

# MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE FÍGADO E LINFONODO NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

PINHO, F. A.<sup>1</sup>; ALVES, G. B. B.<sup>2</sup>; SILVA, S. M. M. S.<sup>3</sup>; COSTA, F. A. L.<sup>3</sup>

## Introdução

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica, causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi* no continente americano (LAINSON e SHAW, 1992), caracterizada por de células do sistema fagocítico mononuclear (BRANDONÍSIO et al., 1990). O cão é considerado o principal reservatório doméstico do parasita (LAINSON e SHAW, 1987).

Células T desempenham papel fundamental na modulação da leishmaniose visceral. Resistência à infecção está associada a ativação de células TCD4<sup>+</sup>Th1 específicas para *Leishmania spp.*, que produzem IFN- $\gamma$  e, desse modo, ativam macrófagos (PINELLI et al., 1994; ABBAS et al., 2000). Células TCD8<sup>+</sup> também parecem estar envolvidas com a resistência à infecção. A ativação das células TCD4<sup>+</sup>Th2 pelo protozoário resulta no aumento da sobrevivência do parasita e na exarcebação das lesões, em razão das ações supressivas de suas citocinas nos macrófagos (ABBAS et al., 2000; BARBIERI, 2006).

Assim, a imunopatologia da leishmaniose visceral está intimamente relacionada ao papel modulador da resposta imunológica do hospedeiro, merecendo atenção os mecanismos que estão agindo diretamente como fatores determinantes da cura ou progressão da doença. Desse modo, o objetivo deste estudo foi avaliar a intensidade da resposta inflamatória de fígado e linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* e relacionar a presença de células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> com a susceptibilidade à infecção.

## Material e métodos

Foram utilizados 25 cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Teresina-PI. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo 1 (G1), com 12 animais com sintomatologia clínica de leishmaniose visceral (LV) e grupo 2 (G2), com 13 animais sem sinais clínicos para LV. O diagnóstico de LV foi confirmado por imunofluorescência indireta (RIFI) e exame parasitológico e/ou cultura de medula óssea esternal, baço e linfonodo poplíteo.

Sob efeito de anestesia geral, com tiopental sódico, os animais foram sacrificados com cloreto de potássio a 20%. Foram colhidos fragmentos do fígado e linfonodo poplíteo de 0,5 cm de espessura e preparado *imprint* em lâminas para coloração com Giemsa. Os fragmentos foram fixados em formol a 10% tamponado com fosfato 0,01 M pH 7,4 e processados por técnica de rotina, cortados a 5  $\mu$ m e corados com hematoxilina-eosina para microscopia de luz e imunoistoquímica.

A detecção de parasitos e antígenos nos órgãos foi feita com o uso de anticorpo policlonal de camundongo anti-*Leishmania amazonensis* na diluição 1:1600. Células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> foram detectadas com anticorpo policlonal de camundongo anti-CD4<sup>+</sup> e anti-CD8<sup>+</sup> na diluição de 1:800. A amplificação da

<sup>1</sup>Mestranda em Ciência Animal, Setor de Patologia Animal / DCCV / CCA / UFPI, Campus Agrícola da Socopo, Cep:64.049-550, Teresina-PI.

<sup>2</sup>Médica Veterinária autônoma, Quadra 3; Casa 2, Setor C – Mocambinho III, Teresina-PI.

<sup>3</sup>Professor(a), Setor de Patologia Animal / DCCV / CCA / UFPI, Campus Agrícola da Socopo, Cep: 64.049.550, Teresina-PI.

reação foi realizada com sistema EnVision+, peroxidase (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA, Código k 4001). A revelação foi feita com diaminobenzidina (Sigma Cematic, USA) e contracoloração com hematoxilina de Harrys (Sigma Chemical, USA).

A quantificação de células TCD4+ e CD8+ foi realizada em cortes de linfonodo e fígado corados por imunoperoxidase, utilizando analisador de imagem computadorizado Leica Qwin D-1000, versão 4.1 (Cambridge, UK) do Setor de Patologia animal / BIOLAI, do CCA/UFPI. Foram capturados 20 campos por corte de linfonodo e fígado de cada animal para contagem do número de células TCD4+ e CD8+.

