheep kept on *Brachiaria brizantha* pasture in the state of Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 30:741-748.
- Alessi AC, Fagliari JJ, Okuda HT, Passipieri M (1994) Intoxicação natural de bovinos pela esporidesmina. IV. Lesões hepáticas. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia** 46(4):319-328.
- Ackermann MR, DeBey BM, Stabel TJ, Gold JH, Register KB, Meehan JT (1994) Distribution of anti-CD68 (EBM11) immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine tissues. **Veterinary Pathology** 31:340-348.
- Almeida ACO (2016) **Anatomo-histopatologia de fígados bovinos: relação entre as lesões e os sistemas de produção**. 58f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Unesp, Jaboticabal.
- Araújo RR, Pupin RC, Madureira RC, Morais LG, Quevedo LS, Lemos RAA, Schild AL, Colodel EM, Castro MB (2017) Characterization and frequency of histological changes in bovine livers from slaughterhouses in Brazil kept on *Brachiaria* spp. **Acta Scientia Veterinariae** 45:1432.
- Assumaidae AA, Zamri-Saad M, Jasni S, Noordin MM (2010) The role of oxidative stress in *Brachiaria decumbens* toxicity in sheep. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science** 33(1):151-157.
- Baber R (1989) Photosensitisation: a note of caution in the use of *Brachiaria* pastures – a review. **Tropical Animal Health and Production** 21:277-280.
- Bansal R, Baarlen J, Storm G, Prakash J (2015) The interplay of the notch signaling in hepatic stellate cells and macrophages determines the fate of liver fibrogenesis. **Scientific Reports** 5:18272.
- Barbosa JD, Oliveira CMC, Tokarnia CH, Peixoto PV (2006) Hepatogenous photosensitization in horses caused by *Brachiaria humidicola* (Graminae) in the state of Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 26:147-153.

Bardadin KA, Scheuer PJ, Peczec A, Wejman J (1991) Immunocytochemical observations on macrophage populations in normal fetal and adult human liver. **Journal of Pathology** 164:253-259.

Barros CSL (2016) Fígado, vias biliares e pâncreas exócrino. In: Santos RL, Alessi AC. **Patologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rocca, p. 181-265.

Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G (2013) Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. **PLoS ONE** 8(11):e80908.

Bataller R, Brenner DA (2005) Liver fibrosis. **Journal of Clinical Investigation** 115:2009-2018.

Benyon RC, Arthur MJ (2001) Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. **Seminars in Liver Disease** 21:373-384.

Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL (2006) Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. **Liver International** 26:1175-1186.

Bogdanos DP, Gao B, Gershwin ME (2013) Liver Immunology. **Comprehensive Physiology** 3:567-598.

Boabaid FM, Antoniassi NAB, Pescador CA, Souza MA, Gasparetto ND, Cruz CEF, Bezerra Júnior PS, Driemeier D, Colodel EM (2011). Lectin histochemistry on sections of liver and lymph nodes from sheep grazing on *Brachiaria* spp. In: Riet-Correa F, Pfister J, Schild AI, Wierenga T. **Poisoning by plants, mycotoxins and related toxins**. Eds. London: CAB International, p. 124-128.

Braga TT, Agudelo JSH, Camara NOS (2015) Macrophages during the fibrotic process: M2 as a friend and foe. **Frontiers in Immunology** 6:602.

Breitkopf K, Godoy P, Ciucian L, Singer MV, Dooley S (2006) TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. **Zeitschrift für Gastroenterologie** 44:57-66.

Brown DL, Wettre AJ, Cullen, JM (2018) Sistema hepatobiliar e pâncreas exócrino. In: Zachary JF. **Bases da Patologia em Veterinária**. Tradução 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 412-470.

Brum KB, Haraguchi M, Lemos RAA, Riet-Correa F, Fioravanti MCS (2007) Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 27:39-42.

Brun P, Castagliuolo I, Pinzani M, Palu G, Martines D (2005) Exposure to bacterial cell wall products triggers an inflammatory phenotype in hepatic stellate cells. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology** 289:G571-G578.

