

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

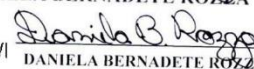
Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

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. Imunomarcacão 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 imunomarcacão 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.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Brachiaria* spp.

O gênero *Brachiaria* consiste em herbáceas perenes ou anuais da família das gramíneas composta por mais de cem espécies (Florindo et al., 2014) dentre as quais *B. decumbens* cv. Brasilisk e *B. brizantha* cv. Marandu são as mais comumente utilizadas no Brasil (Jank et al., 2014), assim como *B. humidicola* (Dias-Filho e Carvalho, 2000). Originada do Leste Africano (Low, 2015), esta gramínea foi introduzida em muitas regiões tropicais e subtropicais (Muniandy et al., 2020), incluindo América Latina, Ásia, Pacífico Sul e Austrália (Jank et al., 2014), devido a sua tolerância a solos com baixa fertilidade, resistência a seca e baixa susceptibilidade a pragas e doenças (Muniandy et al., 2020).

No Brasil, segundo Jank et al. (2014), seu cultivo excede 99 milhões de hectares, e na Malásia, as espécies de *Brachiaria* ocupam mais de 80% de toda a pastagem total (Chung et al., 2018). No Brasil, *B. decumbens* (Figura 1) foi introduzida pela primeira vez em 1962 pelo Instituto de Pesquisas Experimentais Agropecuárias

do Norte (IPEAN), mas se expandiu vagarosamente até que em 1972, *B. decumbens* cv. Brasilisk foi introduzida a partir da Austrália, com rápido crescimento nas regiões Centro-Oeste, Norte e Sul. Com o tempo, outros cultivares e espécies foram também sendo introduzidos (Riet-Correa et al., 2011).



Figura 1. Pastagem de *Brachiaria decumbens*. (Fonte: Paciullo et al., 2016).

Apesar de ser muito utilizada como pastagem, muitos relatos de surtos esporádicos e experimentais de fotossensibilização hepatógena, lesões hepáticas, perda de peso e óbitos foram relatados em várias espécies animais, incluindo bovinos (Lemos et al., 1997; Fioravanti, 2003, Gomar et al., 2005; Moreira et al., 2009; Sousa et al., 2010; Faccin et al., 2016; Araújo et al., 2017), ovinos (Opasina, 1985; Lemos et al., 1996; Cruz et al., 2001; Brum et al.; 2007; Saturnino et al., 2010; Albernaz et al., 2010; Costa et al., 2013; Ogliari et al., 2018), caprinos (Opasina, 1985; Lemos et al., 1998; Silveira et al., 2009; Rosa et al., 2016; Ogliari et al., 2018), búfalos (Rozza et al., 2004; Riet-Correa et al., 2010, De Oliveira et al., 2013) e equinos (Schenk et al., 1991; Barbosa et al., 2006).

Inicialmente, os casos de fotossensibilização hepatógena em bovinos alimentados em pastagens de *Brachiaria* spp. eram atribuídos à intoxicação pela esporidesmina, uma micotoxina produzida pelo fungo *Pithomyces chartarum* (Fagliari et al., 1993abc; Alessi et al., 1994; Fioravanti, 1999), entretanto, foi demonstrado que

esporos do fungo normalmente não eram encontrados em quantidades suficientes para serem considerados tóxicos (LEMOS et al., 1997), ou estavam ausentes na pastagem (LEMOS et al., 1998). Ainda, alguns estudos experimentais com o uso da esporidesmina revelaram lesões hepáticas discretas associadas à toxina (Flaøyen et al., 1993). O estudo de Brum e colaboradores (2007), evidenciou a presença de lesões hepáticas em ovinos alimentados com *B. decumbens*, sem a presença de esporos de *P. chartarum*. Ainda, segundo Seixas e colaboradores (2016), apesar das lesões de fotossensibilização provocadas pela *Brachiaria* spp. e pela ação da esporidesmina serem semelhantes, na intoxicação associada ao *P. chartarum* observa-se cólica, diarreia e grande perda de produtividade desde o início do processo.

Atualmente, acredita-se que as lesões hepáticas são produzidas por saponinas esteroidais presentes na *Brachiaria* spp., glicosídeos isolados de frações das folhas e caule, relacionados a mecanismos de defesa da planta, que agem como uma barreira química protetora contra insetos e outros predadores (Muniandy et al., 2020). Estes glicosídeos de ação superficial possuem a capacidade de produzir uma espuma estável em solução aquosa e são classificados como triterpenoides (encontrados em dicotiledôneas) ou esteroides (encontrados em monocotiledôneas) de acordo com a sua estrutura lipofílica (Low, 2015).

As saponinas possuem comportamento anfífilico e a capacidade de formar complexos com proteínas, fosfolípidos de membrana e esteroides, logo, podendo alterar as propriedades das membranas celulares, alterando a permeabilidade ou levando à destruição das mesmas (Schenkel et al., 2004).

As saponinas mais comumente encontradas em forragens são dioscina/protodioscina, soyasapogenina, diogenina, soyasapogenol e iamogenina (Low, 2015). As principais saponinas esteroidais identificadas em *B. decumbens* são a dicotomina e dioscina/protodioscina (Pires et al., 2002; Chung et al., 2018). Alguns autores sugerem que a protodioscina seria a responsável pelas lesões hepáticas (Lima et al., 2009; Faccin et al., 2014; Lima et al., 2015) e que *B. decumbens* apresentaria maior concentração de saponinas quando comparada às demais espécies do gênero (Lima et al., 2009; Lima et al., 2012). Além disso, a gramínea em brotação, com folhas jovens apresenta maior concentração de saponinas que a planta madura (Riet-Correa et al., 2011; Lima et al., 2012). Surto de fotossensibilização

tendem a ser mais associados ao crescimento da planta após ocorrência de chuva, principalmente após prolongados períodos de seca ou de estação seca, sugerindo que as concentrações de saponinas nestas brotações são mais elevadas que durante toda a estação de crescimento após períodos chuvosos (Low, 2015).

As sapogeninas esteroidais diogenina e iamogenina são produzidas a partir da hidrólise ácida de saponinas da planta-mãe (dioscina ou protodioscina) (Low, 2015). Após, essas sapogeninas são rapidamente metabolizadas pela microbiota do rúmen, em sapogeninas denominadas epismilagenina, episarsasapogenina, esmilagenona, e esmilagenina, as quais são primariamente absorvidas no jejuno e se combinam com o ácido glicurônico (Cardona-Álvarez et al., 2016). Cordeiros que receberam extratos de *B. decumbens* desenvolveram lesões hepáticas, proliferação de ductos biliares e tiveram a formação de cristais birrefringentes nos ductos biliares (Cruz et al., 2001; Noordin et al., 1989; Lajis et al., 1993), os quais são associados a obstrução biliar, fotossensibilização e icterícia (Cardona-Álvarez et al., 2016). Alguns estudos com saponinas de outras plantas como *Panicum miliaceum* e *Tribulus terrestris* identificaram que os cristais no interior de ductos biliares de animais com fotossensibilização eram sais de cálcio insolúveis das saponinas destas plantas (Miles et al., 1992; Miles et al., 1994), o que sugere uma possível relação entre a presença de saponinas esteroidais na planta, o metabolismo ruminal e a absorção dos compostos derivados, que formam os cristais que bloqueiam os ductos biliares.

Estudos como os de Abdullah et al. (1992) e Lajis et al. (1993) confirmaram a hidrólise ruminal das saponinas pela análise dos conteúdos do rúmen de ovelhas sofrendo de toxicidade por *B. decumbens*. Outro estudo demonstrou que bovinos que receberam doses de conteúdo ruminal de ovelhas intoxicadas desenvolveram disfunção hepática, o que sugere que há uma relação entre as saponinas da planta, o metabolismo ruminal e a injúria hepática (Noordin et al., 1989).

Como vários estudos sugerem que a maior concentração das saponinas esteroidais está em folhas jovens (Riet-Correa et al., 2011; Lima et al., 2012), o que corrobora com os relatos de surtos de intoxicação após brotamento de novas folhas, a ingestão destas folhas pelos animais parece ser a principal causa do desenvolvimento das lesões. Logo, a susceptibilidade ou a resistência dos animais à intoxicação por *B. decumbens* pode ter relação com pastoreio seletivo, no qual os

animais ingerem ou evitam partes da planta em que há maior concentração de saponina (Low, 2015).

Para evitar a intoxicação é sugerido o uso de animais resistentes e a seleção de espécies de *Brachiaria* com menor concentração de saponinas litogênicas/esteroidais, devendo-se, portanto, evitar o uso de *B. decumbens*, uma vez que esta tem se mostrado a espécie mais tóxica do grupo (Riet-Correa et al., 2011). Chung e colaboradores concluem que a ensilagem e a fenação são alternativas efetivas para a remoção das toxinas e compostos indesejáveis de *B. decumbens*. Animais que já estejam intoxicados devem ser retirados da exposição solar e do acesso à pastagem (Tokarnia et al., 2000; Gomar, 2002).

2.2. Lesões e sinais clínicos associados ao consumo de *Brachiaria* spp.

Diversos estudos relatam lesões agudas e crônicas associadas ao consumo de *Brachiaria* spp., principalmente em ruminantes (Brum et al., 2007; Souza 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, Muniandy et al., 2020). Os sinais clínicos normalmente são inespecíficos, e estão associados principalmente a lesões hepáticas, que levam a manifestações secundárias como a fotossensibilização (Othman et al., 1983; Opasina, 1985; Baber 1989; Lemos et al., 1996; Lemos et al., 1998; Barbosa et al., 2006; Brum et al., 2007; Albernaz et al., 2010; Mustafa et al., 2012; De Oliveira et al., 2013, Muniandy et al., 2020).

Os sinais clínicos associados à ingestão de *Brachiaria* spp. dependem da espécie e idade do animal, da espécie de *Brachiaria* e do tempo de exposição à pastagem. Espécies mais tóxicas como *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha* estão associadas a maior desenvolvimento de lesões e manifestações clínicas (Low, 2015; Muniandy et al., 2020). Animais jovens são mais sensíveis (Riet-Correa e Méndez, 2007; Riet-Correa et al., 2011; Lemos et al., 2011; Mustafa et al., 2012) e os ovinos e caprinos são mais sensíveis (Othman et al., 1983; Lemos et al., 1996; Lemos et al., 1998; Riet-Correa e Méndez, 2007; Brum et al., 2007; Albernaz et al., 2010; Mustafa et al., 2012). Segundo Riet-Correa et al. (2011), ovinos são suscetíveis a manifestação clínica aguda, principalmente quando transferidos de pastagem livre de

Brachiaria spp. para áreas com esta forragem. Estes animais tendem a apresentar apatia, anorexia, fotofobia, edema da face e orelhas, hiperemia conjuntival e descarga ocular bilateral.

Segundo Fagliari et al. (1993b), a intoxicação em bovinos pode ser dividida em subclínica, aguda, crônica moderada e crônica severa. Animais subclínicos normalmente desenvolvem somente perda de peso. A intoxicação aguda é caracterizada por lesões cutâneas superficiais, sem icterícia, com probabilidade de óbito entre 2 a 5 dias, muitas vezes sem manifestação de sinais clínicos. Na intoxicação crônica moderada há lesões moderadas na pele, sem icterícia, sendo que as lesões tendem a regredir entre 8 a 30 dias após seu surgimento. A intoxicação crônica severa já apresenta lesões cutâneas acentuadas na face e focinho, icterícia e emagrecimento progressivo evidente. Os animais afetados desta forma podem vir a óbito ou levam mais de 30 dias para cura espontânea. Vale ressaltar que estes autores relacionavam ainda, as lesões de fotossensibilização à micotoxina esporidesmina, do fungo *Pithomyces chartarum*, sendo que depois, ficou evidenciado que estas lesões estavam presentes em animais alimentados com *Brachiaria* spp. mesmo sem a presença de esporos de *P. chartarum* (Flaøyen et al., 1993, Lemos et al., 1997; Lemos et al., 1998; Brum et al., 2007). Este padrão de manifestação clínica tem sido observado com frequência (Riet-Correa et al., 2002; Riet-Correa et al., 2010; Souza et al., 2010; Albernaz et al., 2010; Riet-Correa et al., 2011).

Os sinais clínicos mais reportados nos relatos são fotossensibilização (Othman et al., 1983; Opasina, 1985; Baber 1989; Lemos et al., 1996; Lemos et al., 1998; Barbosa et al., 2006; Brum et al., 2007; Albernaz et al., 2010; Mustafa et al., 2012; De Oliveira et al., 2013), perda de peso ou emagrecimento progressivo (Moreira et al., 2009; Souza et al., 2010; Riet-Correa et al., 2011; Mustafa et al., 2012; Gracindo et al., 2014; Faccin et al., 2014; Faccin et al., 2016), apatia e anorexia (Muniandy et al., 2020, Low 2015; Souza et al., 2010; Brum et al., 2007; Albernaz et al., 2010; Lemos et al., 1996; Lemos et al., 1998; Riet-Correa et al., 2011; Mustafa et al., 2012) e icterícia (Othman et al., 1983; Opasina, 1985; Brum et al., 2007; Albernaz et al., 2010; De Oliveira et al., 2013). Sinais clínicos neurológicos também são relatados devido a encefalopatia hepática (Albernaz et al., 2010; Assumaidae et al., 2010; Souza et al., 2010). Nota-se, no entanto, que muitos animais apresentam lesões associadas a

intoxicação pela *Brachiaria* sem manifestação de sinais clínicos (Othman et al., 1983; Souza et al., 2010; Mustafa et al., 2012; Faccin et al., 2014), principalmente animais de pele pigmentada, que não apresentam fotossensibilização, a principal lesão associada a intoxicação por *Brachiaria* (Othman et al., 1983; Faccin et al., 2014).

Alterações em exames bioquímicos sugerem lesão hepática e incluem aumento dos níveis séricos de GGT, AST e Bilirrubina total (Brum et al., 2007; Albernaz et al., 2010; Riet-Correa et al., 2011; De Oliveira et al., 2013; Faccin et al., 2014; Gracindo et al., 2014; Cardona-Álvarez et al., 2016) Bilirrubina direta e indireta (Albernaz et al., 2010, Riet-Correa et al., 2011; Faccin et al., 2014), ureia e creatinina (Cruz et al., 2001; Albernaz et al., 2010, Gracindo et al., 2014, Lelis et al., 2018). O aumento de GGT sérico pode ser um preditor da intoxicação mesmo em animais sem sinais clínicos e na doença crônica, pois se mantém elevada por longos períodos. Esta se torna elevada devido à colestase a à obstrução de ductos biliares por cristais (Riet-Correa et al., 2011; Cardona-Álvarez et al., 2016). O aumento da GGT sérica possui correlação maior com intoxicação por *Brachiaria* que o aumento de AST, uma vez que esta última fica elevada por curtos períodos (Riet-Correa et al., 2011). Estudos mostraram que o aumento de AST e GGT ocorre tanto em animais com manifestação clínica como em animais sem sintomatologia (Brum et al., 2007; Moreira et al., 2009)

Macroscopicamente, podem ser observadas lesões de fotossensibilização (Othman et al., 1983; Opasina, 1985; Baber, 1989; Lemos et al., 1996; Lemos et al., 1998; Barbosa et al., 2006; Brum et al., 2007; Albernaz et al., 2010; Mustafa et al., 2012; De Oliveira et al., 2013, Muniandy et al., 2020), icterícia (Othman et al., 1983; Opasina, 1985; Brum et al., 2007; Albernaz et al., 2010; De Oliveira et al., 2013; Low, 2015; Muniandy et al., 2020), hepatomegalia (Souza et al., 2010; Mustafa et al., 2012; De Oliveira et al., 2013; Muniandy et al, 2020) fígado de coloração amarelada (Lemos et al., 1998; Souza et al., 2010; Albernaz et al., 2010; Mustafa et al., 2012, De Oliveira et al., 2013; Muniandy et al, 2020), por vezes apresentando pontos esbranquiçados multifocais (Driemeier et al., 2002; Souza et al., 2010; Muniandy et al, 2020) ou padrão lobular acentuado (Brum et al., 2007, Souza et al., 2010; Albernaz et al., 2010; Mustafa et al., 2012, De Oliveira et al., 2013; Muniandy et al, 2020), fibrose hepática (Faccin et al., 2015, Faccin et al., 2016) e distensão da vesícula biliar (Lemos et al., 1998; Brum

et al., 2007; Albernaz et al., 2010; Mustafa et al., 2012; De Oliveira et al., 2013; Muniandy et al, 2020).