Os resultados foram analisados de forma semi-quantitativa, mensurando-se a localização, distribuição e intensidade da lesão, numa escala de 0 a 4 onde: 0= normal, 1= mínima ou duvidosa, 2= média, 3=moderada, 4=moderadamente severa e 5=severa. Nas análises dos dados comparativos foram utilizados testes estatísticos não paramétricos de Mann Whitney. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

## Resultados

No linfonodo poplíteo o infiltrado inflamatório era constituído, principalmente, de macrófagos e linfócitos, destacando-se, em alguns casos, a grande presença de plasmócitos. Chamou a atenção, em um caso, a intensa presença de fibroblastos como componente do infiltrado inflamatório. Na cápsula e seio-subcapsular a resposta inflamatória variava de intensidade mínima a severa, sendo observada, também, presença de eosinófilos. Depleção de folículos e de células da região paracortical foi mais evidente em G1 que G2 e hiperplasia de folículos foi maior em G2 (Figura 1, 2, 3 e 4). Acúmulos focais de macrófagos, linfócitos e células plasmáticas, às vezes com presença de polimorfonucleares, foram considerados, neste estudo, como formações granulomatosas. Observou-se também hiperplasia de células do seio medular com diferença significativa entre G1 e G2. Raros neutrófilos foram encontrados no conteúdo celular do linfonodo.

No fígado, foi observado metamorfose gordurosa de intensidade mínima a severa, distribuição difusa ou focal às vezes na zona 1 do lobo hepático ou em torno da veia terminal hepática. O espaço porta apresentava-se alargado, com infiltrado inflamatório constituído de macrófagos, linfócitos, plasmócitos e polimorfonucleares. Nos sinusóides, a presença de polimorfonucleares era mais evidente, em alguns casos, em intensidade moderadamente severa em G1. Hiperplasia de células de Kupffer foi maior em G2 (Figura 5 e 6) e granuloma intralobular nos animais sintomáticos.

Pela técnica de imunoperoxidase, observou-se amastigotas e antígeno de *Leishmania* tanto no fígado quanto no linfonodo, em células mononucleares no padrão celular e como material particulado no interstício, com a característica coloração marrom, em intensidade variando de mínima a severa. No fígado, amastigotas foram encontradas em maior intensidade em G1 comparado ao G2. Presença de antígeno foi significativamente maior em hepatócitos em G1, bem como em células inflamatórias na área periportal. Células TCD4+ e CD8+ foram detectadas em fígado e linfonodo (Figura 7), localizadas neste último órgão, principalmente na região paracortical, mas não havia diferença significativa desta população celular entre os grupos G1 e G2.

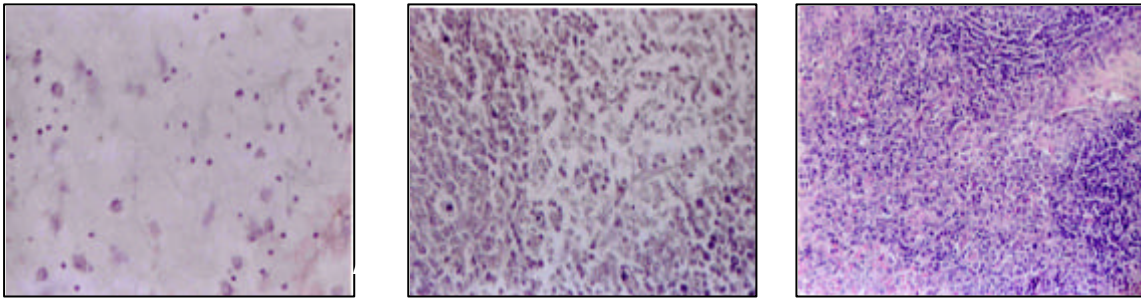


Figura 1. Cães sintomáticos. Linfonodo. Depleção de folículos (A) e de células da região paracortical (B). Cão assintomático. Hipercelularidade da região paracortical. (C). H-E. 40x.

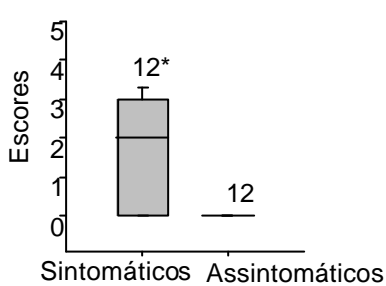


Figura 2. Cão. Linfonodo. Depleção de folículos, \*p=0.0058 (Teste Mann Whitney).

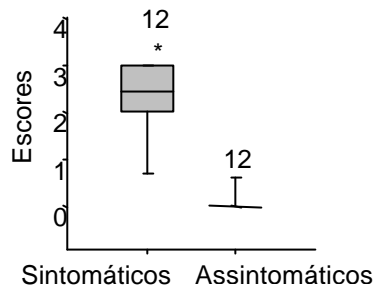


Figura 3. Cão. Linfonodo. Depleção de células da região paracortical, \*p= 0.00 (Teste Mann Whitney).