Caiedo JA, Ospina JC, Chaves CA, Peña J, Lozano MC, Doncel B (2012) Hepatic lesions in cattle grazing on *Brachiaria decumbens* in Mesetas, Meta (Colombia). **Revista de Medicina Veterinária e Zootecina** 59:102-108.

Canbay A, Friedman S, Gores GJ (2004) Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. **Hepatology** 39:273-278.

Cardona-Álvarez J, Vargas-Vilória M, Paredes-Herbach E (2016) Clinical and histopathological of the phototoxic dermatitis in zebu calves in grazing of *Brachiaria decumbens*. **Revista MVZ Córdoba** 21:5366-5380.

Chang J, Hisamatsu T, Shimamura K, Yoneno K, Adachi M, Naruse H, Igarashi T, Higuchi H, Matsuoka K, Kitazume MT, Ando S, Kamada N, Kanai T, Hibi T (2013) Activated hepatic stellate cells mediate the differentiation of macrophages. **Hepatology Research** 43:658-669.

Chen Y, Yu Q, Xu CB (2017) A convenient method for quantifying collagen fibers in atherosclerotic lesion by ImageJ software. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine** 10:14904-14910.

Chung ELT, Predith M, Nobilly F, Samsudin AA, Jesse FFA, Loh TC (2018) Can treatment of *Brachiaria decumbens* (signal grass) improve its utilization in the diet of small ruminants? – a review. **Tropical Animal Health and Production** 50:1727-1732.

Costa SZR, Nespoli PB, Bezerra Júnior PS, Nogueira VA, Driemeier D, Boabaid FM, Peixoto PV, Armién AM, França TN (2013) Avaliação lectino-histoquímica de fígado e rim de ovinos com fotossensibilização causada por *Brachiaria decumbens*. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 33(8):955-962.

Cruz C, Driemeier D, Pires VS, Schenkel EP (2001) Experimentally induced cholangiohepatopathy by dosing sheep with fractionated extracts from *Brachiaria decumbens*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 13:170-172.

David BA, Rezende RM, Antunes MM, Santos MM, Freitas-Lopes MA, Diniz AB, Pereira RVS, Marchesi SC, Alvarenga DM, Nakagaki BN, Araújo AM, Reis DS, Rocha RM, Marques PE, Lee WY, Deniset J, Liew PX, Rubino S, Cox L, Pinho V, Cunha TM, Fernandes GR, Oliveira AG, Teixeira MM, Kubes P, Menezes GB (2016) Combination of mass cytometry and imaging analysis reveals origin, location, and functional repopulation of liver myeloid cells in mice. **Gastroenterology** 151(6):1176-1191.

Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR (2013) Tissue-resident macrophages. **Nature Immunology** 14(10):986-995.

De Oliveira CHS, Barbosa JD, Oliveira CMC, Bastianetto E, Melo MM, Haraguchi M, Freitas LGL, Xavier MS, Leite RC (2013) Hepatic photosensitization in buffaloes intoxicated by *Brachiaria decumbens* in Minas Gerais state, Brazil. **Toxicol** 73:121-129.

Demarchi JJAA, Manella MQ, Primavesi O, Frighetto RTS, Romero LA, Berndt A, Lima MA (2016) Effect of seasons on enteric methane emissions from cattle grazing *Urochloa brizantha*. **Journal of Agricultural Science** 8:106-115.

Dey A, Allen J, Hankey-Giblin PA (2015) Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages. **Frontier Immunology** 5:683.

Dias-Filho MB, Carvalho CJR (2000) Physiological and morphological responses of *Brachiaria* spp. to flooding. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35:1959-1966.

Driemeier D, Döbereiner J, Peixoto PV, Brito MF (1999) Relationship between foamy macrophages in the liver of cattle and the ingestion of *Brachiaria* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 19:79-83.

Driemeier D, Barros SS, Peixoto PV, Tokarnia CH, Döbereiner J, Brito MF (1998) Histologic, histochemical and ultrastructural study of livers and lymph nodes with foamy macrophages (foam cells). **Pesquisa Veterinária Brasileira** 18:29-34.

Driemeier D, Colodel EM, Seits AL, Barros SS, Cruz CE (2002) Study of experimentally induced lesions in sheep by grazing *Brachiaria decumbens*. **Toxicon** 40:1027-1031.