A fotossensibilização (Figura 2) é observada como edema e necrose, com formação de crostas em áreas de pele despigmentada e exposta, como orelhas, face, vulva, região dorsal e flanco (Muniandy et al., 2020; Low, 2015). Esta lesão ocorre de forma secundária à lesão hepática como um resultado da filoeritrina circulante. Este pigmento fotodinâmico é formado no intestino a partir do metabolismo da clorofila pela microbiota intestinal, é absorvido e, via circulação portal, chega ao fígado, sendo removida da circulação por eliminação na bile. O acúmulo deste pigmento ocorre na lesão hepática ou obstrução biliar (Low, 2015; Barros, 2016; Brown et al., 2018; Muniandy et al., 2020). Por ser um pigmento fotodinâmico, ao passar por vasos sanguíneos da pele não pigmentada, reage com a radiação UV, gerando as lesões de fotossensibilização. Animais de pele pigmentada normalmente não apresentam este sinal clínico (Othman et al., 1983; Graydon et al., 1991; Faccin et al., 2014; Quinn et al., 2014; Barros, 2016; Brown et al., 2018;).



Figura 2. Fotossensibilização hepatógena provocada pelo consumo de *Brachiaria* 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.

Na histologia, os danos hepáticos associados à ingestão de *Brachiaria* spp. mais relatados são caracterizados por degeneração hidrópica de hepatócitos (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), necrose centrolobular ou aleatória (Driemeier et al., 1998; Brum et al., 2007; Sousa et al., 2010; De Oliveira et al., 2013), colangio-hepatite (Cruz et al., 2001; Brum et al., 2007; Sousa et al., 2010; Albernaz et al., 2010; Ogliari et al., 2018) por vezes associada à presença de cristais birrefringentes bloqueando ductos biliares (Cruz et al., 2001; Brum et al., 2007; Sousa et al., 2010; Ogliari et al., 2018), proliferação de ductos biliares (Cruz et al., 2001; Brum et al., 2007; Albernaz et al., 2010; Ogliari et al., 2018) e a presença de macrófagos espumosos (Driemeier et al., 1998; Driemeier et al., 1999; 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). Colestase também é uma alteração histológica eventualmente relatada, principalmente em animais que apresentam cristais no interior de ductos biliares (Souza et al., 2010).

A tumefação hepatocelular ou degeneração hidrópica é uma das lesões mais frequentemente relatadas nos estudos de animais expostos à pastagem de *Brachiaria* spp., com e sem intoxicação (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). Esta é uma lesão subletal reversível caracterizada por degeneração hidrópica (Brown et al., 2018). A tumefação dos hepatócitos é um achado morfológico comum em várias doenças inflamatórias do fígado, contudo resulta de alterações funcionais na bomba de sódio e potássio e retenção citoplasmática de quantidades apreciáveis de água e sódio (Gayotto et al., 2000). Pode ocorrer por vários insultos metabólicos e tóxicos, hipóxia, colestase e doenças inflamatórias hepáticas (Stalker e Hayes, 2007). A ocorrência nos hepatócitos da região centrolobular (tumefação centrolobular) é particularmente comum, uma vez que esta região do lóbulo recebe sangue menos oxigenado e é, portanto, mais susceptível à hipóxia e tem maior atividade enzimática (oxidase de função mista), capaz de ativar compostos a formas tóxicas (Brown et al., 2018). Microscopicamente, as células com degeneração hidrópica apresentam-se com citoplasma claro e discretamente granular, devido à

tumefação das organelas. O núcleo não é deslocado de sua posição original (Riede e Werner, 2004).

O estudo de Almeida (2016) ao avaliar histologicamente, 450 fígados bovinos de animais de diferentes sistemas de produção, observou 102 fígados com tumefação hepatocelular, sendo esta lesão mais presente na região centrolobular. Destes 102 fígados, 56 apresentavam macrófagos espumosos e era comum observar discreta degeneração hidrópica nos hepatócitos localizados próximos aos grupos de macrófagos espumosos. Segundo Driemeier et al. (2002), acredita-se que esta lesão está associada a insulto colestático crônico, principalmente porque os hepatócitos também apresentam hiperplasia do retículo endoplasmático liso. Os autores sugerem ainda que, quando associada à presença de cristais no citoplasma dos hepatócitos (vistos ultramicroscopicamente), a degeneração hidrópica revela um efeito citotóxico.

A necrose descrita nos estudos é discreta e normalmente localizada na região centrolobular ou tem distribuição aleatória podendo ser uma evolução do processo degenerativo ou desencadeada pelo processo inflamatório (Driemeier et al., 1998; Brum et al., 2007; Sousa et al., 2010; De Oliveira et al., 2013).

Colangite/Colangio-hepatite é uma lesão normalmente relatada em animais intoxicados ou alimentados por diferentes espécies de *Brachiaria* (Cruz et al., 2001; Brum et al., 2007; Sousa et al., 2010; Albernaz et al., 2010; Ogliari et al., 2018). Esta lesão é caracterizada por infiltrado inflamatório no espaço-porta, em especial envolvendo ductos biliares e frequentemente está associada à presença de cristais birrefringentes no interior de ductos biliares (Cruz et al., 2001; Brum et al., 2007; Sousa et al., 2010; Ogliari et al., 2018). Os cristais observados nos ductos biliares são descritos como pequenos, alongados, semelhantes a cristais de colesterol (Graydon et al., 1991; Miles et al., 1992; Driemeier et al., 1999; Muniandy et al., 2020) e seriam compostos principalmente por epismilagenina, que é originada pela conversão de saponinas dentro do rúmen (Muniandy et al., 2020). Estes cristais são descritos principalmente em relatos de animais intoxicados por *Brachiaria* spp. (Driemeier et al., 2002; Brum et al., 2007; Sarturino et al., 2010; Riet-Correa et al., 2011; Mustafa et al., 2012; Ogliari et al., 2018) e, não são descritos com tanta frequência em animais expostos à pastagem sem manifestação clínica de intoxicação (Gomar et al., 2005; Riet-Correa et al., 2010; Caiedo et al., 2012; Low, 2015; Almeida, 2016; Faccin et al.,

2016; Araújo et al., 2017). Estes seriam os responsáveis pelo acúmulo de filoteritina e consequente fotossensibilização (Driemeier et al., 2002; Riet-Correa et al., 2011; Low, 2015; Muniandy et al., 2020)

Infiltrado inflamatório mononuclear periportal foi observado em 26 dos 29 casos de bovinos intoxicados por *Brachiaria* spp. no estudo de Souza et al. (2010), lesão esta também relatada por Almeida (2016) num estudo de lesões histológicas em fígados de bovinos criados em diferentes sistemas de produção. Dos 450 fígados analisados, 207 apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear (composto predominantemente por linfócitos) no espaço-porta e destes, 89 fígados também apresentavam infiltrados de macrófagos espumosos. No entanto, em nenhum dos fígados contendo este infiltrado inflamatório no espaço porta, foi observado a presença de cristais no interior de ductos biliares ou destruição e necrose de células biliares. O estudo de Araújo e colaboradores (2017) também evidenciou grande frequência de fígados de bovinos alimentados com *Brachiaria* apresentando o mesmo tipo de infiltrado mononuclear periportal (55,8% dos casos avaliados).

A resposta inflamatória no fígado ocorre de forma diferenciada. As células de Kupffer têm propriedades distintas, que as permitem lidar com muitos insultos potencialmente inflamatórios da circulação portal. Além disso, o fígado é um centro regulatório que influencia muitos insultos pró-inflamatórios e mediadores inflamatórios. Isto torna difícil a diferenciação entre condições degenerativas e inflamatórias no fígado (Stalker e Hayes, 2007).

Por desempenhar um papel no sistema imune, o fígado saudável apresenta uma grande quantidade de células imunes. Dentre estas, cerca de 10 bilhões de linfócitos são encontrados espalhados pelo parênquima e tratos portais. Isso representa aproximadamente 25% de todas as demais células observadas no fígado, além dos hepatócitos. Estes linfócitos são, em sua maioria, células T e células Natural Killer T (NKT), mas também há linfócitos B (Racanelli e Rehmann, 2006). No fígado com inflamação o número de linfócitos aumenta, e o tipo de distribuição das células infiltradas vai determinar a natureza do processo inflamatório. Uma predominância de infiltrado inflamatório no parênquima é uma característica de hepatite lobular associada a hepatites virais, enquanto a predominância de infiltrado portal centrado nos ductos biliares é uma característica de doenças biliares (Lalor et al., 2002).

A hiperplasia ductal ou hiperplasia biliar é a proliferação de novos ductos biliares em áreas portais e regiões periportais. É uma resposta relativamente inespecífica a uma variedade de agressões sofridas pelo fígado. A hiperplasia ductal pode ocorrer rapidamente, principalmente em animais jovens, mas é geralmente considerada como uma lesão vista em doença hepática crônica e ocorre particularmente após doenças que obstruem a drenagem biliar normal (Brown et al., 2018). Esta lesão é frequentemente relatada em animais intoxicados por *Brachiaria* spp. (Fioravanti, 1999; Cruz et al., 2001; Brum et al., 2007; Moreira et al., 2009; Albernaz et al., 2010; Araújo et al., 2017; Ogliari et al., 2018;), e normalmente é observada na região portal ou em regiões de fibrose capsular.

Alguns estudos têm demonstrado que *Brachiaria* spp. causa injúria hepática crônica (Riet-Correa et al., 2010; Faccin et al., 2016; Araújo et al., 2017; Ogliari et al., 2018) e alta condenação de fígados bovinos em abatedouros devido a fibrose (Faccin et al., 2015). No entanto, a patogenia deste processo permanece desconhecida. Souza e colaboradores (2010) relatam fibrose periportal em variados graus na histologia de fígados de bovinos intoxicados com *Brachiaria* no Mato Grosso do Sul, além de hiperplasia/proliferação de ductos biliares, outra alteração normalmente associada a injúria hepática crônica. Faccin e colaboradores (2015) revelou em seu estudo um prejuízo estimado superior a 100 mil reais por ano associado a condenação de fígados por fibrose em animais que consumiram *Brachiaria*, sendo que a fibrose era observada principalmente no lobo hepático esquerdo, que apresentava atrofia acentuada associada a hipertrofia compensatória do lobo hepático direito. Além disso, estes autores relatam a presença de áreas brancacentas multifocais, deprimidas e firmes em outras áreas do fígado, sendo estas também compatíveis com áreas menores de fibrose. Vale ressaltar que os fígados selecionados para esta avaliação (192 amostras) obrigatoriamente continham macrófagos espumosos na histologia e que o cálculo estimado se baseou nas condenações prévias de fígados bovinos por fibrose ou cirrose.

Lesões histopatológicas no parênquima renal também foram reportadas, porém com menor frequência. As lesões renais são caracterizadas macroscopicamente como rins normalmente escurecidos, associado a urina marrom escura (Lemos et al., 1996; Riet-Correa e Méndez, 2007; Riet-Correa et al., 2011). Outros estudos relatam

rins acinzentados a amarelados, com padrão mosqueado e urina amarelo escura (Graydon et al., 1991; Assumaidae e Mustapha, 2012). Microscopicamente relata-se dilatação de túbulos contorcidos e degeneração e necrose do epitélio tubular (Mendonça et al., 2008; Riet-Correa et al., 2011).

2.3. Macrófagos espumosos

Células espumosas podem ser observadas em vários tecidos em condições patológicas, mas são conhecidas principalmente associadas a aterosclerose em humanos (Gomar, 2002). Estas células de citoplasma espumoso se formam devido à captação de lipoproteínas modificadas como a LDL por macrófagos através de receptores *scavenger*, e desencadeiam uma série de eventos inflamatórios que estimulam a formação da placa aterosclerótica (Fan et al., 2019).

Os macrófagos espumosos associados ao consumo de *Brachiaria* spp. normalmente são descritos como células de citoplasma espumoso ou vacuolizado, entre 14 a 70 µm, isolados ou em grupos de tamanhos variados (Figura 3), contendo núcleo central ou periférico, por vezes multinucleados (Driemeier et al., 1998; Fioravanti, 1999; Moreira et al., 2009; Souza et al., 2010; Riet-Correa et al., 2010; Riet-Correa et al., 2011), que não se coram pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS) e se coram fracamente pelo *Red Oil O*, o que indica que não possuem material proteico ou lipídico no citoplasma (Driemeier et al., 1998). Alguns estudos relatam também a presença de cristais semelhantes a fendas de colesterol no citoplasma dos macrófagos espumosos (Lemos et al., 1996; Lemos et al., 1997; Lemos et al., 1998; Driemeier et al., 1998; Driemeier et al., 1999; Santos Júnior, 2008; Silveira et al., 2009). Estas células apresentam imunomarcagem positiva para MAC387 (Faccin et al., 2016) e CD68 (Araújo et al., 2017), sendo, portanto, realmente macrófagos.

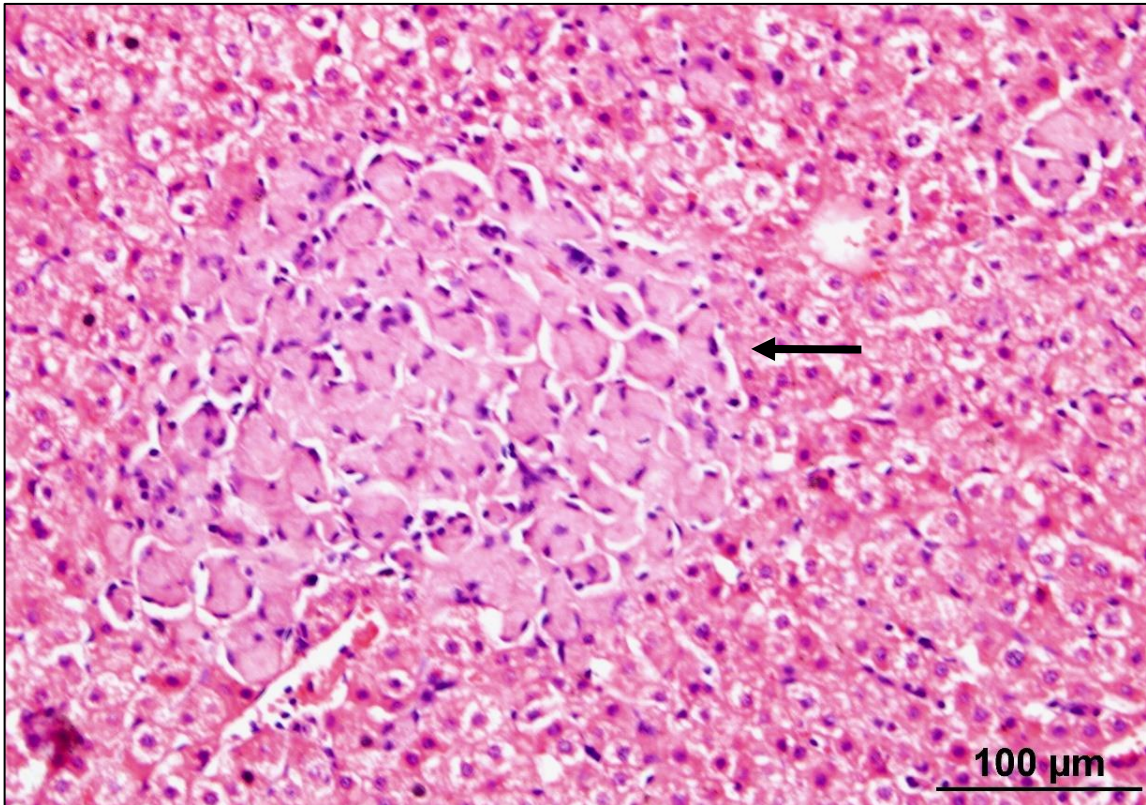


Figura 3. Um grupo de macrófagos espumosos (seta) é observado no parênquima hepático de um bovino alimentado com *Brachiaria* spp. Note que os hepatócitos apresentam discreta degeneração hidrópica. Barra: 100μm Hematoxilina e Eosina. (Fonte: Almeida, 2016).