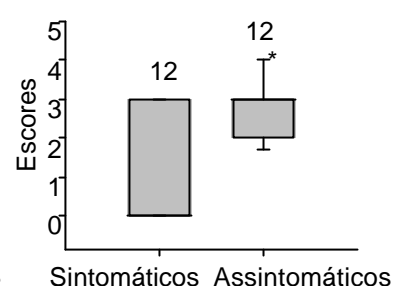


Figura 4. Cão. Linfonodo. Hiperplasia de folículos, \*p = 0.0118 (Teste Mann Whitney)

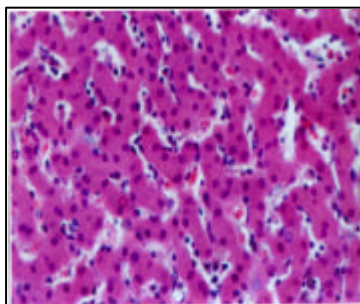


Figura 5. Cão assintomático. Fígado. Hiperplasia de células de Kupffer. H-E. 40x.

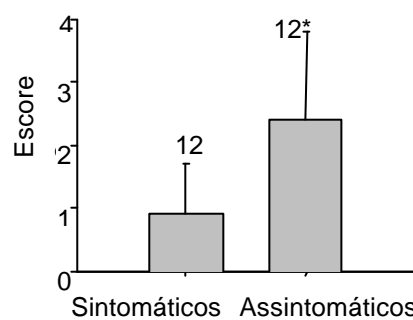


Figura 6. Cão. Fígado. Hiperplasia das células de Kupffer, \*p=0.0035 (Teste Mann Whitney).

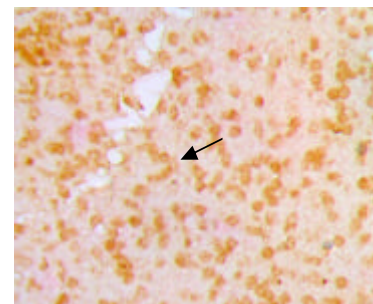


Figura 7. Cão. Linfonodo. Detecção de células TCD4+ (→). Imunoperoxidase. 40x.

## Discussão

No presente estudo, foi observado, no geral, que havia clara diferença da resposta inflamatória dos órgãos analisados entre animais sintomáticos e assintomáticos. Em linfonodo havia diferença significativa relativa à depleção de folículos linfóides, de células da região paracortical, hiperplasia de folículos e hiperplasia de células do seio medular, diferindo do estudo realizado por Lima et al (2004) que não encontraram diferenças em relação a esses parâmetros. As depleções de folículos e de células da região paracortical, observadas no grupo G2, mostraram a importância efetiva das células T CD4+ na modulação da infecção por *Leishmania (L.) chagasi*, uma vez que essas células

encontram-se associadas à ativação da resposta Th1 (SLAPPENDEL, 1988; BOURDOISEAU et al, 1997).

Muito embora o padrão da resposta Th na LVC não esteja muito bem estabelecido, os parâmetros imunológicos mostram que em cães a resistência a infecção está associada ao desenvolvimento do perfil Th1 (imunidade celular), com a produção de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (PINELLI et al., 1994). A suscetibilidade está correlacionada com altos níveis de anticorpos e ausência de resposta mediada por células, sem detectável resposta Th2. A imunossupressão é uma consequência, em parte, da diminuição de células T CD4+ (PINELLI et al., 1994; QUINELL et al., 2001; SILVA, 2007).

Além das células CD4+Th1, as células TCD8+ parecem estar envolvidas com a resistência a infecção na LVC (BARBIERI, 2006). Estudos usando camundongos atímicos BALB/c (nu/nu) e experimentos de depleção de células em camundongos BALB/c (nu/+) utilizando anticorpos monoclonais anti-CD4+ ou anti-CD8+, mostraram a necessidade de ambas as células, TCD4+ e TCD8+, na proteção contra a infecção por *L. donovani* (STERN et al, 1988). Na fase inicial da infecção, camundongos infectados por *L. donovani* mostraram que células L3T4+(CD4+) são importantes, quando o parasita está ocorrendo, principalmente, com a formação de granulomas hepáticos. Com a evolução da infecção, a população de células decresce e é substituída por células Lyt-2+(CD8+), quando o processo infeccioso é controlado (McELRATH et al, 1988).