Düvel A, Frank C, Schnapper A, Schuberth HJ, Sipka A (2012) Classically or alternatively activated bovine monocyte-derived macrophages *in vitro* do not resemble CD163/Calprotectin biased macrophage populations in the teat. **Innate Immunity** 18(6):886-896.

Faccin TC, Brumatti RC, Lima SC, Madureira RC, Fernandes CES, Kommers GD, Lemos RAA (2015) Economic losses through condemnation of bovine livers in abattoirs due to fibrosis induced by *Brachiaria* spp. ingestion. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 35:547-541.

Faccin TC, Kommers GD, Galiza GJN, Pupin RC, Madureira RC, Lemos RAA (2016) Chronic liver disease in cattle associated with ingestion of *Brachiaria* spp. **Ciência Rural** 46:2036-2042.

Faccin TC, Riet-Correa F, Rodrigues FS, Santos AC, Melo GK, Silva JA, Ferreira R, Itavo CCBF, Lemos RA (2014) Poisoning by *Brachiaria brizantha* in flocks of naive and experienced sheep. **Toxicon** 82:1-8.

Fagliari JJ, Okuda HT, Kuchembuck MRG et al. (1993a) Intoxicação natural de bovinos pela esporidesmina. I. Aspectos epidemiológicos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia** 45:263-274.

Fagliari JJ, Passipieri M, Kuchembuck MRG et al. (1993b) Intoxicação natural de bovinos pela esporidesmina. II. Aspectos clínicos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia** 45:275-282.

Fagliari JJ, Oliveira JA, Kuchembuck MRG et al. (1993c) Intoxicação natural de bovinos pela esporidesmina. III. Desenvolvimento ponderal de bovinos intoxicados. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia** 45:283-289.

Fan J, Liu L, Liu Q, Cui Y, Yao B, Zhang M, Gao Y, Fu Y, Dai H, Pan J, Qiu Y, Liu CH, He F, Wang Y, Zhang L (2019) CKIP-1 limits foam cell formation and inhibits atherosclerosis by promoting degradation of Oct-1 by REG γ . **Nature Communications** 10:425.

Fioravanti MCS (1999) **Incidência, avaliação clínica, laboratorial e anatomopatológica da intoxicação subclínica por esporidesmina em bovinos.** 256f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Unesp, Botucatu.

Fioravanti MCS, Araújo EG, Kuchembuck MRG, Fleury LFF, Silva LAF, Laufer R, Chianchi C (2001) Quantificação e caracterização dos macrófagos espumosos encontrados no fígado de bovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA. **Resumos...** Campo:Associação Brasileira de Buiatria , p.133.

Flaøyen A, Smith BL, Miles CO (1993) An attempt to reproduce crystal-associated cholangitis in lambs by the experimental dosing of sarsasapogenin or diosgenin alone and in combination with sporidesmin. **New Zealand Veterinary Journal** 41:171-174.

Florindo JB, Silva NR, Romualdo LM, Sila FF, Luz PHC, Herling VR, Bruno OM (2014) *Brachiaria* species identification using imaging techniques based on fractal descriptors. **Computers and Eletronics in Agriculture** 103:48-54.

Freitas-Lopes MA, Mafra K, David BA, Carvalho-Gontijo R, Menezes GB (2017) Differential location and distribution of hepatic immune cells. **Cells** 6:48.

Friedman SL (2004) Mechanisms of disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology** 1(2):98-105.

Friedman SL (2008) Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiology Reviews** 88:125-172.

Gayotto LCC, Alves VAF, Mello ES (2000) Fígado e vias biliares. In: Filho GB. **Bogliolo Patologia.** 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 643-699.

Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity** 19(1):71-82.

Gomar MS (2002) **Características das células espumosas no fígado, linfonodos mesentéricos e intestino de bovinos associado ao consumo de *Brachiaria* spp.** 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre.

Gomar MS, Driemeier D, Colodel EM, Gimeno EJ (2005) Lectin histochemistry of foam cells in tissues of cattle grazing *Brachiaria* spp. **Journal of Veterinary Medicine** 52:18-21.

Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology** 3(1):23-35.