Na microscopia eletrônica são observados no citoplasma das células espumosas, estruturas em forma de fenda, que se trata da imagem negativa dos cristais que por vezes são observados na histologia. Estas estruturas são cobertas por membranas semelhantes a polifagossomos (Driemeier et al., 1998). Em ovelhas, também foi observada hiperplasia do retículo endoplasmático liso (Driemeier et al., 2002; Santos Júnior, 2008).

Os grupos de macrófagos espumosos ficam distribuídos de forma irregular e aleatória ao longo do parênquima hepático, havendo uma maior frequência destes grupos ao redor da veia centrolobular (Driemeier et al., 1998; Driemeier et al., 1999; Riet-Correa et al., 2010; Almeida, 2016). A zona 3 do fígado (região centrolobular) tem maior atividade enzimática (oxidase de função mista) capaz de ativar compostos a formas tóxicas (Brown et al., 2018). Talvez por este motivo, os grupos de macrófagos espumosos se concentrem em maior quantidade nesta região do fígado, pois sugere-se que estas células contenham saponinas esteroidais presentes na *Brachiaria* spp.

(Driemeier et al., 1998; Driemeier et al., 1999). Grupos de macrófagos espumosos também são relatados com frequência em linfonodos mesentéricos e hepáticos dos animais afetados (Driemeier et al., 1998; Driemeier et al., 1999; Riet-Correa et al., 2002; Moreira et al., 2009; Riet-Correa et al., 2010) e submucosa do intestino (Driemeier et al., 1998; Driemeier et al., 1999; Riet-Correa et al., 2002; Gomar, 2002; Gomar et al., 2005).

O real papel destas células no processo de lesão hepática ainda é uma incógnita. No entanto, alguns estudos mostram que animais que apresentam estas células no fígado, muitas vezes apresentam uma condição subclínica caracterizada por redução no ganho de peso, havendo, portanto, uma correlação negativa entre a presença destas células no fígado e o desenvolvimento de carcaça (Fagliari et al., 1993c; Fioravanti, 1999; Moreira et al., 2009; Riet-Correa et al., 2010). Sabe-se que estas células aparecem em processos mais tardios, em que o animal tenha ingerido a pastagem por longos períodos, de pelo menos 150 dias (Driemeier et al., 1998; Cruz et al., 2000; Driemeier et al., 2002) e, aparentemente, quanto maior o tempo de exposição à pastagem, maior será a quantidade de macrófagos espumosos (Driemeier et al., 2002; Riet-Correa et al., 2010). Riet-Correa et al. (2002) relata inclusive o caso de bovinos que desenvolveram emagrecimento progressivo mantidos em pastagem de *Brachiaria decumbens*, sem clínica de fotossensibilização, que apresentavam grande quantidade de macrófagos espumosos no fígado, baço, linfonodos mesentéricos e hepáticos e submucosa do intestino delgado.

Até o momento, os macrófagos espumosos são evidenciados pelas suas características morfológicas (Araújo et al., 2017), mas o conteúdo exato presente no citoplasma dos macrófagos espumosos permanece desconhecido. Suspeita-se que este conteúdo se trate de fagocitose de cristais biliares (Driemeier et al., 2002; Brum et al., 2007; Assumaidae e Mustapha, 2012), mas a visualização efetiva dos cristais raramente é descrita na histologia (Brum et al., 2007; Araújo et al., 2017).

Estudos com lectina-histoquímica, como os de Gomar et al. (2005), Boabaid et al. (2011) usando tecidos de bovinos e de Costa e demais autores (2013), usando tecidos de ovinos, mostraram que os macrófagos espumosos apresentam marcação positiva para esta técnica. As lectinas são um grupo heterogêneo de proteínas isoladas ou ligadas a carboidratos, não antigênicas, originadas de animais ou

vegetais. Têm função de defesa no hospedeiro e ligam-se a carboidratos presentes na superfície ou interior da célula com bastante especificidade e reversibilidade. Devido a isso, lectinas têm sido utilizadas para avaliar processos de reconhecimento, diferenciação e especialização celular (Gomar, 2002), pois permitem detectar algumas substâncias complexas que contenham açúcar nos tecidos animais (Costa et al., 2013). Estes estudos mostraram que os macrófagos espumosos são positivos para as lectinas PNA (*Arachis hypogaea* agglutinin), WGA (*Triticum vulgare* agglutinin) e SBA (*Glycine Max* agglutinin), sugerindo, portanto, que estas células contêm quantidade significativa de galactose/N-acetilgalactosamina (forte positividade para as lectinas PNA e SBA) e menor quantidade de N-acetilglucosamina (moderada positividade para a lectina WGA). Outras lectinas também apresentaram positividade nestes estudos, porém com marcação discreta (Gomar et al., 2005; Boabaid et al., 2011; Costa et al., 2013).

2.4. Macrófagos hepáticos

Os macrófagos são células do sistema imune inato, altamente heterogêneas, envolvidas na resposta contra microrganismos, homeostasia, respostas inflamatórias e na regeneração tecidual (Braga et al., 2015). O fígado abriga cerca de 80% dos macrófagos de todo o corpo (Heymann e Tacke, 2016), e estes representam a maior população celular hepática não-parenquimatosa (Li et al., 2016).

O fígado é um órgão constantemente exposto a antígenos não-próprios via veia porta, de nutrientes, microbiota intestinal residente e endotoxinas e, devido a isso deve gerar mecanismos de tolerância a fim de evitar o desencadeamento de respostas imunes contra antígenos não patogênicos ou danosos. No entanto, esta tolerância imunológica hepática permite a persistência crônica de parasitas e vírus no fígado, e faz com que condições tóxicas, além das causas infecciosas, resultem em inflamação (Heymann e Tacke, 2016).

A inflamação é, portanto, uma característica vigente em todas as doenças hepáticas, como o câncer, fibrose, lesões tóxicas e colangiopatias. Os macrófagos hepáticos fazem parte do sistema mononuclear fagocítico e são conhecidamente elementos chave em quase todos os processos inflamatórios hepáticos devido à sua

capacidade de responder a uma enorme variedade de sinais de ativação (Guillot e Tacke, 2019).

Dentre os macrófagos hepáticos, os mais conhecidos são as células de Kupffer, células residentes, sensitivas ao microambiente por meio de expansões citoplasmáticas (Jenne e Kubes, 2013; Heymann et al., 2015). Ficam localizadas nos sinusoides hepáticos e apresentam um padrão constante de distribuição, sendo mais comuns na região periportal e encontradas em menor número na região centrolobular (David et al., 2016; Freitas-Lopes et al., 2017). Estas células exercem funções cruciais durante a homeostasia e são as primeiras a responder frente a injúria hepática (Gordon e Plüddermann, 2017) pois são capazes de apresentar antígenos e produzir citocinas e quimiocinas, portanto, são fundamentais para iniciar e modular as respostas imunes do fígado (Heymann e Tacke, 2016).

As células de Kupffer são macrófagos residentes do fígado que não dependem do compartimento mieloide monocítico para se proliferar, uma vez que há auto-renovação a partir de células-tronco hepáticas originadas do saco vitelino (Wynn et al., 2013; Dey et al., 2015; Perdiguero et al., 2015; Braga et al., 2015; Heymann e Tacke, 2016). O marcador CD68 pode ser utilizado como indicador para as células de Kupffer, porém não permite a diferenciação de outros macrófagos hepáticos originados da medula óssea. A imunomarcagem para Ly6C (Gr¹) em macrófagos derivados de monócitos pode auxiliar nesta separação (Heymann e Tacke, 2016). Além disso, morfologicamente, as células de Kupffer têm aparência mais “estrelada” enquanto os macrófagos derivados de monócitos permanecem relativamente circulares/arredondados, com menos projeções citoplasmáticas (Guillot e Tacke, 2019).

As células de Kupffer humanas expressam grande quantidade de CD163, assim como outros macrófagos teciduais maduros (residentes) (Gordon, 2003). Isso é explicado pelo fato destas células atuarem na homeostasia do ferro obtido da hemoglobina, uma vez que o CD163 é um receptor do tipo *scavenger* (ou “sequestrador”) com alta afinidade para o complexo hemoglobina-haptoglobina, agindo, portanto, como um internalizador da hemoglobina (Davies et al., 2013).

Além das células de Kupffer, outros macrófagos hepáticos incluem as células dendríticas e monócitos circulantes que são recrutados para tecidos inflamados

(Heymann e Tacke, 2016). Tanto as células dendríticas quanto os macrófagos inflamatórios em tecidos são derivados de precursores mielóides da medula óssea. Em camundongos, monócitos da linhagem Ly6C⁺CCR2^{high} são chamados de inflamatórios, e recrutados para tecidos inflamados onde se diferenciam em células dendríticas ou macrófagos com perfil pró-inflamatório (Geissmann et al., 2003; Dey et al., 2015; Braga et al., 2015).

De acordo com estímulo do microambiente do tecido, tanto macrófagos residentes quanto os macrófagos infiltrantes podem ser polarizados (Geissmann et al., 2003; Dey et al., 2015). Os macrófagos podem ser ativados (ou polarizados) em M1 (ou classicamente ativados), os quais possuem capacidade microbicida, fazem apresentação de antígenos e liberação de citocinas pró-inflamatórias, sendo, portanto, associados a doenças inflamatórias; e M2 (ou alternativamente ativados), que usualmente estão relacionados à defesa contra parasitas, remodelação tecidual e secreção de mediadores imunomoduladores ou anti-inflamatórios (Mosser, 2003; Murray e Wynn, 2011; Braga et al., 2015). Vale ressaltar que, de acordo com este modelo dicotômico de separação dos macrófagos, os macrófagos teciduais residentes seriam classificados como “M2-like” (semelhantes a M2), uma vez que estas células desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase tecidual e resolução da inflamação (Davies et al., 2013), sendo, portanto, mais tolerantes.

Durante a injúria hepática os macrófagos observados no fígado são heterogêneos, derivados das células de Kupffer, de populações de monócitos originados da medula óssea ou de macrófagos peritoneais (Guillot e Tacke, 2019). Na fase final de várias doenças, os macrófagos secretam moléculas anti-inflamatórias e fatores de crescimento, que promovem a regeneração tecidual. No entanto, em caso de disfunção, prejudicam o processo regenerativo adequado e promovem o desenvolvimento de fibrose exacerbada (Braga et al., 2015). Macrófagos hepáticos desempenham um papel chave na iniciação e progressão da fibrose hepática, pois macrófagos residentes iniciam resposta inflamatória durante dano tecidual enquanto macrófagos derivados de monócitos levam a doença hepática crônica e fibrogênese (Bansal et al., 2015).

Há também evidências de que tanto macrófagos M1 quanto M2 podem auxiliar no processo de fibrose hepática. Macrófagos M1 liberam citocinas pró-inflamatórias

como TNF- α e IL- β 1, que exacerbam a injúria e amplificam a resposta inflamatória, o que contribui para a ativação de miofibroblastos. Macrófagos M1 também liberam quimiocinas como CCL2, que auxiliam no recrutamento de fibrócitos. Já os macrófagos M2 promovem cicatrização e regeneração tecidual, porém, em condições de insulto persistente, podem ativar fibroblastos residentes pela liberação elevada de TGF- β e Galectina-3, além de PDGF, VEGF e IGF-1 (Braga et al., 2015).

2.5. Fibrose hepática

O reparo de um tecido que sofreu injúria é um processo que permite a reestruturação do tecido, sendo fundamental para a sobrevivência. O reparo tecidual ocorre após diversos tipos de injúria, e envolve duas fases: uma fase regenerativa, na qual há reposição das células lesadas por células do próprio tecido; e uma fase denominada fibroplasia, ou fibrose, na qual tecido conectivo substitui o parênquima normal. Este processo de fibrose, inicialmente é benéfico, porém pode se tornar patológico caso se torne contínuo, resultando em deposição excessiva de matriz extracelular (Wynn, 2008; Braga et al., 2015). A maioria das desordens inflamatórias persistentes (que duram por várias semanas ou meses) apresentam fibrose, pois mantêm a produção de fatores de crescimento, angiogênicos e citocinas pró-fibróticas, que estimulam a deposição progressiva de MEC, destruindo a arquitetura do tecido normal (Friedman, 2004; Wynn, 2008; Braga et al., 2015).

Quando a fibrose hepática é acentuada e o fígado começa a formar nódulos de regeneração observamos a instalação do processo de cirrose hepática, a qual também é conhecida como “fígado em estágio terminal”. A cirrose é definida como um processo difuso caracterizado por fibrose e conversão da arquitetura hepática normal a lóbulos estruturalmente anormais, havendo perda de parênquima hepático, pela condensação da estrutura de reticulina e pela formação de tratos de tecido conjuntivo fibroso (Brown et al., 2018). As causas potenciais de cirrose incluem lesão tóxica crônica, obstrução biliar extra-hepática crônica, colestase, hepatite e/ou colangite crônicas, congestão passiva crônica, depósito ou metabolismo anormal de metais como o cobre, entre outras (Brown et al., 2018).

O desenvolvimento de fibrose nos diversos tecidos é caracterizado pelo surgimento de fibroblastos ativados positivos para alfa actina de músculo liso (α -SMA), conhecidos como miofibroblastos, que produzem grande quantidade de MEC (Braga et al., 2015). Os miofibroblastos são gerados a partir de várias fontes, que incluem células mesenquimais residentes dos tecidos, como as células estreladas hepáticas (Wynn, 2008). Logo, a Célula Estrelada Hepática (CEH) é, após ativação, a principal célula fibrogênica no fígado, devido à sua transdiferenciação em miofibroblastos (Tsuchida e Friedman, 2017). Esta célula é o pericito específico do fígado (Hellerbrand, 2013) e está localizada no espaço subendotelial de Disse (Puche et al., 2013), apresentando microprojeções citoplasmáticas que permitem contato físico com as células endoteliais dos sinusoides e com os hepatócitos (Hellerbrand, 2013). Alguns estudos mostram que em humanos, há discreto predomínio destas células na região pericentral, enquanto nos suínos, haveria predominância na região periportal. Se há divergência funcional nestes padrões de distribuição entre espécies, ainda não é claro (Friedman, 2008).

Quanto à sua função, em seu estado quiescente, a CEH funciona principalmente como reserva de retinoides como a vitamina A (Zhang et al., 2016), sendo responsável por cerca de 80 a 90% de todo o retinoide armazenado no fígado. Além disso, podem armazenar, além de retinoides, quantidades significativas de colesterol, fosfolípídeos, triglicerídeos e ácidos graxos livres (Friedman, 2008; Hellerbrand, 2013; Tsuchida e Friedman, 2017; Kostallari e Shah, 2019). Há ainda, estudos que mostram que a CEH expressa CD133, um marcador de células-tronco, o que pode sugerir que as CEHs talvez tenham um potencial pluripotente no fígado adulto (Kordes et al., 2007).

