

Dosagem da produção de óxido nítrico por macrófagos Alveolares de cães com leishmaniose visceral

Mayara Camuri Teixeira Lopes (ICV / UFPI), (Fernanda Samara Barbosa Rocha (colaboradora, aluna de veterinária), Rosa Maria Cabral (colaboradora, Depto. de Clínica e Cirurgia Veterinária- UFPI), Ivete Lopes Mendonça (colaboradora, Depto. de Clínica e Cirurgia Veterinária- UFPI) Felipe Viana (colaborador, aluno de veterinária), Marcia dos Santos Rizzo (Orientadora, Depto. de Clínica e Cirurgia Veterinária- UFPI)

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma das principais doenças transmitidas por vetores no mundo. No Brasil a doença é causada pelo protozoário *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* e transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Atualmente, a doença não se encontra mais confinada a florestas e matas e está em franca expansão. Isso tem sido atribuído a mudanças nos fatores ecológicos, como o desmatamento da cobertura vegetal original, causando o deslocamento e/ou extinção da fauna pela destruição dos habitats naturais; ao crescimento dos centros urbanos; ao esvaziamento rural e às dificuldades sócio-econômicas do país (AGUIAR et al., 2007).

No flebótomo, o parasita tem uma forma flagelada denominada promastigota. Uma vez inoculada no mamífero, a *leishmania* é fagocitada ou penetra nas células do sistema fagocítico mononuclear, onde perde o flagelo e transforma-se na forma amastigota. As formas promastigota são fagocitadas pelos neutrófilos que são as primeiras células a migrarem para o local da infecção e podem ser destruídas através da ação de produtos do metabolismo oxidativo, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), atividade enzimática e produção de óxido nítrico. Os neutrófilos infectados secretam quimiocinas como IL-8 e MP-1B, moléculas importantes para atrair mais neutrófilos e macrófagos. A produção de óxido nítrico (NO) como uma via efetora comum de defesa do macrófago contra a *leishmania* (BACELLAR; CARVALHO, 2005)

Para se estudar os macrófagos alveolares será necessário realizar o lavado broncoalveolar (LBA) que é uma técnica que consiste na infusão de solução de NaCl nos pulmões, por meio de broncoscópico ou sonda endotraqueal, para aspiração. O fluido obtido com o lavado pode ser submetido a avaliações microbiológicas, bioquímicas e citológicas (quantitativa e qualitativa). O exame qualitativo é fundamental, devendo-se observar fagocitose de bactérias ou hemácias por neutrófilos ou macrófagos, presença de neutrófilos degenerados, presença de estruturas fúngicas ou parasitárias e alterações celulares sugestivas de neoplasia (Burkhard et al., 2003).

2. METODOLOGIA

Foram utilizados um total de 5 cães procedentes do Centro de Controle de Zoonoses de Teresina, sendo estes animais naturalmente infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* .

O diagnóstico de LVC foi confirmado por meio do método sorológico de Imunofluorescência indireta a partir de soro colhido dos animais e de exame parasitológico, sendo este realizado por meio de coleta de material proveniente de medula óssea esternal e/ou linfonodo poplíteo. A análise comparativa da evolução das lesões no decorrer do estudo será realizada por meio de radiografia

simples de tórax para as alterações pulmonares e análise dos níveis séricos de uréia, creatinina, fosfatase alcalina, ALT, P e proteína total para avaliação das alterações renais.

O lavado broncoalveolar (LBA) será realizado em todos os animais do estudo, sendo tal procedimento realizado uma única vez por grupo experimental. Para tanto, cada animal será encaminhado ao centro cirúrgico (Hospital Veterinário Universitário – CCA/UFPI), anestesiado e intubado, para posteriormente obter o fluído do LBA utilizando-se soro fisiológico a 0,9% estéril, por via intratraqueal. Em seguida, procede-se a contagem total, em câmara de Neubauer, e contagem diferencial, entre lâmina e lamínula, das células presentes no fluído do LBA, com a adequação do número de células para a realização de ensaios “in vitro”. No caso do grupo experimental de animais com LV e infundidos com CMMO, o LBA realizar-se-á após o período de 30 dias pós-infusão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à disponibilidade de cães para o desenvolvimento do projeto em sua totalidade, decidiu-se dividir os procedimentos dos 15 cães em duas etapas. A primeira etapa consistiu em três animais negativos e três animais positivos para Leishmaniose. A carga parasitária de todos os animais foi confirmada por meio de análise parasitológica. Devido à metodologia empregada para o LBA, todo o procedimento cirúrgico dos primeiros cinco cães do estudo foi realizado apenas uma vez, sendo os animais eutanasiados em seguida.