Gordon S, Plüddermann A (2017) Tissue macrophages: heterogeneity and functions. **Biomed Central Biology** 15:53.

Gracindo CV, Louvandini H, Riet-Correa F, Barbosa-Ferreira M, Castro MB (2014) Performance of sheep grazing *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizantha*, *Panicum maximum* and *Andropogon gayanus* with different protodioscin concentrations. **Tropical Animal Health and Production** 46:733-737.

Graydon RJ, Hamid H, Zahari P, Gardiner C (1991) Photosensitisation and crystal-associated cholangiohepatopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens*. **Australian Veterinary Journal** 68(7):234-236.

Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S (2002) Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. **Frontiers in Bioscience** 7:D793-807.

Guillot A, Tacke F (2019) Liver macrophages: old dogmas and new insights. **Hepatology Communications** 3(6):730-743.

Hellerbrand C (2013) Hepatic stellate cells – the pericytes in the liver. **European Journal of Physiology** 465:775-778.

Heymann F, Tacke F (2016) Immunology in the liver – from homeostasis to disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** 13:88-110.

Heymann F, Peusquens J, Ludwig-Portugall I, Kohlhepp M, Ergen C, Niemietz P, Martin C, Rooijen N, Ochando JC, Randolph GJ, Luedde T, Ginhoux F, Kurts C, Trautwein C, Tacke F (2015) Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. **Hepatology** 62:279-291.

Jank L, Barrios SC, do Valle CB, Simeão RM, Alves GF (2014) The value of improved pastures to Brazilian beef production. **Crop and Pasture Science** 65:1132–1137.

Jenne CN, Kubes P (2013) Immune surveillance by the liver. **Nature Immunology** 14:996-1006.

Kinnman N, Hultcrantz R, Barbu V, Rey C, Wendum D, Poupon R, Housset C (2000) PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. **Laboratory Investigation – Nature** 80:697-707.

Komohara Y, Hirahara J, Horikawa T, Kawamura K, Kiyota E, Sakashita N et al. (2006) AM-3K, an anti-macrophage antibody, recognizes CD163, a molecule associated with

an anti-inflammatory macrophage phenotype. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 54:763-771.

Kordes C, Sawitza I, Muller-Marbach A, Ale-Agha N, Keitel V, Klonowski-Stumpe H, Haussinger D (2007) CD133(+) hepatic stellate cells are progenitor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 352: 410-417.

Kosmac K, Peck BD, Walton RG, Mula J, Kern PA, Bamman MM, Dennis RA, Jacobs CA, Lattermann C, Johnson DL, Peterson CA (2018) Immunohistochemical identification of human skeletal muscle macrophages. **Bio-protocol** 8(12):e2883.

Kostallari E, Shah VH (2019) Pericytes in the liver. **Advances in Experimental Medicine and Biology** 1122:153-167.

Koyama Y, Brenner DA (2017) Liver inflammation and fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation** 127(1):55-64.

Lajis NH, Abdullah AS, Salim SJ, Bremner JB, Khan MN (1993) Epi-sarsapogenin and epi-smilagenin: Two saponin isolated from the rumen content of sheep intoxicated by *Brachiaria decumbens*. **Steroids** 58:387-389.

Lalor PF, Adams DH (1999) Adhesion of lymphocytes to hepatic endothelium. **Molecular Pathology** 52:214-219.

Lalor PF, Schields P, Grant AJ, Adams DH (2002) Recruitment of lymphocytes to the human liver. **Immunology and Cell Biology** 80:52-64

Lelis DL, Rennó LN, Chizzotti ML, Pereira CER, Silva JCP, Moreira LGT, Carvalho FBP, Chizzotti FHM (2018) Photosensitization in naïve sheep grazing signal grass (*Brachiaria decumbens*) under full sunlight or a silvopastoral system. **Small Ruminant Research** 169:24-28.

Lemos RAA, Ferreira LCL, Silva SM, Nakazato L, Salvador SC (1996) Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagem com *Brachiaria decumbens*. **Ciência Rural** 26(1):109-113.

Lemos RAA, Nakazato L, Herrero Junior GO, Silveira AC, Porfirio LC (1998) Fotossensibilização e Colangiopatia associada a cristais em caprinos mantidos sob pastagens de *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural** 28:507-510.