As CEHs também atuam na resposta imune hepática, e podem amplificar a infiltração de leucócitos mono e polimorfonucleares quando ativadas, pois produzem quimiocinas que atraem estas células (Friedman, 2008; Hellerbrand, 2013). Além disso, expressam TLRs, o que indica uma capacidade de interagir com o LPS de bactérias (Brun et al., 2005), e podem atuar como apresentadoras de antígenos e estimular a proliferação de linfócitos (Viñas et al., 2003). Estas células são também uma importante fonte de citocinas e fatores de crescimento no fígado. Secretam TGF- α , EGF, sendo estes potentes fatores de crescimento para hepatócitos durante a

regeneração e que, também estimulam mitose das próprias CEHs. Quando ativadas produzem M-CSF e MCP-1, que estimulam acúmulo e proliferação de macrófagos, o que provavelmente tem um papel importante na amplificação da resposta inflamatória e fibrogênica (Friedman, 2008).

Após injúria hepática as CEHs mudam completamente. Estas células perdem sua característica de armazenamento de gotículas de gordura (Friedman, 2008) e tornam-se ativadas, mudando seu fenótipo para células semelhantes a miofibroblastos, que são proliferativas, contráteis, inflamatórias e quimiotáticas, caracterizadas por elevada produção de matriz extracelular (Tsuchida e Friedman, 2017). A indução de α -SMA é o marcador mais confiável da ativação da CEH, pois este marcador é ausente em outras células residentes do fígado (seja o fígado normal ou com injúria), com exceção do músculo liso observado na parede de grandes vasos. Este marcador é muito utilizado como um indicador de estágios iniciais da atividade fibrogênica no fígado doente, ainda antes do acúmulo de MEC (Friedman, 2008).

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). Durante a ativação há evidente alteração da expressão gênica nestas células, que primeiro perdem seu estado quiescente e se tornam ativadas, e depois evoluem para células semelhantes a miofibroblastos, sendo importante deixar claro que as CEHs ativadas são semelhantes a miofibroblastos, mas não são miofibroblastos (Tsuchida e Friedman, 2017).

De forma simplificada, o processo de ativação das CEHs ocorre em duas fases: iniciação e perpetuação. A iniciação ou estágio pré-inflamatório refere-se a estágios iniciais nos quais há mudança de expressão gênica e fenótipo em resposta a citocinas e estímulos parácrinos. Os principais estímulos para a iniciação envolvem lesão de hepatócitos e mudanças na matriz extracelular adjacente. A perpetuação ocorre como resultado do efeito destes estímulos, que mantêm o estado ativado das CEHs, o que

gera fibrose. Esta segunda fase já envolve estímulos autócrinos e parácrinos repetitivos, e conduz a proliferação, contratilidade, fibrogênese, degradação de matriz, perda de retinoides e infiltração de células inflamatórias. Pode ainda haver uma terceira fase na qual há resolução do processo de fibrose, provavelmente mediado por apoptose das células estreladas (Friedman, 2008).

A iniciação da CEH se dá por estímulos parácrinos de vários tipos de células à sua volta, como hepatócitos, células de Kupffer, endotélio e plaquetas. Estas células liberam citocinas como TGF- β , PDGF, EGF (Friedman, 2008). As células de Kupffer ativadas contribuem bastante para a ativação das CEHs pois estimulam a síntese de MEC, a proliferação celular e a liberação de retinoides através da ação de citocinas, em especial do TGF- β e intermediários de oxigênio/peróxidos lipídicos (Bilzer et al., 2006). Os hepatócitos em apoptose após injúria levam à ativação da CEH mediada pelo Fas, e os hepatócitos necróticos são um estímulo fibrogênico clássico devido à peroxidação de lipídeos (Canbay et al., 2003).

A perpetuação já envolve algumas alterações discretas no comportamento da CEH: proliferação, contratilidade, quimiotaxia, degradação de matriz, perda de retinoides, fibrogênese e liberação de citocinas que atraem leucócitos. De certa forma, todos esses fatores levarão a acúmulo de MEC (Friedman, 2008).

As citocinas envolvidas neste processo de perpetuação atuam de forma variada, estimulando uma das alterações comportamentais da CEH. Estas são principalmente: o PDGF, que é a principal citocina de efeito mitogênico para a CEH, estimulando, portanto a sua proliferação (Friedman, 2008; Tsuchida e Friedman, 2017) e que também apresenta importante efeito quimiotático para outras células estreladas (Kinnman et al., 2000), junto ao MCP-1 (Marra et al., 1999) e CXCR3, que também atraem leucócitos e estimulam a inflamação (Friedman, 2008), atraindo principalmente leucócitos mono e polimorfonucleares (Hellerbrand, 2013); TGF- β , que é a mais potente citocina fibrogênica, produzida de forma parácrina e autócrina (Gressner et al., 2002; Breitkopf et al., 2006; Friedman, 2008; Tsuchida e Friedman, 2017); substâncias como eicosanoides, angiotensina II e outros estimulam a contratilidade, fator este muito evidenciado em fígados cirróticos (Rockey, 2001); diversas metaloproteinases auxiliam na degradação da matriz extracelular normal, permitindo a substituição por tecido cicatricial (Benyon e Arthur, 2001). A perda de

retinoides é observada em células estreladas ativadas, mas ainda não se sabe se esta perda é realmente necessária para sua ativação (Tsuchida e Friedman, 2017).

A regressão do processo de fibrose é complexa e pode envolver duas vias, ao menos em testes *in vitro*. Uma das vias requer reversão do fenótipo ativado e retorno das CEH ao seu estado quiescente, enquanto outra via, envolve a apoptose das células estreladas, o que já apresenta forte evidências, principalmente sendo mediada pela ação de células Natural Killer (Friedman, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Critérios para seleção das amostras

Fragments aleatórios de fígados de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp. foram coletados em um abatedouro bovino localizado no município de Birigui, estado de São Paulo (SP), e destes, 48 fragmentos foram selecionados após análise histopatológica (microscopia de luz – Hematoxilina e Eosina) de acordo com a presença/ausência de macrófagos espumosos. As amostras foram divididas em 4 grupos/escores (12 animais por grupo) de acordo com a quantidade e o tamanho dos infiltrados de macrófagos espumosos (ME) no parênquima hepático, metodologia adaptada de Riet-Correa et al. (2010):

- Grupo 0 = ausência de Macrófagos Espumosos no parênquima hepático. Os fígados deste grupo não apresentavam nenhum tipo de lesão histológica;
- Grupo 1 = discreta quantidade de Macrófagos Espumosos no parênquima hepático (até 100 ME predominantemente isolados ou em pequenos grupos de até 10 células);
- Grupo 2 = moderada quantidade de Macrófagos Espumosos no parênquima hepático (até 300 ME predominantemente arranjados em pequenos a médios grupos entre 10 e 30 células);
- Grupo 3 = acentuada quantidade de Macrófagos Espumosos no parênquima hepático (mais de 500 ME predominantemente arranjados em médios a grandes grupos com pelo menos 30 células).

Nenhum dos animais selecionados apresentava sinais de doença clínica e estavam aptos para abate.

3.2. Protocolos histopatológicos e imuno-histoquímicos

Para análise histopatológica, as amostras de fígado foram clivadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm³ e então fixadas em solução de formalina a 10% tamponada com fosfatos (pH 7,6), por 24 a 48 h. As amostras foram processadas de acordo com técnicas de rotina de inclusão em parafina e seccionadas em cortes de 3 µm de espessura. Após foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM) para posterior avaliação em microscopia de luz para análise de lesões hepáticas e fibrose, respectivamente.

A avaliação de Células Estreladas Hepáticas, macrófagos espumosos e células de Kupffer foi conduzida por métodos imuno-histoquímicos para a marcação de alfa actina de músculo liso (α -SMA) e CD163, respectivamente. O protocolo inicial para ambos consistiu em desparafinização dos cortes histológicos em estufa a 60°C por 1 h e então, diafanização dos cortes em xilol por 30 min. Após, os cortes foram hidratados em soluções de concentração decrescente de álcool e colocados em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada aquecendo as lâminas a 95°C em tampão citrato (pH 5,6) na panela de pressão. Para o bloqueio da peroxidase endógena usou-se 90 mL de solução de metanol (Dinâmica®) e 10 mL de peróxido de hidrogênio (Dinâmica®) 10 volumes, em uma câmara escura a temperatura ambiente, em 3 processos de 5 min cada. O bloqueio de reações inespecíficas foi efetuado pelo uso de leite desnatado em pó a 5% (Molico, Nestlé®) por 30 min. Após, os cortes foram lavados em água destilada e deixados em banho de PBS (pH 7,4) por 10 minutos. As lâminas foram então incubadas com os anticorpos primários:

- α -SMA diluído a 1:200 (Mouse monoclonal anti-human smooth muscle actin, clone 1A4, DakoCytomation, code M0851) – inicialmente a 37°C na estufa por 40 min e em seguida, overnight (15 h) a 4°C.
- CD163 diluído a 1:100 (Mouse monoclonal anti-human CD163, clone EDHu-1, Bio-Rad, code MCA1853T) - inicialmente a 37°C na estufa por 40 min e em seguida, overnight (15 h) a 4°C.

O Kit Novolink (code RE 7280-K, Max Polymer Detector System, Leica Biosystems Inc., UK) foi usado como anticorpo secundário. Entre todas as etapas, as amostras foram lavadas em água destilada e em PBS (pH 7,4). O cromógeno 3,3-Diaminobenzidina - DAB (DakoCytomation, code K3468-1) foi utilizado com contracoloração por Hematoxilina de Harris (HH).

Os controles negativos para os anticorpos primários (α -SMA e CD163) foram obtidos usando diluente de anticorpo (DakoCytomation, code S302283-2). Como controle positivo para o α -SMA (miofibroblastos), foi utilizado a imunomarcção da túnica média de ramos da artéria hepática nos espaços-porta das próprias secções histológicas e para o CD163, a imunomarcção de macrófagos alveolares pulmonares e de macrófagos sinusais do baço de tecidos de bovinos.

3.3. Análise histopatológica e imuno-histoquímica

As lâminas foram analisadas em microscopia de luz, nas objetivas de 10x, 20x, 40x e 60x. Descreveu-se o tipo de lesão (tipo de processo patológico), localização no parênquima (aleatória, capsular/subcapsular, espaço-porta/periportal, mediozonal e centrolobular), distribuição (focal, multifocal, difusa ou aleatória) e intensidade (discreta, moderada ou acentuada).

A quantificação da fibrose hepática (pela detecção de fibras de colágeno) foi determinada através do uso de imagens RGB (fotomicrografias) obtidas de lâminas coradas com Tricrômico de Masson usando a separação do canal verde, por meio do plugin “Colour Deconvolution” (modo Masson Trichrome) no software Fiji - versão Java 8 (Schindelin et al., 2012) como descrito por Chen et al. (2017). O canal verde evidencia as fibras colágenas coradas em azul. Para isso, foram fotografados 5 campos aleatórios de menor aumento (Obj. 10x) em cada fragmento de fígado, e as fotomicrografias foram analisadas no software, no qual a média de porcentagem de marcação (regiões de interesse – ROI – fibras colágenas) foi calculada. A região capsular e grandes espaços-porta foram evitados devido à grande deposição de colágeno nestas regiões.

A mesma análise (“Colour Deconvolution”) foi realizada para quantificar as CEHs ativadas e células de Kupffer imunomarcadas, porém com o uso do canal

vermelho (modo H DAB). O canal vermelho evidencia as células marcadas pelo cromógeno DAB. Para isso, foram fotografados 5 campos aleatórios de maior aumento (Obj. 40x) em cada fragmento de fígado, e as fotomicrografias adquiridas utilizadas para análise na ferramenta. Todas as análises avaliaram a porcentagem de área delimitada (ROI – células imunomarcadas) em relação à área total da fotomicrografia. Regiões com macrófagos espumosos imunomarcados foram evitadas para que a análise do software levasse em conta somente as células de Kupffer. As análises no software Fiji estão demonstradas na Figura 4 (A e B).

A contagem de macrófagos espumosos imunomarcados pelo CD163 foi realizada de forma manual. Para isso, foram selecionados aleatoriamente 5 campos de maior aumento (Obj. 40x) e as células imunomarcadas foram contadas. O grupo 0, por não apresentar macrófagos espumosos não foi avaliado. Como há diferença na quantidade de macrófagos espumosos entre os grupos 1, 2 e 3, na análise estatística foi utilizado um fator de correção para avaliar a real quantidade de marcação destas células levando em consideração a quantidade total de macrófagos espumosos por campo avaliado.

Todas as análises microscópicas foram realizadas no microscópio de luz Opticam O400S e as fotomicrografias no software Opticam Microscopia OPTHD (versão 4.7.15283.20190804).

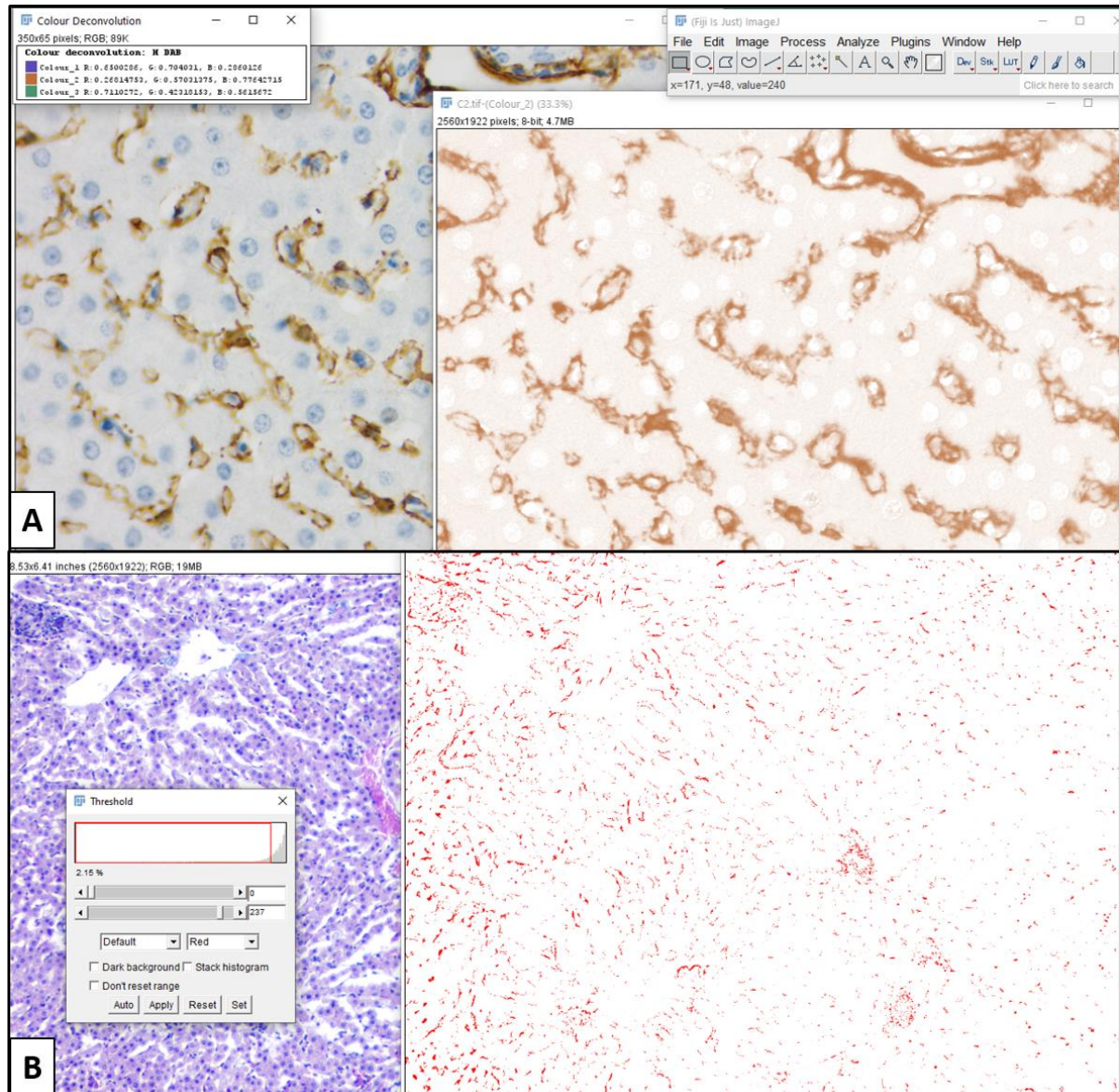


Figura 4. Metodologia de análise colorimétrica do plugin “Colour Deconvolution” no software Fiji. **A** - Delimitação de canal vermelho para análise de CEHs imunomarcadas (coloração DAB/HH). Notar que os núcleos das células são “deletados” para que o software não os contabilize na área de interesse (ROI). **B** - Delimitação de canal verde para análise de porcentagem de fibrose na coloração de TM. Em vermelho está evidenciada a ROI pela ferramenta “Threshold”.