Assim, três animais negativos para Leishmaniose (confirmados pelo exame parasitológico) foram submetidos ao procedimento cirúrgico para o LBA. Um animal com idade mais avançada apresentou problemas respiratórios durante o procedimento do LBA e morreu antes da obtenção do fluído broncoalveolar. Desta feita, o LBA de animais negativos para Leishmaniose foi obtido de apenas dois cães, nesta primeira etapa do projeto. O restante dos três cães negativos para Leishmaniose (grupo controle negativo) será realizado na segunda etapa do projeto.

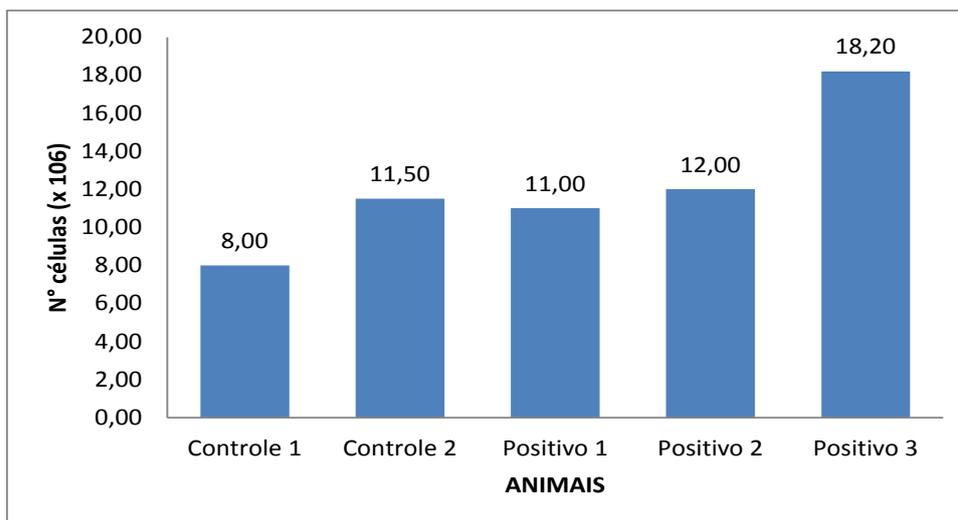
Em um grupo de três animais positivos para Leishmaniose foram realizados os procedimentos do LBA. O número de células presentes no fluído broncoalveolar é demonstrado na Tabela 1:

TABELA 1: Número de células presentes no fluído broncoalveolar obtido por LBA de cães.

| Animal | An | Nº de células/ml | de e obtido | Volum | Número total de células |
|------------|----|-----------------------|-------------|---------|-------------------------|
| Controle 1 | Co | 1,0 x 10 ⁶ | | 8,0 ml | 8,0 x 10 ⁶ |
| Controle 2 | Co | 2,3 x 10 ⁶ | | 5,0 ml | 11,5 x 10 ⁶ |
| Positivo 1 | Po | 1,1 x 10 ⁶ | | 10,0 ml | 11,0 x 10 ⁶ |
| Positivo 2 | Po | 0,8 x 10 ⁶ | | 15,0 ml | 12,0 x 10 ⁶ |
| Positivo 3 | Po | 2,6 x 10 ⁶ | | 7,0 ml | 18,2 x 10 ⁶ |

Nota-se, com base nestes dados parciais, que apenas um animal (positivo para LVC) apresenta diferença significativa em relação à média de células obtidas entre os animais do grupo controle. Este animal mostrava-se com sinais clínicos característicos da LVC.

Porém, os dados obtidos ainda são insipientes para se chegar a um dado conclusivo (Gráfico 1). As dosagens de NO serão realizadas ao final dos procedimentos cirúrgicos de LBA.



Não foram observadas complicações após o uso da técnica transtraqueal para a colheita do lavado broncoalveolar. Recuperou-se pelo menos 5 ml de material estilado, com média de 9 ml de volume. O volume do material coletado foi superior ao da pesquisa feito por MELCHERT, et al (2008), que teve a media aproximadamente de 2,6 ml de volume.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, P.H.P. et al. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.4, p.283-294, 2007.
- BACELLAR, O; CARVALHO E. M. Imunopatogênese da Leishmania Visceral. *Gazeta Medica da Bahia*. (jan-jun): 24-34. 2005
- BURKHARD, M. J.; VALENCIANO, M.; BARGER, A. Sistema respiratório. In: RASKINS, R. E.; CABRAL, RM; BRANCO, E; RIZZO, MS; FERREIRA, GJ; ET AL. Cell Therapy for Fibrotic Interstitial Pulmonary Disease: Experimental Study. *Microscopy Research And Technique* 00:000–000, 2011. DOI 10.1002/jemt.20981.
- MELCHERT, A.; MOTTA, Y. P.; et al . Avaliação citologica e microbiologica do lavado broncoalveolar em cães hígdos. *Semina: ciências agrárias, londrina*, v. 29, n. 1, p. 157-164. 2008