Lemos RAA, Salvador SC, Nakazato L (1997) Photosensitization and crystal associated cholangiohepatopathy in cattle grazing *Brachiaria decumbens* in Brazil. **Veterinary and Human Toxicology** 39:376-377.

Lima FGD, Haraguchi M, Pfister JA, Guimarães VY, Andrade DF, Ribeiro CS, Costa GL, Araújo ALL, Fioravanti MCS (2012) Weather and plant age affect the levels of

steroidal saponin and *Pithomyces chartarum* spores in *Brachiaria* grass. **The International Journal of Poisonous Plant Research** 2:45-53.

Lima FGD, Lee ST, Pfister JA, Miyagi ES, Costa GL, Silva RDD, Fioravanti MCS (2015) The effect of ensiling and haymaking on the concentrations of steroidal saponin in two *Brachiaria* grass species. **Ciência Rural** 45:858-866.

Lima FG, Ribeiro CS, Andrade DDF, Guimarães VY, Wysocki Júnior HL, Haraguchi M, Fioravanti MCS (2009) Braquiária: fatores que interferem nos níveis de saponina. **Ciência Animal Brasileira** 1(Supl.):367-372.

Li H, You H, Fan X, Jia J (2016) Hepatic macrophages in liver fibrosis: pathogenesis and potential therapeutic targets. **BMJ Open Gastroenterology** 3:e000079.

Low SG (2015) Signal grass (*Brachiaria decumbens*) toxicity in grazing ruminants. **Agriculture** 5:971-990.

Marques NC, Moreira PRR, Bertolo PHR, Gava FN, Vasconcelos RO (2018) Immunodetection of hepatic stellate cells in dogs with visceral leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research** 117:1829-1837.

Marra F, Romanelli RG, Giannini C, Failli P, Pastacaldi S, Arrighi MC, Pinzani M, Laffi G, Montalto P, Gentilini P (1999) Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. **Hepatology** 29:140-148.

McGuinness PH, Painter D, Davies S, McCaughan GW (2000) Increases in intrahepatic CD68 positive cells, MAC387 positive cells, and proinflammatory cytokines (particularly interleukin 18) in chronic hepatitis C infection. **Gut** 46:260-269.

Mendonça FS, Camargo LM, Freitas SH, Dória RGS, Baratella-Evêncio L, Evêncio-Neto J (2008) Aspectos clínicos e patológicos de um surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos pela ingestão de *Brachiaria decumbens* (Graminae) no município de Cuiabá, Mato Grosso. **Ciência Animal Brasileira** 9(4):1034-1041.

Miles CO, Wilkins AL, Erasmus GL, Kellerman TS, Coetzer JA (1994) Chemical composition of biliary crystals from a sheep with experimentally induced geeldikkop. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research** 61:215-222.

Miles CO, Wilkins AL, Munday SC, Holland PT, Smith BL, Lancaster MJ, Embling PP (1992) Identification of the calcium salt of epismilagenin.β-D-glucuronide in the bile crystals of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* and *Panicum schinzii* toxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 40:1606-1609.

Moreira CN, Moraes M, Garcia EC, Neto SC, Araújo EG, Fioravanti, MCS (2009) Bovinos alimentados com *Brachiaria* spp e *Andropogon gayanus*: alterações histológicas de fígado e linfonodos. **Ciência Animal Brasileira** 10(1):206-218.

Moreira PRR, Fernando FS, Montassier HJ, André MR, Vasconcelos RO (2016) Polarized M2 macrophages in dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology** 226:69-73.

Mosser DM (2003) The many faces of macrophage activation. **Journal of Leucocyte Biology** 73:209-212.

Muniandy KV, Chung ELT, Jaapar MS, Hamdan MHM, Salleh A, Jesse FFA (2020) Filling the gap of *Brachiaria decumbens* (signal grass) research on clinic-pathology and haemato-biochemistry in small ruminants: a review. **Toxicon** 174:26-31.

Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP (2002) Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. **Journal of Biological Chemistry** 277:11069-11076.

Murray PJ, Wynn TA (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology** 11:723-737.