3.4. Análise estatística

As alterações histológicas foram avaliadas por estatística descritiva e teste de Qui-quadrado, levando em consideração $p < 0,05$. A imunomarcagem das CEHs,

macrófagos espumosos e células de Kupffer e a porcentagem de fibrose na coloração de Tricrômio de Masson foram inicialmente verificadas para a ocorrência de distribuição normal. Após, foi utilizado teste paramétrico de análise de Modelos Mistos considerando-se a variação entre as lâminas (cortes histológicos dos fígados) como efeito aleatório e, para efeito fixo, levou-se em consideração os escores/grupos de macrófagos espumosos (0 a 3). Em caso de efeito significativo pelo teste F ($p < 0,05$) foi procedido o teste de comparação pareada de Tukey. Todas as variáveis foram estudadas por meio de pressupostos de independência dos resíduos e homogeneidade de variâncias. A avaliação da contagem de macrófagos espumosos positivos para CD163 não considerou o grupo 0 (pois este não havia macrófagos espumosos) e para este teste, foi incluso no modelo a contagem total de macrófagos espumosos dos campos como covariável para correção dos valores (fator de correção). Por fim, foi realizado teste de Correlação de Pearson entre a marcação de CEHs para α -SMA, macrófagos espumosos para CD163 e TM, considerando correlação positiva para $p < 0,05$. As análises foram realizadas no software estatístico R (R Core Team), versão 3.5.3, 2019.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos fígados apresentou lesões microscópicas discretas e infiltrados de macrófagos espumosos em quantidades variáveis (grupos 1 a 3). Os animais do G0 não apresentavam na microscopia de luz, a presença de macrófagos espumosos ou outras alterações histológicas na coloração de Hematoxilina e Eosina.

4. 1. Análise histopatológica (Hematoxilina e Eosina)

Os infiltrados de macrófagos espumosos estavam distribuídos aleatoriamente pelo parênquima hepático, sendo observados mais frequentemente na região centrolobular. Eram raros os macrófagos espumosos isolados. Todos os fígados exibiram lesões discretas a moderadas, sendo estas lesões inflamatórias, degenerativas/necróticas e proliferativas (hiperplasia biliar e fibrose). As principais

lesões observadas em todos os grupos e suas respectivas frequências, são mostradas na Tabela 1. Não houve associação pelo teste de Qui-quadrado entre as variáveis lesões histopatológicas observadas e os diferentes grupos/escores de macrófagos espumosos ($p > 0,05$ em todas as lesões).

Tabela 1. Frequência das alterações histopatológicas observadas nos fígados de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp.

Grupo ¹	Alterações Histopatológicas				
	Inf. Infl. ² Mononuclear p= 0,095	Fibrose Capsular p= 0,453	Degeneração Hidrópica p= 0,382	Proliferação de Ductos Biliares P= 0,536	Necrose Aleatória p= 0,778
3	83,33% (10/12)	58,33% (7/12)	33,33% (4/12)	8,33% (1/12)	16,66% (2/12)
2	100% (12/12)	66,66% (8/12)	41,66% (5/12)	25% (3/12)	16,66% (2/12)
1	75% (9/12)	41,66% (5/12)	16,66% (2/12)	16,66% (2/12)	8,33% (1/12)
Total	86,11% (31/36)	55,55% (20/36)	30,55% (11/36)	16,66% (6/36)	13,88% (5/36)

¹O grupo 0 não apresentava lesões histopatológicas; ²Infiltrado Inflamatório. O valor de $p < 0,05$ revela associação entre as variáveis lesão histológica e grupo/escore de macrófagos espumosos (Teste de Qui-quadrado).

Estas lesões estão de acordo com os relatos na literatura de animais que ingerem *Brachiaria* spp., como a presença de macrófagos espumosos (Driemeier et al., 1998; Driemeier et al., 1999; Brum et al., 2007; Sousa et al., 2010; Riet-Correa et al., 2011; Albernaz et al., 2010; Riet-Correa et al., 2010; De Oliveira et al., 2013; Ogliari et al., 2018), fibrose capsular (Riet-Correa et al., 2010), degeneração hidrópica (Driemeier et al., 2002; 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), necrose discreta aleatória (Driemeier et al., 1998; Brum et al., 2007; Sousa et al., 2010; De Oliveira et al., 2013) e proliferação de ductos biliares (Brum et al., 2007; Albernaz et al., 2010; Ogliari et al., 2018).

O infiltrado inflamatório mononuclear também é relatado em bovinos pastando *Brachiaria* spp. e este é normalmente descrito como aleatoriamente distribuído pelo parênquima e localizado nos tratos portais e/ou região periportal (Riet-Correa et al., 2010; Muniandy et al., 2020; Brum et al., 2007; Araújo et al., 2017; Faccin et al., 2014; Caiedo et al., 2012), como observado no presente estudo.

Este infiltrado tinha distribuição multifocal e era composto predominantemente por linfócitos, sendo mais frequente nos espaços-porta (Figura 5 A e B). O infiltrado mononuclear portal nestes casos é superior ao que normalmente é observado nos tratos portais de fígados bovinos saudáveis, principalmente quando comparado ao grupo 0 que não apresenta lesões histopatológicas. Portanto, sugere-se uma provável associação entre o infiltrado mononuclear e a resposta imune contra as toxinas da *Brachiaria* spp., uma vez que foi observado que fígados com maior quantidade de macrófagos espumosos (grupos 3 e 2) apresentaram também maior quantidade e intensidade destes infiltrados, em especial no espaço-porta.

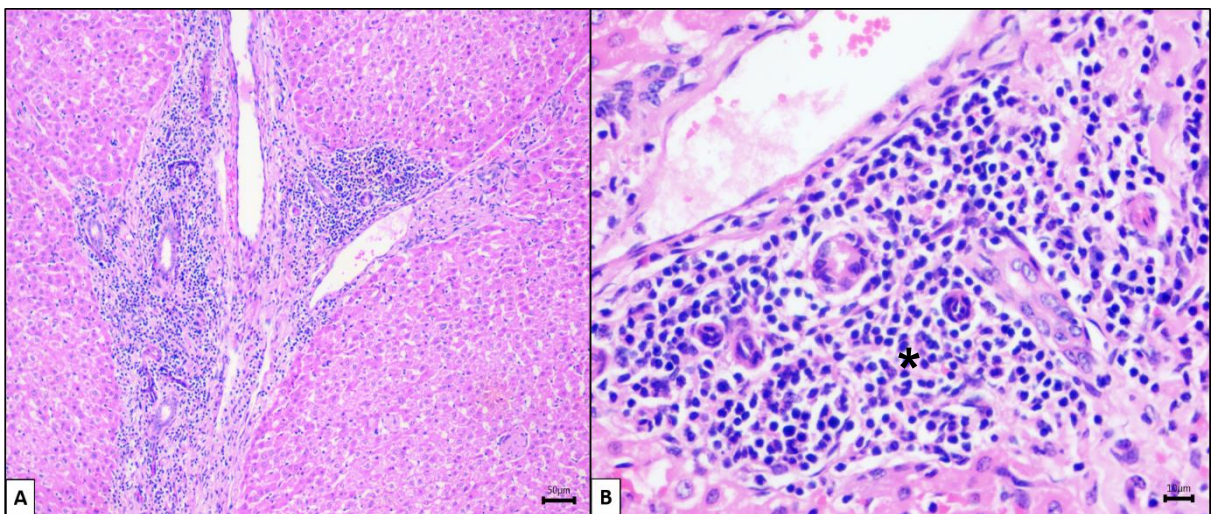


Figura 5. Fotomicrografias de fígado de bovino alimentado com *Brachiaria* spp., pertencente ao grupo 3, apresentando acentuado infiltrado inflamatório mononuclear no espaço-porta. A - Barra: 50µm. B - Notar que o infiltrado mononuclear é composto principalmente por linfócitos (*). Barra: 10µm. Hematoxilina e Eosina.

Dos 36 fígados com lesões histopatológicas (grupos 1, 2 e 3), 31 apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear, sendo este infiltrado observado nos espaços-porta; distribuído aleatoriamente no parênquima hepático, muitas vezes nos

sinusoides, entremeados entre os grupos de macrófagos espumosos (Figura 6) ou em áreas de fibrose capsular e região centrolobular.

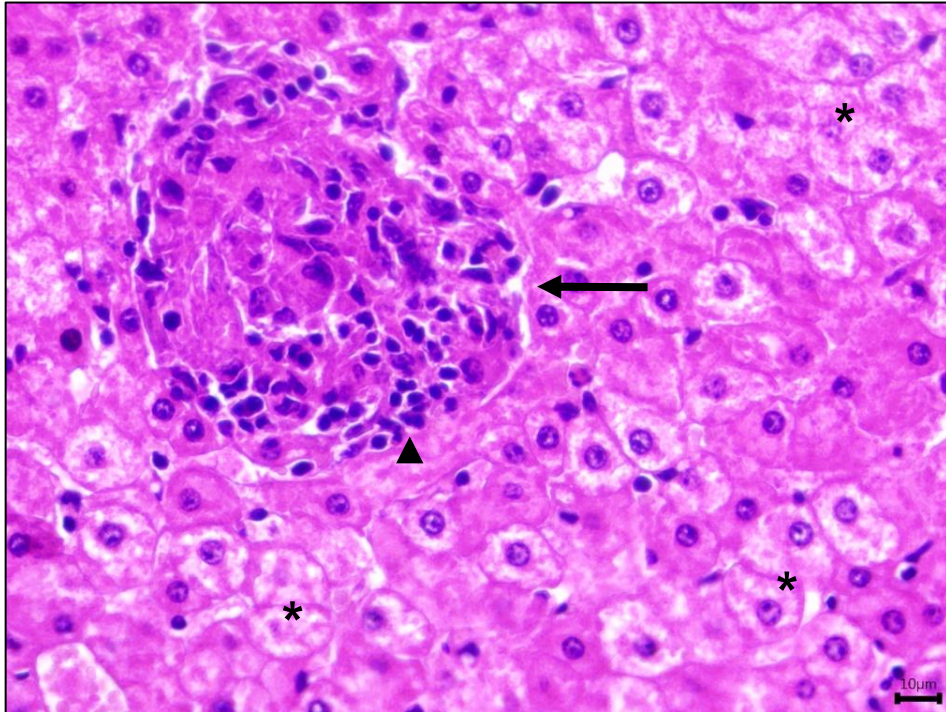


Figura 6. Fotomicrografia de fígado de bovino alimentado com *Brachiaria* spp., pertencente ao grupo 3. Observar um pequeno grupo de macrófagos espumosos (seta) associado a infiltrado inflamatório mononuclear discreto composto por linfócitos (cabeça de seta) e discreta degeneração hidrópica de hepatócitos circunjacentes (*). Barra: 10µm. Hematoxilina e Eosina.

O teste de Qui-quadrado não revelou associação entre a localização do infiltrado inflamatório mononuclear e o escore de macrófagos espumosos, com exceção aos infiltrados localizados na região capsular ($p= 0,028$). A tabela 2 detalha a localização destes infiltrados.

Tabela 2. Localização e distribuição do infiltrado inflamatório mononuclear observado em fígados de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp.

Localização e distribuição do Inf. Infl. ¹ Mononuclear	Grupo ²			Total
	1	2	3	
Espaço-porta (multifocal) p= 0,608	58,33% (7/12)	58,33% (7/12)	75% (9/12)	63,88% (23/36)
Centrolobular (multifocal) p= 2,255	0% (0/12)	0% (0/12)	8,33% (1/12)	2,77% (1/36)
Cápsula (focal) p= 0,028	0% (0/12)	25% (3/12)	8,33% (1/12)	11,11% (4/36)
Aleatório (multifocal) p= 0,175	16,66% (2/12)	25% (2/12)	0% (0/12)	11,11% (4/36)

¹Infiltrado Inflamatório; ²O grupo 0 não apresentava lesões histopatológicas. O valor de p < 0,05 revela associação entre as variáveis lesão histopatológica e grupo/escore de macrófagos espumosos (Teste de Qui-quadrado).

O fígado realiza tarefas imunes essenciais, logo, há células imunes residentes distribuídas pelo parênquima hepático normal. Portanto, o fígado naturalmente contém elevado número de linfócitos que incluem células Natural Killer (NKT) e células T CD4⁺ e CD8. A maioria destas células são imunocompetentes e transitam pelo fígado para prover contínua vigilância imunológica (Lalor et al., 2002). No fígado saudável, linfócitos residem principalmente nos tratos portais, mas podem também estar espalhados pelo parênquima (Bogdanos et al., 2013).

A infiltração do fígado por linfócitos ocorre em resposta a muitos insultos, incluindo não só a hepatite viral, mas também lesões autoimunes e tóxicas. A distribuição destes linfócitos no fígado vai depender do estímulo inflamatório. Os fatores que determinam a infiltração hepática em qualquer situação são pouco compreendidos, mas são provavelmente determinados pelo local de entrada dos linfócitos no fígado, e fatores que retêm linfócitos em uma localização particular (Lalor

e Adams, 1999). Como a maior parte dos metabólitos e microrganismos que causam injúria hepática entram pelo sistema porta (Brown et al., 2018) há tendência em ocorrer infiltrado inflamatório no espaço-porta, como observado neste estudo. De acordo com Shetty et al. (2008), no processo inflamatório hepático, o recrutamento de linfócitos aumenta marcadamente, e a localização dos infiltrados linfocíticos determina a natureza e severidade do processo patológico. Portanto, infiltrados portais são usualmente observados em doenças biliares. Porém, como as toxinas da *Brachiaria* chegam ao fígado pelo sistema portal, pode se esperar que parte da resposta contra a ação destas toxinas se instale no espaço-porta. Vale ressaltar que muitos estudos sobre intoxicação por *Brachiaria decumbens* revelaram importante colangio-hepatite (Sousa et al., 2010; Albernaz et al., 2010; Brum et al., 2007; Cruz et al., 2001; Ogliari et al., 2018), muitas vezes associadas a icterícia e fotossensibilização, o que não foi observado no presente estudo.

Com relação à intensidade do infiltrado inflamatório mononuclear portal, observou-se que a maioria era discreto (16 fígados). Somente 3 fígados apresentaram infiltrado mononuclear acentuado no espaço-porta, sendo todos eles do grupo 3 (Figura 5), ou seja, com maior quantidade de macrófagos espumosos. Cinco fígados apresentaram infiltrado moderado no espaço-porta. Apesar de boa parte dos infiltrados estarem presentes nos tratos portais, nenhum dos fígados analisados apresentou lesões degenerativas ou necróticas de colangiócitos, ou células inflamatórias na luz de ductos biliares. Em processos inflamatórios hepáticos, os vasos portais expressam proteína de adesão vascular 1 (VAP-1), P-selectina e E-selectina, que parecem enviar sinais de recrutamento de linfócitos para o espaço-porta (Lalor et al., 2002), o que sugere que nem todo infiltrado linfocítico portal é voltado para os ductos biliares.

