

## **ESTUDO COMPARATIVO DA IMUNOMODULAÇÃO DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL INFUNDIDOS COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA**

*Felipe José Costa Viana (ICV), Márcia Dos Santos Rizzo (Orientador, Departamento Clínica e Cirurgia Veterinária/UFPI), Cristian Francisco de Carvalho Pereira (Colaborador, UFPI), Airton Mendes Conde Junior (Colaborador, UFPI)*

### **Introdução**

Considerada uma das mais importantes zoonoses negligenciadas pela OMS, a leishmaniose visceral, está distribuída em quase todo Brasil, sendo este país que apresenta uma das maiores taxas de incidência da doença, sendo um grave problema pra saúde pública. O agente etiológico é do gênero *Leishmania*, um flagelado e transmitido por um mosquito flebotomíneo, *Lutzomyia longipalpis*, o cão é o principal hospedeiro urbano enquanto a raposa é considerada o principal reservatório em áreas rurais (COSTA, 1990). Potencialmente fatal, sobretudo associados a outros fatores como desnutrição e co-infecções. O desenvolvimento da doença em cães e no homem são semelhantes mostrando assim a importância de se estudar mais sobre a LV canina e entender seus mecanismos.

Para uma avaliação mais detalhada acerca da atividade do sistema imune no TR inferior em animais acometidos por LV, pode-se considerar uma lavagem broncoalveolar, que consiste na infusão e sucção de solução fisiológica a 0,9% com o auxílio de sonda endotraqueal e uretral, líquido esse que entrará em contato direto com a árvore brônquica trazendo à tona células para estudo e avaliação (MORI, 2000; RIBAS, 2010). O principal tipo de células encontrado são macrófagos (ANDREASEN, 2003), e foram o objeto de estudo, observando seu spreading (espraiamento) e fagocitose, ambos *in vitro*.

Objetivando esta avaliação supracitada aliada à infecção por LV e infusão de células mononucleares de medula óssea, buscou-se observar o grau de atividade destes macrófagos alveolares sob estas circunstâncias.

### **Metodologia**

Foram usados 16 animais, sendo destes 6 hígidos (Grupo controle negativo), 6 animais naturalmente infectados (Grupo controle positivo) e 4 animais naturalmente infectados e tratados com CMMO, todos de idade, sexo e raça variados e provenientes do Centro de Controle de Zoonoses/Teresina com confirmação para LV através de sorologia. Foram mantidos em canil localizado no Centro de Ciências Agrárias/UFPI em tempos diferentes, separados por grupos. Foram realizados exames clínicos no início e fim da estadia dos animais.

A realização do lavado broncoalveolar (LBA) foi realizada no Hospital Veterinário Universitário/UFPI, primeiramente o animal foi submetido à medicação pré-anestésica com acepromazina a 0,2% na dose de 0,05mg/kg/IM, induzido com propofol a 10% na dose de 0,4mg/kg/IV e mantido intubado na inalatória com isoflurano. Usou-se a sonda endotraqueal como passagem direta à árvore brônquica para a instilação da solução fisiológica, e aspirado através de uma sonda uretral adaptada à seringa.

Após a coleta do fluido do LBA, o material foi levado ao Setor de Histologia/UFPI onde foram feitas alíquotas para os testes de spreading e de fagocitose. O spreading que é considerado uma fagocitose mal-sucedida é realizado para determinar o grau de ativação do macrófago e sua aderência à lamínula e seguiu-se a técnica descrita por Rabinovitch (1973). Já o teste de fagocitose, onde se verificou a capacidade de ingestão dos macrófagos que aderiram à lamínula, realizou-se seguindo a técnica descrita por Mariano (1976), técnica essa baseada na exposição de fungos às células fagocíticas presentes na alíquota.

Foi realizada a contagem de macrófagos alveolares usando microscópio óptico (Olympus CX41), colocando-se a lamínula usada no processamento do material coletado entre lâmina e lamínula e observada na objetiva de 20x. Preconizou-se a contagem de apenas 100 células aderidas por lâminas para ambos os testes, e ao final, realizou-se a proporção através do seguinte cálculo:

$$\frac{\text{Células espreiadas/fagocitadas}}{\text{Total de células aderidas}} \times 100$$

Para o fim do tempo experimental de cada grupo foi realizada a eutanásia, seguindo todos os procedimentos morais e éticos.

A coleta de CMMO foi realizada coletando diretamente da crista ilíaca e separada por gradiente de concentração e infundido via IV na veia jugular a quantidade de  $1 \times 10^8$  células.