Mustafa VS, Moscardini ARC, Borges JRJ, Reckziegel GC, Riet-Correa F, Castro, MB (2012) Intoxicação natural por *Brachiaria* spp. em ovinos no Brasil Central. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 32(12):1272-1280.

Noordin M, Abdullah AS, Rajion M (1989) Experimental *Brachiaria decumbens* toxicity in cattle. **Veterinary Research Communications** 13:491-494.

Ogliari D, Molossi FA, Savaris T, Wicpolt NS, Zancan I, Gava A (2018) Spontaneous poisoning by *Brachiaria* hybrid cv. mulato I in goats and sheep and experimental poisoning of *Brachiaria* hybrid cv. mulato II in sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 38:229-233.

Opasina BA (1985) Photosensitization jaundice syndrome in West African dwarf sheep and goats grazed on *Brachiaria decumbens*. **Tropical Grasslands** 19(3):120-123.

Othman AM, Yusuff MK, Rahman OA (1983) Jaundice and photosensitization in indigenous sheep of Malaysia grazing on *Brachiaria decumbens*. **The Malaysian Veterinary Journal** 7:254-263.

Paciullo DSC, Gomide CAM, Leite JLB, Resende H (2016) **Tecnologia e custo de produção de *Brachiaria decumbens* para uso sob pastejo**. Juiz de Fora: Embrapa, 6 p. (Embrapa. Circular Técnica, 111).

Perdiguero EG, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozzet L, Garner H, Trouillet C, Bruijin MF, Geissmann F, Rodewald HR (2015) Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythron-myeloid progenitors. **Nature** 518:547-551.

Pires VS, Taketa ATC, Gosmann G, Schenkel EP (2002) Saponins and sapogenins from *Brachiaria decumbens* stapf. **Journal of Brazilian Chemical Society** 13(2):135-139.

Puche JE, Saiman Y, Friedman SL (2013) Hepatic stellate cells and liver fibrosis. **Comprehensive Physiology** 3:1473-1492.

Quinn JC, Kessel A, Weston AL (2014) Secondary plant products causing photosensitization in grazing herbivores: their structure, activity and regulation. **International Journal of Molecular Sciences** 15(1):1441-1465.

Racanelli V, Rehmann B (2006) The liver as an immunological organ. **Hepatology** 43(2):54-62.

Ramachandran P, Pellicoro A, Madeleine AV, Boulter L, Aucott RL, Ali A, Hartland SN, Snowdon VK, Cappon A, Gordon-Walker TT, Williams MJ, Dunbar DR, Manning JR, Rooijen N, Fallowfield JA, Forbes SJ, Iredale JP (2012) Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 109:186-195.

Riede UN, Werner M (2014) **Collor Atlas of Pathology**. New York: Thieme Stuttgart.

Riet-Correa B, Castro MB, Lemos RAA, Riet-Correa G, Mustafa V, Riet-Correa F (2011) *Brachiaria* spp. poisoning of ruminants in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 31:183-192.

Riet-Correa B, Riet-Correa F, Oliveira Junior CA, Duarte VC, Riet-Correa G (2010) Histologic Lesions in livers and lymph nodes in buffalo (*Bubalus bubalis*) grazing in *Brachiaria* spp. Pastures. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 30:705-711.

Riet-Correa F, Méndez MC (2007) Intoxicações por plantas e micotoxinas. In: Riet-Correa F, Schild AL, Lemos RAA, Borges JRJ. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. Vol.2. Santa Maria: Editora Pallotti, p.99-219.

Riet-Correa G, Riet-Correa F, Schild AL, Driemeier D (2002) Wasting and death in cattle associated with chronic grazing of *Brachiaria decumbens*. **Veterinary and Human Toxicology** 44:179-180.

Rockey DC (2001) Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. **Seminars in Liver Disease** 21:337-350.

Rosa FB, Rubin MIB, Martins TB, Lemos RAA, Gomes DC, Pupin RC, Lima SC, Barros CSL (2016) Spontaneous poisoning by *Brachiaria decumbens* in goats. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 36:389-396.

Röszer T (2015) Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. **Mediators of inflammation – Hidawi Publishing Corporation** ID 816460:16p.