No entanto, colangiopatia associada à presença de cristais birrefringentes dentro de ductos biliares não foi observada. Esta lesão é reportada com mais frequência em ovinos (Cruz et al., 2001; Brum et al., 2007) e é provavelmente a causa da colestase e acúmulo de filioeritrina, resultando em icterícia e fotossensibilização (Driemeier et al., 2002; Muniandy et al., 2020). Nenhum dos animais deste estudo apresentou sinais clínicos de intoxicação, e estavam visualmente sadios e aptos para o abate, o que pode explicar a ausência destas lesões. Pode-se inferir que talvez não

houve tempo para o desenvolvimento de tais lesões, ou que os infiltrados não eram voltados especificamente contra os ductos biliares (colangite). Além disso, fatores como a espécie, idade do animal, tempo de exposição, parte da planta ingerida e época da ingestão da *Brachiaria* spp. interferem na concentração de saponinas esteroidais, o que conseqüentemente, altera a quantidade de lesões observadas nos animais (Low, 2015; Muniandy et al., 2020).

O infiltrado mononuclear observado na região capsular estava em áreas de fibrose capsular e, em dois destes, havia grupos de macrófagos espumosos e proliferação de ductos biliares associados. Somente um deles apresentou infiltrado inflamatório moderado (grupo 2) e os demais, infiltrado discreto.

O infiltrado inflamatório mononuclear aleatório no parênquima hepático estava solto nos sinusoides ou associado a grupos de macrófagos espumosos (Figura 6). Este infiltrado foi considerado discreto, com exceção de um fígado do grupo 2 que apresentou infiltrado moderado de linfócitos entremeados a alguns grupos de macrófagos espumosos. Segundo Driemeier e colaboradores (1999), estes infiltrados mononucleares provavelmente representam estágios iniciais de formação de focos de macrófagos espumosos. Além disso, quando ativadas, as células estreladas hepáticas também são capazes de modular a resposta imune local e induzir a quimiotaxia de células inflamatórias para o fígado (Friedman, 2008), especialmente linfócitos, que podem inclusive proliferar devido a este estímulo (Viñas et al., 2003). Portanto, pode-se inferir que provavelmente as lesões provocadas pelas toxinas da *Brachiaria* spp. em hepatócitos levam a ativação de células de Kupffer e células estreladas, que por sua vez podem induzir a quimiotaxia de células inflamatórias para o fígado, principalmente linfócitos. Para determinar a real relação entre os macrófagos espumosos e as toxinas da *Brachiaria* spp. com os infiltrados mononucleares mais estudos são necessários, como a avaliação da expressão de citocinas que recrutam linfócitos pelos macrófagos espumosos.

Fibrose capsular foi a segunda lesão mais frequente (Tabela 1), observada em 55% dos fígados, sendo sempre multifocal e discreta. Esta lesão foi observada como fibras colágenas eosinofílicas, delicadas a grosseiras em áreas multifocais da cápsula de Glisson, e muitas vezes estava associada a focos de infiltrado de linfócitos, proliferação de ductos biliares (Figura 7A) e macrófagos espumosos.

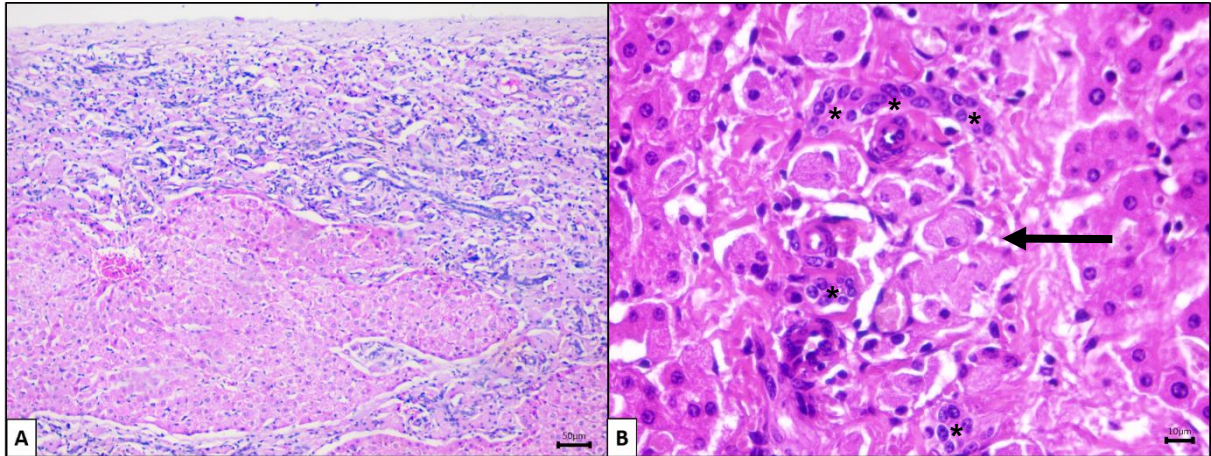


Figura 7. Fotomicrografias de fígados de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp., pertencentes ao grupo 3. **A** - Observa-se área focalmente extensa de fibrose capsular e subcapsular associada a neovascularização, proliferação de ductos biliares e infiltrado inflamatório mononuclear. Barra: 50µm. **B** – Área focal mostrando proliferação de ductos biliares (*) associados a um grupo de macrófagos espumosos (seta). Barra: 10µm. Hematoxilina e Eosina.

A coloração de TM evidenciou a fibrose capsular, assim como a deposição de colágeno em outros locais do parênquima hepático, o que será mais detalhado adiante. Esta lesão ocorreu em todos os grupos e não apresentou diferença estatística ou associação com a quantidade de macrófagos espumosos ($p= 0,453$). Comumente, estas áreas focais ou multifocais de fibrose estavam associadas a infiltrados inflamatórios e, portanto, podem estar associadas a outros insultos, conhecidos como peri-hepatite. A peri-hepatite normalmente está associada a peritonite aguda e também pode estar associada à penetração de parasitas como a *Fasciola hepatica* (Brown et al., 2018). No entanto, é importante ressaltar que boa parte das áreas de fibrose capsular também apresentavam agregados de macrófagos espumosos, e que o estudo de Faccin et al. (2015) faz uma forte associação entre esta lesão e a ingestão crônica de *Brachiaria* spp.

A terceira lesão mais frequente, observada em 11 fígados, foi degeneração hidrópica de hepatócitos (Tabela 1), porém, não houve associação estatística com a quantidade de macrófagos espumosos pelo teste de Qui-quadrado ($p= 0,382$). Esta alteração foi discreta em todos os fígados e normalmente estava localizada na região centrolobular e em hepatócitos próximos a grupos de macrófagos espumosos (Figura 6). A maioria dos estudos em fígados de bovinos alimentados com pastagem de

Brachiaria relata a tumefação hepatocelular como uma lesão frequentemente associada aos macrófagos espumosos (Sousa et al., 2010; Riet-Correa et al., 2011; Albernaz et al., 2010; Riet-Correa et al., 2010; De Oliveira et al., 2013; Brum et al., 2007; Ogliari et al., 2018). No entanto, degeneração hidrópica aguda na região centrolobular do fígado é particularmente comum em casos de hipóxia, uma vez que esta porção do lóbulo hepático recebe sangue menos oxigenado (Brown et al., 2018). Portanto, sugere-se que esta lesão, quando não associada a grupos de macrófagos espumosos, pode ter ocorrido de forma aguda no momento do abate, devido à sangria e pode não ter relação direta com as toxinas da *Brachiaria* spp. O estudo de lesões histopatológicas em fígados de bovinos realizado por Almeida (2016), evidencia que a degeneração hidrópica na região centrolobular foi um achado muito comum, mesmo em animais que não apresentavam macrófagos espumosos, ou qualquer outro tipo de lesão hepática. A degeneração hidrópica em hepatócitos adjacentes aos infiltrados de macrófagos espumosos provavelmente tem relação com os mesmos, podendo ser uma resposta a um efeito citotóxico, pois, segundo Driemeier e colaboradores (2002) estes hepatócitos tumefeitos também apresentam hiperplasia do retículo endoplasmático liso.

A proliferação de ductos biliares é uma alteração normalmente descrita em fígados de animais que ingeriram *Brachiaria* spp. (Albernaz et al., 2010; Brum et al., 2007; Cruz et al., 2001; Ogliari et al., 2018), porém foi pouco observada neste estudo (Tabela 1). A Figura 7A demonstra uma área focalmente extensa de proliferação de ductos biliares associada a fibrose capsular e subcapsular e infiltrado inflamatório mononuclear. A proliferação/hiperplasia ductal está normalmente associada a lesões crônicas, sendo comumente observada em áreas de fibrose capsular (Brown et al., 2018), como observado neste estudo. A Figura 7B mostra área focal de proliferação de ductos biliares associada a um infiltrado de macrófagos espumosos, o que pode sugerir uma relação de padrão lesional crônico, uma vez que os macrófagos espumosos surgem em animais que estão pastando *Brachiaria* spp. há pelo menos 150 dias (Driemeier et al., 2002).

Também foi raramente observada a necrose aleatória de hepatócitos (Tabela 1), lesão frequentemente relacionada à ingestão de *Brachiaria* spp. em outros estudos (Sousa et al., 2010; De Oliveira et al., 2013; Brum et al., 2007; Driemeier et al., 1998).

A necrose aleatória nem sempre estava associada a áreas contendo macrófagos espumosos, sendo mais associada a infiltrados inflamatórios mistos, contendo neutrófilos, provavelmente resultado de patógenos que chegam ao fígado pela circulação portal.

Outras lesões histopatológicas observadas com baixa frequência e intensidade discreta foram: congestão difusa (9 fígados), degeneração gordurosa centrolobular (6 fígados) e infiltrado inflamatório misto multifocal e aleatório, composto por neutrófilos e linfócitos (5 fígados). Estas lesões eram discretas e provavelmente não possuem relação direta com os macrófagos espumosos ou intoxicação por *Brachiaria*, sendo inclusive, lesões normalmente não associadas à ingestão de *Brachiaria* em relatos da literatura. A congestão hepática pode estar associada à sangria ineficiente, que faz com que o sangue acumule no fígado (Vieira et al., 2011). A degeneração gordurosa pode estar ligada a diversos fatores que atrapalham o metabolismo de ácidos graxos, como a hipóxia e redução de ingestão calórica (Brown et al., 2018). Essa alteração foi observada somente em 6 fígados, com distribuição igual entre os grupos/escores de ME, e provavelmente não tem associação direta com a ingestão de *Brachiaria* spp. ou com os ME. Infiltrado inflamatório misto multifocal foi observado somente em 5 fígados, em sinusoides, e pode estar associado a lesões necróticas focais, sendo comum estarem relacionados a uma pequena quantidade de agentes infecciosos, especialmente bactérias, que chegam ao fígado pela circulação portal (Brown et al., 2018).

Somente dois fígados apresentaram maior deposição de colágeno no espaço-porta e região periportal, evidente na coloração de HE, chegando a formar pontes portais. Destes, um fígado era do grupo 3 e outro do grupo 2.

4.2. Análise histopatológica (Tricrômico de Masson)

A avaliação dos fragmentos de fígados corados com TM revelou fibrose discreta a moderada em todos os fígados. A fibrose era multifocal e normalmente caracterizada por proliferação de fibras colágenas delicadas entremeadas entre macrófagos espumosos (Figura 8), em áreas de fibrose capsular, ocasionalmente

associadas com infiltrados de macrófagos espumosos e linfócitos, e áreas de fibrose na região periportal, raramente formando pontes entre tratos portais (Figura 9 A e B).

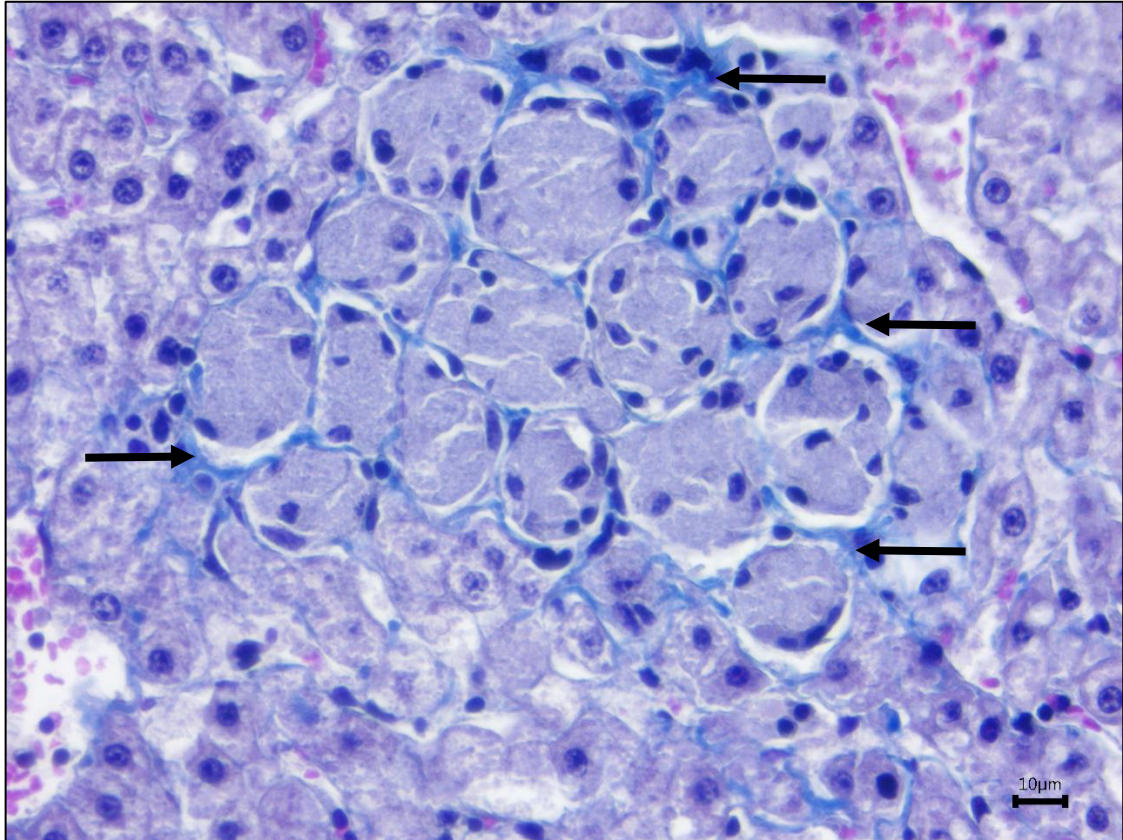


Figura 8. Fotomicrografia de fígado de bovino alimentado com *Brachiaria* spp., pertencente ao grupo 2. Delicada deposição de fibras colágenas (setas) envolvendo um grupo de macrófagos espumosos localizado próximo à veia centrolobular. Barra: 10 μ m. Tricrômico de Masson.

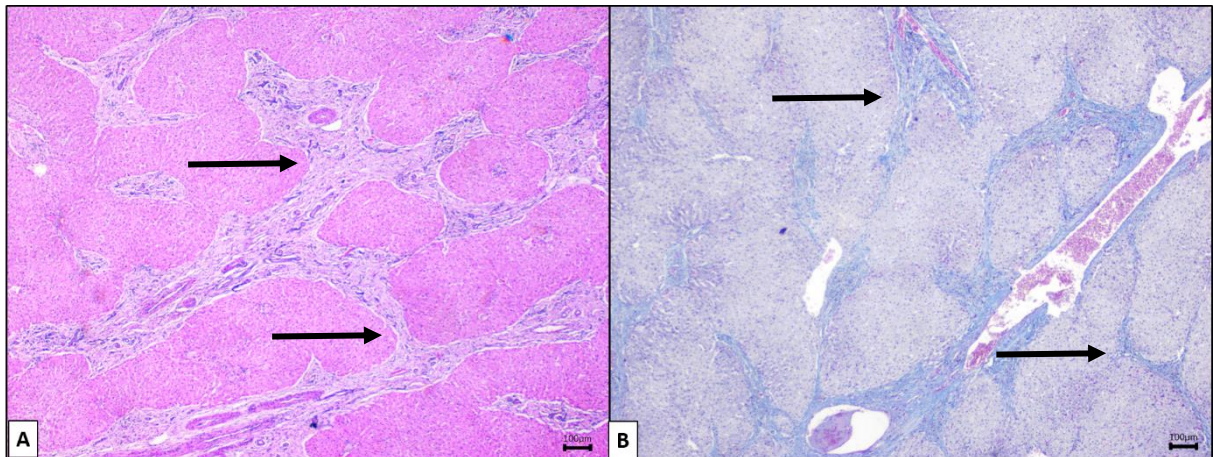


Figura 9. Fotomicrografias de fígados de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp. **A** – Fígado do grupo 3. Proliferação de tecido conjuntivo fibroso (fibras colágenas eosinofílicas) formando pontes entre espaços-porta (pontes portais - setas) associado a infiltrado inflamatório mononuclear. Barra: 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.