### **Resultados e Discussão**

Excetuando os animais do grupo controle negativo, todos mostraram sinais clássicos de LV, tanto ao exame clínico, quanto aos exames complementares, como anemia e alterações plasmáticas sobretudo na uréia e creatinina.

O volume aspirado em relação ao infundido apresentou uma relação de 15% de aproveitamento, semelhante ao obtido por Mello (2002) e inferior ao obtido por Ribas (2010). Em se notar as características visuais e sabidamente com uma boa quantidade de células, o material coletado deve apresentar-se incolor, discretamente turvo, com partículas em suspensão e presença de surfactante, verificada pela observação de espuma no material (RIBAS, 2010).

Conforme tabela 1, a leitura dos macrófagos aderidos às lamínulas apresentou um resultado o qual mostra um aumento no espreiamento dos macrófagos alveolares pós-terapia celular, indicando uma possível relação da infusão de células mononucleares da medula óssea com o sistema imune. Não restrito a isso, vários outros experimentos mostraram a capacidade do incremento do índice de espreiamento dos macrófagos, como mostrado por Rabinovitch e De Estefano (1973) que testaram diversas formas e estímulos que podem influenciar no espreiamento do macrófago. Os macrófagos do presente trabalho foram observados exatamente como diversos autores descreveram (RABINOVITCH, 1973).

Pode-se observar a evolução e ativação destes MA após o período experimental de 42 dias. Tal resposta pode ter relação com o recrutamento de macrófagos para sítios de inflamação no pulmão, e já é sabido que a LVC pode acarretar tais alterações histopatológicas. E que com infusão das CMMO ocorreu um maior aporte de células do sistema a estes locais. Considerando também a costumeira imunossupressão provocada pela LVC, o aumento do número de MA leva a crer que a participação das CMMO possa ter efeito na ativação macrofágica.

TABELA 1: Contagem de células provenientes do LBA por grupos

Animais	Espraçamento (%)	Média/Desvio Padrão	Fagocitose (%)	Média/Desvio Padrão
Grupo Controle Negativo	70,3	70±12,1	58,5	61,6±10,2
Grupo Controle Positivo	75,8	75,6±15,2	63,3	61,8±14,9
Grupo Positivo e Tratados com CMMO	92,1	91,7±4,3	57,6	57,7±10,4

### Conclusão

Ao resultado do trabalho proposto pode-se observar um efeito positivo para o uso de CMMO para o incremento da resposta imune no trato respiratório inferior, aumentando assim, a atividade dos macrófagos. Tratou-se de um trabalho inicial para a avaliação desse conjunto em animais portadores de Leishmaniose, e certamente será um ponto de partida para outras medidas avaliativas.

**Apoio:** LASAN – UFPI; HISTOLOGIA – UFPI; PATOLOGIA ANIMAL- UFPI; HVU-UFPI.; CRIAR CENTRO VETERINÁRIO.

### Referências

ANDREASEN, C.B. Bronchoalveolar lavage. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.33, p.69-88, 2003.

COSTA, C.H.N.; PEREIRA H.F.; ARAÚJO, V.A. Epidemia de Leishmaniose Visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980 – 1986. **Revista de Saúde Pública**. 24:361 – 371, 1990.

MELLO, M. F. V. ; FERREIRA, Ana Maria Reis ; NASCIMENTO-JUNIOR, A. . Cytologic Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid Collected Through an Endotracheal Tube in Dogs. **Acta Scientiae Veterinariae**, Rio Grande do Sul, v. 30, n.2, p. 119-125, 2002.

MORI, E.; MORI, C.M.C.; FERNANDES, W.R. Avaliação da função de macrófagos alveolares em cavalos clinicamente sadios. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, p.172-178, 2000.

MARIANO, M.; NIKITIN, T.; MALUCELLI, B.E.; Immunological and non-immunological phagocytosis by inflammatory macrophages epithelioid cells and macrophages polykarions from foreign body granulomata. **Journal of Pathology**, v120, p151-9, 1976.

RABINOVITCH, M., DE STEFANO, M.J. Macrophage spreading in vitro. I. Inducers of spreading. **Exptl. Cell Res.**, v.77, p.323-334, 1973.

RIBAS, C. R.; DORNBUSCH, P. T.; CIRIO, S. M. et al. Citologia de lavado broncoalveolar de cães: comparação entre lâminas a fresco e conservadas em formol. **Archives of veterinary Science**,v15, n2, p.69–76. 2010.

**Palavras-chave:** Leishmaniose. Lavado broncoalveolar. Macrófagos alveolares.