Rozza DB, Seitz AL, Bandarra PM, Santos EO, Driemeier D (2004) Fotossensibilização por *Brachiaria decumbens* em búfalo. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 24(Supl.):55-56.

Saldarriaga OA, Booth AL, Freiberg B, Burks J, Krishnan S, Rao A, Utay N, Ferguson M, Yi M, Beretta L, Stevenson HL (2019) Multispectral imaging differentiates unique macrophages profiles in patients with distinct chronic liver diseases. **BioRxiv** 794610.

Santos Júnior HL (2008) **Estudo da toxicidade de diferentes estágios de crescimento da *Brachiaria decumbens* em ovinos**. 69f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Universidade de Brasília (UNB), Brasília.

Saturnino KC, Mariani TM, Barbosa-Ferreira M, Brum KB, Fernandes CES, Lemos RAA (2010) Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos confinados. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 30(3):195-202.

Schenkel EP, Gosmann G, Athayde ML (2004) Saponinas. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Melo JCP, Mentz LA, Petrovick PR. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre:UFRGS p. 711-740.

Schenk MAM, Nunes S G, Silva JM (1991) **Ocorrência de fotossensibilização em equinos mantidos em pastagem de *Brachiaria humidicola***. Campo Grande: Embrapa – CNPGC, 3p. (Comunicado Técnico - Embrapa – CNPGC).

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: na open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods** 9(7):676-682.

Schuppan D, Kim YO (2013) Evolving therapies for liver fibrosis. **Journal of Clinical Investigation** 123:1887-1901.

Seixas JN, Pinto CA, Rodrigues A, Tokarnia CH, França TN, Graça FAS, D'Ávila MS, Peixoto PV (2016) Estudo comparativo das intoxicações por *Brachiaria* spp. e *Pithomyces chartarum* em bovinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 38(Supl. 2): 1-10.

Shetty S, Lalor PF, Adams DH (2008) Lymphocyte recruitment to the liver; molecular insights into the pathogenesis of liver injury and hepatitis. **Toxicology** 254:136-146.

Souza RIC, Riet-Correa F, Brum KB, Fernandes CE, Barbosa-Ferreira M, Lemos RAA (2010) Intoxicação por *Brachiaria* spp. em bovinos no Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 30:1036-1042.

Silveira JAS, Albernaz TT, Silva e Silva N, Lopes CTA, Cerqueira VD, Oliveira CMCH, Duarte MD, Barbosa JD (2009) Fotossensibilização hepatógena em caprinos associada à ingestão de *Brachiaria brizantha* no estado do Pará, Brasil. **Ciência Animal Brasileira** 1(Supl.):336-441.

Stalker MJ, Hayes MA (2007) Liver and biliary system. In: Maxie MG. **Pathology of Domestic Animals**. 5. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, v.2. p. 297-388.

Subimerb C, Somchai P, Khuntikeo N, Leelayumat C, Morris A, McGrath MS, Wongkham S (2010) Tissue invasive macrophage density is correlated with prognosis in cholangiocarcinoma. **Molecular Medicine Reports** 3:597-605.

Tacke F, Zimmermann HW (2014) Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. **Journal of Hepatology** 60:1090-1096.

Tokarnia CH, Döbereiner J, Peixoto PV (2000) **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 309p.

Tsuchida T, Friedman SL (2017) Mechanisms of hepatic stellate cell activation. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** 14:397-411.

Vieira NP, Faria PB, Mattos MR, Pereira AA (2011) Condenação de fígados bovinos na região Sul do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 63(6):1605-1608.

Viñas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Berenguer C, Enrich C, Nicolas JM, Ercilla G, Gallart T, Vives J, Arroyo V, Rodes J (2003) Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. **Hepatology** 38:919-929.

Wynn TA (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **The Journal of Pathology** 214(2):199-210.

Wynn TA, Chawla A, Pollard JW (2013) Origins and hallmarks of macrophages: development, homeostasis, and disease. **Nature** 496(7446):445-455.

Zhang CY, Yuan WG, He P, Lei JH, Wang CX (2016) Liver fibrosis and hepatic stellate cells: etiology, pathological hallmarks, and therapeutic targets. **World Journal of Gastroenterology** 22:10512-10522.