A fibrose foi maior em fígados contendo macrófagos espumosos, havendo maior deposição de colágeno em fígados com maior escore de infiltrados de ME (grupos 2 e 3) ($R^2= 73,88\%$; $p= 0,001$). Isto sugere uma possível relação entre a presença de macrófagos espumosos e a estimulação para fibrogênese, fator este ainda mais evidenciado pela análise estatística que mostrou relação entre a variável deposição de fibras colágenas no TM e os diferentes escores de ME. No entanto, não houve diferença estatística entre a deposição de colágeno entre os grupos 0 e 1 (Figura 11A).

4.3. Análise imuno-histoquímica

4.3.1. Expressão de α -SMA pelas Células Estreladas Hepáticas

A imunomarcção de α -SMA foi observada no citoplasma das células estreladas hepáticas ativadas nos sinusoides em todos os fígados, incluindo no grupo 0. Frequentemente houve maior positividade para α -SMA em CEHs envolvendo grupos médios e grandes de ME (Figura 10A), e ocorreu alta variação de positividade

ao longo do parênquima de todos os fígados, independentemente do escore de ME (Figura 10 B-D).

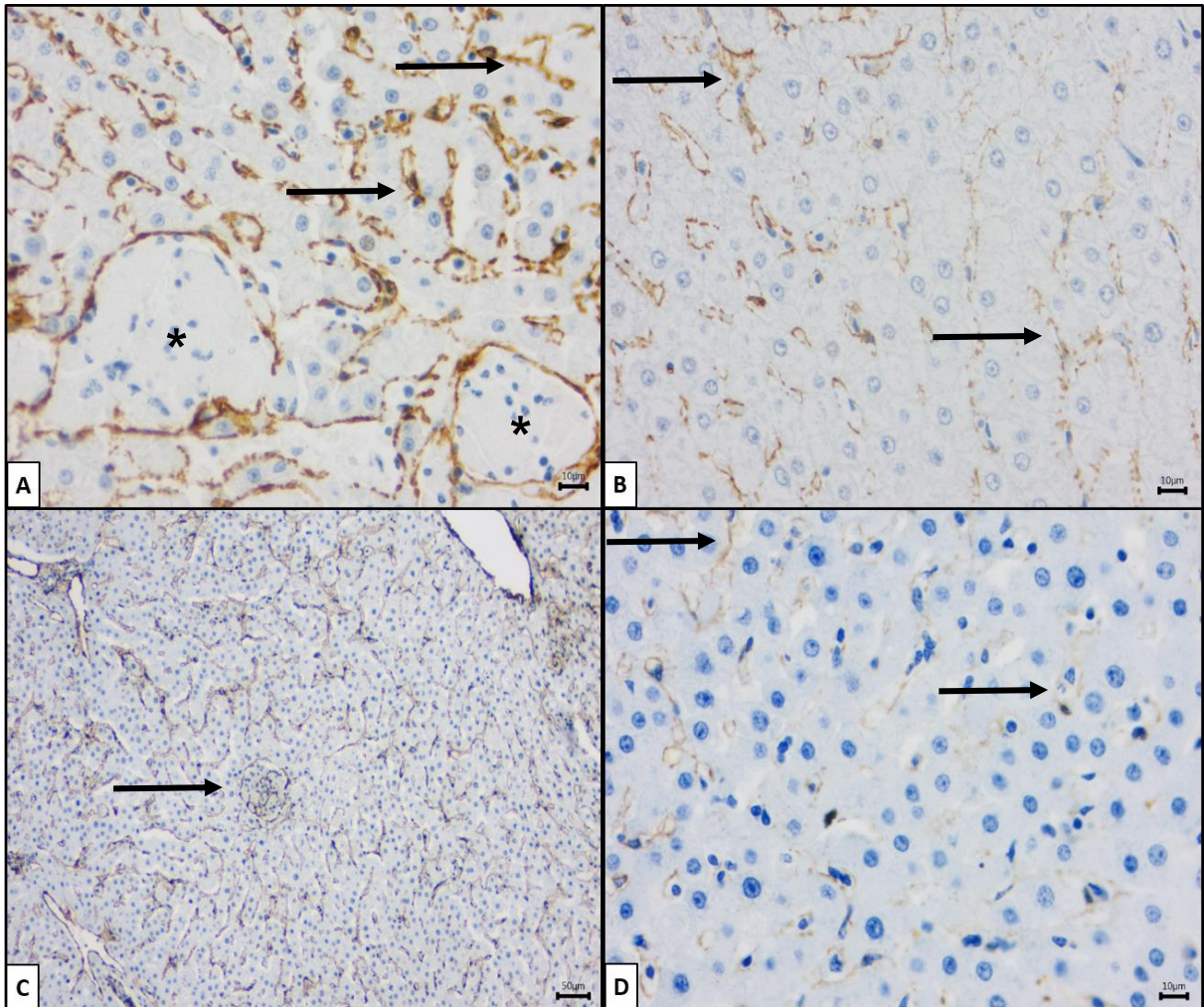


Figura 10. Fotomicrografias de fígados de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp. com imunomarcção de α -SMA em CEHs. **A** - Fígado do grupo 3 – Evidente positividade de CEHs ao redor de um infiltrado médio de macrófagos espumosos (*). Forte imunomarcção é observada ao longo dos sinusoides (setas). Barra: 10 μ m. **B** – Fígado do grupo 2 – Discreta delimitação dos sinusoides pelas CEHs (setas). Barra: 10 μ m. **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: 50 μ m. **D** – Fígado do grupo 0 - Delicada imunomarcção de CEHs ao longo dos sinusoides (setas). Barra: 10 μ m. Kit Novolink. Cromógeno DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris.

Houve diferença de imunomarcção para CEHs ativadas (α -SMA) entre os grupos de infiltrados de ME ($R^2=70,96\%$; $p= 0,002$). Fígados dos grupos 3 e 1 apresentaram alta imunomarcção para CEHs (sendo esta superior no grupo 3), enquanto os fígados dos grupos 2 e 0 mostraram menor imunomarcção, sem diferença estatística entre estes dois grupos (Figura 11B).

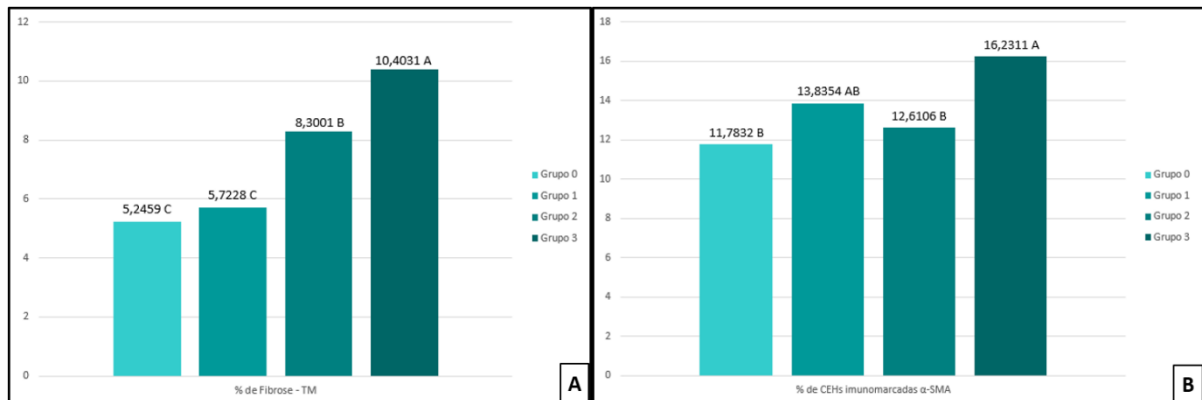


Figura 11. Médias para porcentagem de fibrose no Tricrômico de Masson (A) e imunomarcção de CEHs para α -SMA (B) em fígados de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp. **A** - Notar a maior proporção de fibrose em fígados com maior escore de macrófagos espumosos (grupos 3 e 2) ($p= 0,001$). Não houve 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%).

Nota-se que fígados do grupo 3 apresentaram maior grau de fibrose quando comparado aos demais grupos, tanto na avaliação pelo TM quando na ativação de CEHs pela análise de expressão de α -SMA. Esta evidência é amparada pelo fato de que uma maior deposição de fibras colágenas e também uma maior imunodeteção de CEHs ativadas foi observada entre ou envolvendo infiltrados de ME, como evidenciado na Figura 8.

Apesar disso, fígados do grupo 2 mostraram menor imunomarcção para CEHs ativadas que os fígados do grupo 1, e nenhuma diferença estatística para fígados do grupo 0, sendo que na avaliação da fibrose pelo TM, observou-se maior deposição de fibras colágenas em fígados do grupo 2 que em fígados do grupo 1 e até mesmo do grupo 3. Mais análises são necessárias para avaliar causas possíveis para a maior

ativação de CEHs em fígados do grupo 1. já que as alterações histopatológicas não explicam este achado, uma vez que os fígados do grupo 2 apresentaram mais lesões histopatológicas que o grupo 1, havendo, maior tendência de ativação de células estreladas neste grupo. O tempo de exposição dos animais às toxinas da *Brachiaria* spp. e a outros possíveis agentes agressores poderiam ser fatores impactantes na ativação das células estreladas.

Sabe-se que as células estreladas ativadas podem secretar metaloproteinases (MMP), em especial metaloproteinase 1 (MMP-1), a principal protease responsável por degradar colágeno tipo 1, que é o mais comumente depositado na MEC em fígados fibróticos (Murphy et al., 2002). Além de induzir a deposição de matriz extracelular, as células estreladas também podem atuar na degradação desta matriz (Friedman, 2008), o que pode ser uma possível explicação para a menor deposição de fibras colágenas no grupo 1, quando comparado com a ativação das CEHs.

Células estreladas ativadas também podem secretar inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP-1), que além de impedir a ação das metaloproteinases, também inibe a apoptose destas células. Portanto, ao mesmo tempo que podem degradar a MEC, também podem impedir sua degradação (Murphy et al., 2002). Podemos hipotetizar que as CEHs do grupo 2 poderiam expressar maior quantidade de TIMP-1, o que acarretaria em menor degradação da MEC e conseqüentemente, uma maior deposição de fibras colágenas quando comparadas com o grupo 1. Além disso, a secreção de PDGF mais elevada no grupo 1 poderia explicar porque há maior quantidade de células imunomarcadas neste grupo, uma vez que esta citocina apresenta potente capacidade mitogênica nas CEHs (Tsuchida e Friedman, 2017). A análise da expressão destas proteínas poderia explicar melhor esta disparidade.

Outra possível hipótese que poderia explicar porque o grupo 2 apresenta menor média de células estreladas ativadas quando comparado ao grupo 1, é a possibilidade de diferença de expressão de citocinas entre os macrófagos hepáticos e os próprios macrófagos espumosos. Macrófagos que secretam grandes quantidades de TGF- β provavelmente levariam a uma maior ativação de CEHs e de produção de MEC, enquanto macrófagos que secretam ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF ou ligante de Fas (mediando a apoptose extrínseca) poderiam levar a apoptose de CEHs e conseqüentemente, reduzir a fibrose (Chang et al., 2013).

Em um estudo avaliando fibrose hepática e imunodeteção de CEHs ativadas em fígados de cães com leishmaniose, Marques et al. (2018) observaram maior imunomarcção de CEHs e maior deposição de fibras colágenas pela análise da coloração de TM em animais com maior quantidade de macrófagos parasitados no parênquima, o que sugere que um aumento na quantidade de macrófagos auxiliou no processo de fibrose hepática, como foi observado neste estudo. O mesmo grupo de pesquisadores demonstrou em outro estudo que os macrófagos que apresentavam maior parasitismo por *Leishmania* spp. eram do tipo M2 (Moreira et al, 2016), que é um perfil de macrófagos polarizados normalmente associados à cicatrização tecidual (Mosser, 2003). Logo, a determinação do perfil dos macrófagos espumosos pode definir o tipo de processo inflamatório no fígado, e assim, estimular ou não a fibrogênese.

4.3.2. Expressão de CD163 pelos Macrófagos Espumosos e Células de Kupffer

A imunomarcção de CD163 foi analisada separadamente. Fez-se avaliação da positividade de macrófagos espumosos e, também das células de Kupffer.

Macrófagos hepáticos têm um importante papel na patogênese da injúria hepática crônica, mas estas células também são propostas como um alvo potencial para combater a fibrose (Schuppan e Kim, 2012). Há ambivalência da atividade de macrófagos e identificação de subtipos funcionalmente opostos. Os macrófagos têm sido classificados como pró-inflamatórios (M1) e imunorreguladores (M2) (Tacke e Zimmermann, 2014). No fígado, no entanto, macrófagos parecem expressar marcadores de M1 e M2 simultaneamente (Ramachandran et al., 2012). Os macrófagos espumosos já foram imunomarcados para CD68 (Faccin et al., 2016), um importante marcador para macrófagos M1 em camundongos, porém considerado um pan marcador de macrófagos em humanos (Kosmac et al., 2018). Na espécie bovina, o CD68 é também considerado um pan marcador de macrófagos (Ackermann et al., 1994). A imunomarcção para CD163 gera controvérsias. Sabe-se que macrófagos de fenótipo M2 expressam este marcador, porém a avaliação deste marcador

isoladamente não deve ser usada para definir a polarização em M2, sendo necessário o uso de outros marcadores (Barros et al., 2013).

Nas células de Kupffer, notou-se expressão elevada de CD163 em todos os fígados. Não houve evidente diferença de marcação para CD163 nas células de Kupffer entre os grupos ($R^2 = 70,31\%$; $p = 0,001$). O grupo 2 apresentou maior média de imunomarcção destas células, que os demais, seguido do grupo 0, grupo 3 e, por fim, grupo 1, porém não houve diferença estatística (Figura 12B).

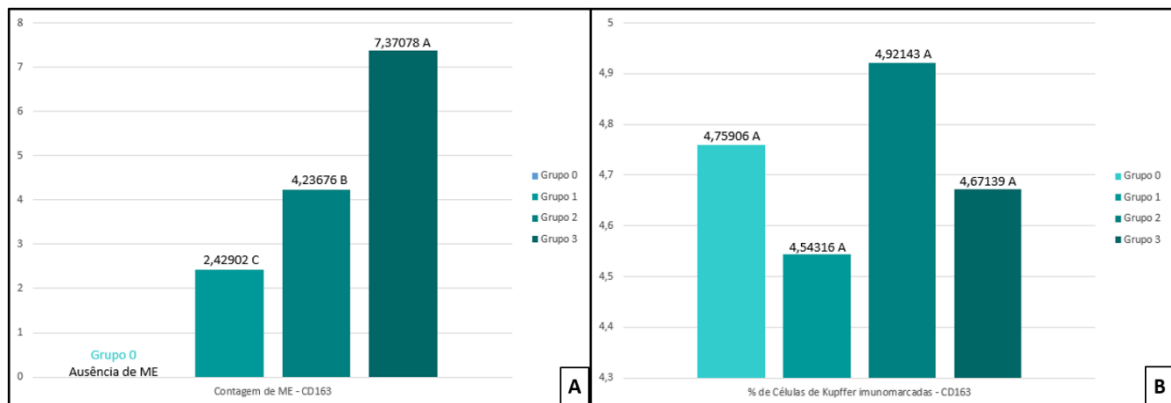


Figura 12. Médias de imunomarcção para CD163 em macrófagos espumosos (A) e células de Kupffer (B) em fígados de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp. **A** – Há evidente maior média de contagem de macrófagos espumosos imunopositivos para CD163 nos grupos com maior escore de ME ($p = 0,003$). **B** - 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%).

Notou-se que, apesar de as células de Kupffer apresentarem imunomarcção positiva para CD163 ao longo de todo o parênquima hepático, havia menor imunomarcção ao redor da veia centrolobular e imunomarcção mais evidente na região periportal, de forma que era possível delimitar os lóbulos hepáticos. Este padrão foi observado em todos os grupos. A marcação mais evidente de CD163 em células de Kupffer na região periportal é consistente com a localização destas células, que tendem a ser mais frequentes nesta região do lóbulo hepático que na região centrolobular (David et al., 2016; Freitas-Lopes et al., 2017). No homem e no rato, as células de Kupffer apresentam expressão de CD163 (Gordon, 2003; Röszer, 2015), portanto, a evidente marcação das células de Kupffer para CD163 neste estudo

sugere que em bovinos, as células de Kupffer também expressam CD163, e agem inclusive num perfil “M2-like” (Davies et al., 2013; Röszer, 2015). Logo, nestes animais, a função deste receptor “*scavenger*”, que age como um internalizador da hemoglobina (Davies et al., 2013), seria a mesma, ou seja, as células de Kupffer bovinas também seriam importantes no metabolismo do ferro hepático. Não foi observada uma alteração no padrão de marcação das células de Kupffer envolvendo os grupos de macrófagos espumosos, mas nota-se células de aspecto mais estrelado/alongado (com projeções citoplasmáticas) entremeadas aos macrófagos espumosos, que provavelmente são células de Kupffer (Figura 13).

Com relação aos macrófagos espumosos, observou-se maior contagem de macrófagos espumosos imunomarcados para CD163 em grupos com maior escore destas células (envolveu fator de correção de número total de macrófagos espumoso por campo como covariável), sendo que o grupo 3 foi o que mais apresentou imunomarcação, seguido do grupo 2 e, por fim, grupo 1 ($R^2= 66,35\%$; $p= 0,003$). Estes dados estão representados na Figura 12A.

Além disso, notou-se grande variação na imunomarcação ao longo dos infiltrados destas células. Muitas vezes, o mesmo grupo de macrófagos apresentou variação na imunomarcação, sendo algumas células fortemente positivas e outras com imunomarcação mais fraca ou negativa (Figura 13A). Alguns grupos apresentavam células com alta imunomarcação (Figura 13B). Havia grupos que apresentavam marcação mais fraca para CD163 (Figura 13C) enquanto outros grupos eram completamente negativos (Figura 13D).

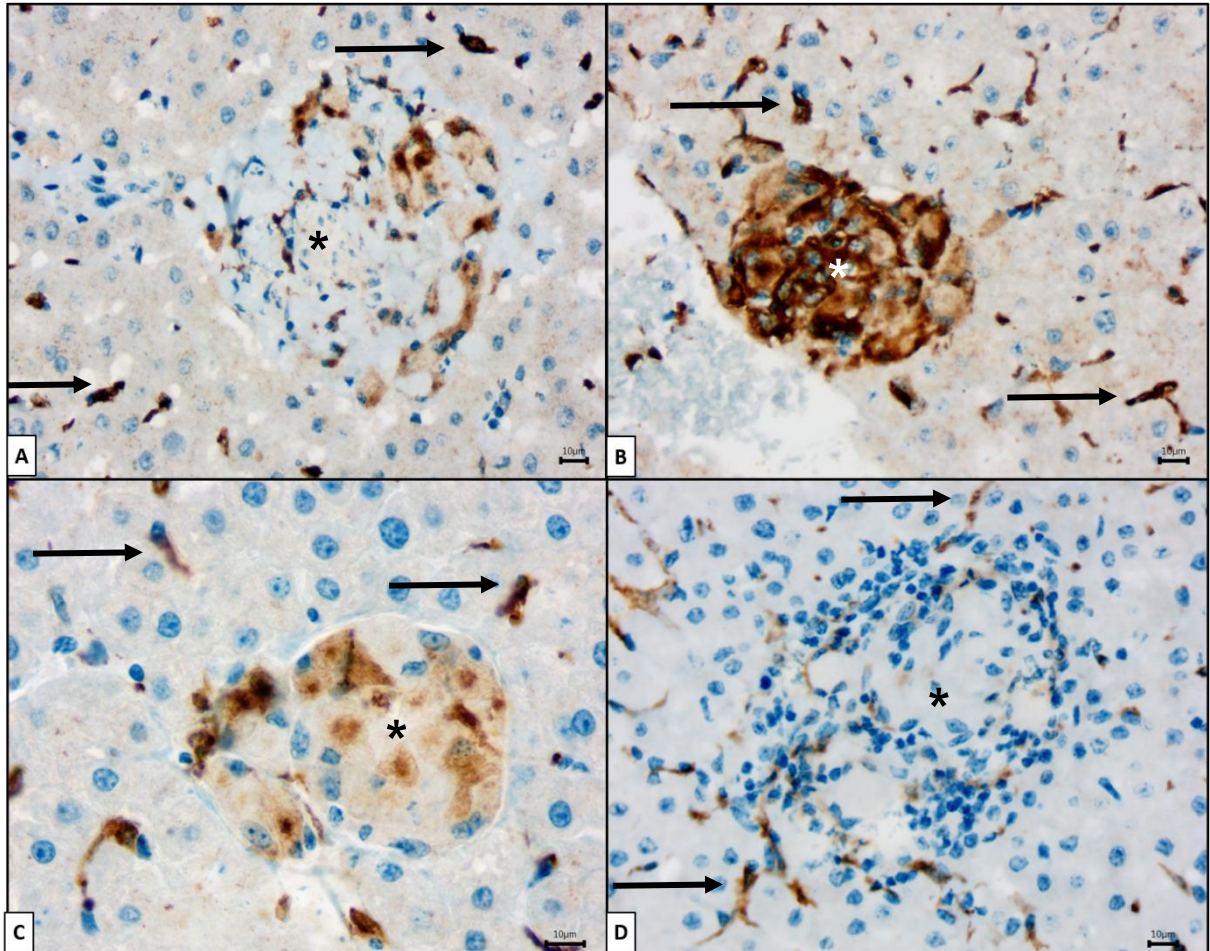


Figura 13. Fotomicrografias de fígados de bovinos alimentados com *Brachiaria* spp. Imunomarcção de ME (*) e células de Kupffer (setas) para CD163. **A** - Fígado do grupo 3 – Positividade variável para CD163 em um grupo de macrófagos espumosos. Note que, no mesmo grupo, alguns macrófagos espumosos expressam 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.

Uma vez que as células de Kupffer bovinas deste estudo apresentaram evidente expressão de CD163, a expressão variável de macrófagos espumosos para este receptor pode sugerir que estas células provavelmente são derivadas de monócitos e não de células de Kupffer em proliferação. Além disso, o fato de os

agregados de macrófagos espumosos serem mais comuns na região centrolobular, região em que há menor quantidade de células de Kupffer (David et al., 2016; Freitas-Lopes et al., 2017), também suporta esta hipótese. Outro fator que corrobora com esta teoria é o aspecto morfológico das células de Kupffer que fica evidente na imunomarcação por CD163 como células alongadas a estreladas, com projeções citoplasmáticas, enquanto os macrófagos derivados de monócitos tendem a apresentar morfologia mais arredondada a circular (Gordon, 2003) como observado nos macrófagos espumosos. As células com imunomarcação mais forte para CD163, de aspecto alongado/fusiforme, entremeados a macrófagos espumosos provavelmente são células de Kupffer.

A hipótese de que os macrófagos espumosos são originados de monócitos circulantes também é amparada pelo fato de que Faccin e colaboradores (2016) demonstraram em seu estudo marcação positiva de MAC387 em macrófagos espumosos, um marcador de monócitos ou macrófagos teciduais derivados de monócitos recém-chegados ao tecido (Bardadin et al., 1991; McGuinness et al., 2000; Subimerb et al., 2010; Saldarriaga et al., 2019) que não é expresso por células de Kupffer (Bardadin et al., 1991; Saldarriaga et al., 2019). Gomar (2002) entretanto, revelou em seu estudo que os macrófagos espumosos não marcaram para MAC387, enquanto outros macrófagos dos tecidos avaliados apresentaram marcação positiva mostrando que a imunomarcação foi eficiente. O estudo de Faccin et al. (2016), no entanto, revelou que somente alguns macrófagos espumosos apresentaram imunomarcação discreta para MAC387. Este achado pode sugerir que os macrófagos espumosos que apresentaram marcação positiva no estudo de Faccin e colaboradores (2016) tenham chegado recentemente no fígado, derivados de monócitos, e que, à medida que permanecem infiltrados no fígado e demais tecidos, param de expressar este marcador.

Ainda, a expressão variável de CD163 pelos macrófagos espumosos, inclusive entre células localizadas nos mesmos agregados de ME (Figura 13A), também sugere que as células que não expressaram este marcador provavelmente podem apresentar perfil de macrófagos M1. Em humanos, macrófagos M2 apresentam alta expressão de CD163, enquanto macrófagos M1 apresentam baixa ou nenhuma expressão deste marcador (Komohara et al., 2006). Além disso, o estudo

de Düvel e colaboradores (2012) realizou polarização *in vitro* de macrófagos derivados de monócitos da espécie bovina em M1, induzidos inicialmente por IFN- γ e subsequente estimulação com LPS; e M2, induzidos por IL-4 e IL-13. Este estudo revelou que os monócitos ainda não ativados apresentavam alta expressão de CD163 e baixa expressão de Calprotectina, uma proteína associada a M1. Após ativação, para M1 ou M2, os macrófagos M1 apresentaram redução da expressão de CD163, mas sem alteração de expressão de Calprotectina. Os macrófagos M2 não apresentaram alteração de expressão para ambos os marcadores, mantendo alta expressão de CD163, ou seja, monócitos não polarizados podem expressar CD163, mas os polarizados em M1 normalmente não expressam este receptor. Isso corrobora com o fato de que em bovinos, macrófagos M1 provavelmente não expressam, ou apresentam baixa expressão de CD163.

Macrófagos de perfil M2 possuem atividade moduladora e são conhecidos por atuarem na cicatrização e reparação tecidual (Mosser, 2003) Mas é importante deixar claro que estes macrófagos ainda podem ser divididos em subtipos, que se ativam sob diferentes estímulos: M2a, que ativam-se em resposta a IL-4 e IL-13; M2b, que se ativa em resposta a complexos imunes e LPS bacteriano; M2c, em resposta a glicocorticoides e, para alguns autores ainda há o subtipo M2d, que se ativam em resposta a IL-6 e adenosina. Outros autores ainda sugerem que os macrófagos M2a seriam alternativamente ativados; que M2b seriam macrófagos tipo 2 e que M2c seriam macrófagos desativados, ou seja, que antes eram macrófagos M1 e se tornaram M2 (Röszer, 2015).

Os marcadores utilizados para identificação de macrófagos M2 são variados, e incluem moléculas expressas como CD163, CD206, arginase-1, Ym1 (Chi3l3), HIMF, CD209, MGL-1 e a síntese de peptídeos como neurotransmissores e hormônios (catecolaminas, substância P e adiponectina), e fatores de crescimento, como o TGF- β , metabólitos lipídicos e outras moléculas. A expressão e síntese destas moléculas varia com o subtipo de M2 (Röszer, 2015).

Não é indicada a avaliação da expressão de um marcador, sem a associação de outros marcadores para analisar a polarização de macrófagos em M2 (Barros et al., 2013; Röszer, 2015). O CD163, por exemplo, pode ser expresso por macrófagos M2a, M2c, macrófagos associados a tumores (TAM), macrófagos M2 residentes de

tecidos e macrófagos atípicos (que se ativam em resposta a infecção por micobactérias ou IL-33). Porém, avaliando os tipos de macrófagos que expressam CD163, e suas funções associadas, os macrófagos espumosos que apresentaram expressão de CD163 provavelmente se enquadrariam no subtipo M2c (desativados), que inicialmente teriam ativação M1, aumentando a resposta inflamatória hepática e que, por fim, se tornariam M2, levando a grande liberação de TGF- β e, por fim, auxiliando no processo de ativação das células estreladas hepáticas, com consequente fibrose.

De certa forma, Röszer (2015) define que macrófagos M2 são uma entidade de macrófagos “não-M1”, que possuem variadas funções, e que futuramente, podem vir a ter uma nova terminologia por meio de análises mais robustas. Logo, afirmar que os macrófagos espumosos que expressam CD163 seriam realmente M2 é precipitado, mas estes provavelmente não seriam M1.

4.4. Teste de Correlação de Pearson

O teste de correlação de Pearson revelou que há correlação entre a fibrose hepática observada pelo TM e a marcação de CEHs para α -SMA ($p= 0,001$). No entanto, não houve correlação entre a fibrose avaliada por TM e a quantidade de ME positivos para CD163 ($p= 0,848$); e para a marcação de CEHs para α -SMA e a quantidade de ME positivos para CD163 ($p= 0,377$). Estudos mostram que macrófagos derivados de monócitos, em especial os que apresentam elevada expressão de Ly6C, têm importante participação no processo de fibrose hepática, pois aumentam a ocorrência de fibrose devido à liberação de citocinas como TGF- β , PDGF, TNF e IL-1 β (Tacke e Zimmermann, 2014), que ativam células estreladas. Logo, a maior ativação de células estreladas e deposição de tecido conjuntivo fibroso evidenciada pelo TM nos grupos com maior quantidade de ME deste estudo, também pode sugerir que os macrófagos espumosos parecem ter relação com o processo de fibrose hepática. Além disso, as CEHs ativadas secretam MCP-1, o que atrai monócitos para o fígado (Tacke e Zimmermann, 2014). Portanto, pode-se hipotetizar que a agressão tóxica, provocada nos hepatócitos, pelas toxinas da *Brachiaria* poderia levar à ativação de células de Kupffer e CEHs, que por sua vez atraem monócitos para o fígado. Estes monócitos liberam ainda mais substâncias que ativam as células

estreladas, gerando um ciclo vicioso que, cada vez mais atrai mais monócitos e ativa mais CEHs. Por fim, nos fígados em que a agressão pelas toxinas é maior, veríamos maior quantidade de macrófagos espumosos e também de ativação de CEHs e, conseqüentemente, de fibrose.

Sugere-se, portanto, que os macrófagos espumosos associados à ingestão de *Brachiaria* spp. podem estimular a fibrogênese, visto que fígados com maior quantidade destas células também apresentam maior ativação de células estreladas e deposição de fibras colágenas (fibrose). Também é possível supor um aumento na inflamação hepática, provavelmente pela promoção do recrutamento de linfócitos, que pode ser mediada pelas CEHs ativadas, pelas células de Kupffer e pelos próprios ME. Os macrófagos espumosos provavelmente têm sua origem de monócitos circulantes e não de células de Kupffer, o que é sustentado pela diferença morfológica entre estas células e a variação na sua localização dentro do parênquima hepático, além da variável expressão de CD163. Mais estudos, avaliando detalhadamente o perfil e origem dos macrófagos espumosos associados a liberação de citocinas e ativação de linfócitos irão auxiliar na compreensão da influência destas células na doença hepática crônica bovina provocada pela ingestão de *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, Wettore 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 Zootecnia** 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. **Toxicon** 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.

Víñas 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.