O papel protetor das células TCD8+ na LVC sugere que a migração preferencial dessas células possa ocorrer no baço parasitado, com o objetivo de promover a lise de macrófagos infectados (REIS, 2001). Nós não observamos esse comportamento em linfonodos, pois além de não haver diferença entre G1 e G2, os animais sintomáticos apresentavam uma mobilização maior de células TCD8+, com maior evidência em cães com carga parasitária intensa. Isso parece um tanto contraditório, pois teoricamente animais que possuem uma participação maior dessas células deveriam controlar a infecção. O que pode explicar tal fato é que a ativação das células TCD8+, também, pode ser desencadeada por células TCD4+, particularmente do perfil Th1 (ABBAS et al., 2000) e, conforme a análise histopatológica, os animais sintomáticos apresentavam depleção dessas células protetoras.

Constatou-se, também, que o maior número de marcadores histopatológicos, que podem ser tomados como padrão para distinção entre animais sintomáticos e assintomáticos, encontravam-se no linfonodo poplíteo quando comparado ao fígado. Neste aspecto, destacamos que este órgão pode ser facilmente examinado por meio de biópsia.

No fígado, a análise histopatológica revelou alterações semelhantes as observações de Tafuri (2001). No entanto, hiperplasia das células de Kupffer foi maior nos animais assintomáticos e granuloma intralobular maior em animais sintomáticos, sendo que em alguns casos havia formações granulomatosas na região centrolobular e periportal. Estudos realizados em camundongos BALB/c infectados por *Leishmania donovani*, mostraram que a formação de granuloma é órgão-específico (MURRAY, 2001) e nem sempre está associado com o controle da infecção (LEMONS et al., 2000). É o que parece acontecer no cão, pois nos animais assintomáticos havia presença de poucos granulomas no fígado e em linfonodos, granulomas estavam presentes tanto nos animais sintomáticos quanto assintomáticos, sem diferença significativa.

Para alguns autores a infecção hepática é autolimitante e a resposta imune hepática é um bom exemplo de resposta inflamatória granulomatosa, predominada por células mononucleares envolvendo células de Kupffer, monócitos, células TCD4+ e TCD8+ (ENGWERDA et al., 2004). Estudos realizados na Venezuela demonstraram que animais assintomáticos apresentavam imunidade efetiva com formação de granulomas bem organizados, restringindo os parasitas em um ambiente central de células T de memória, e ativando células T efetoras, células dendríticas e células que expressavam CD18+ e CD44+. No entanto, no presente estudo, o fígado dos animais sintomáticos apresentavam infiltrado celular desorganizado composto por células T e células de Kupffer densamente parasitadas. Embora haja relato de diferença na proporção e distribuição de células imunocompetentes no fígado por imunoistoquímica (SANCHEZ et al., 2004), em nosso estudo, não observamos diferença entre a população de células CD4+ e CD8+ nos grupos G1 e G2.

## **Conclusão**

Conclui-se que a análise do linfonodo poplíteo apresenta marcadores histopatológicos que permitem distinguir um animal sintomático de um assintomático, com participação importante de células T CD4+ e CD8+.

## **Referências Bibliográficas**

1. LAINSON, R.; SHAW, JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Lainson R, Shaw JJ. **The leishmaniasis**. London: Academic Press; p.1-120, 1987
2. BRANDONISIO, O.; CARELLI, G.; ALTAMURA M.; VARVARA, B.; CECI, L. Circulating immune complexes and autoantibodies in canine leishmaniasis. **Parasitologia**, v. 32, p.275-281, 1990
3. LAINSON,R.; SHAW, J. J. E rief history of the genes Leishmania (Prtozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência e Cultura** (J. Braz. Assoc. Advac. Sci.), v. 44, n. 2/3, 1992
4. TAFURI, W.L.; OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, 96: 203-212, 2001
5. LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta tropica**, 92: 43-53, 2004
6. PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BENADINA, W.; DELREAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infectious Immunology**, 62: 229-235, 1994
7. ABBAS, A. B. et al. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000. A553p

8. BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 329-337, 2006
9. SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. **Veterinary Quarterly**, v. 10, p. 1-16, 1988
10. BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; MAGNOL, J.P.; SAINT-ANDRE, I.; CHABANNE, L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 56: 345-351, 1997
11. QUINNEL, R.J.; COURTNAY, O.; SHAW, M.; DAY, M.J.; GARCEZ, L.M.; DYE, C. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Disease**, 183: 1421-1424, 2001
12. SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista tropica – Ciências Agrárias e Biológicas**. V. 1, n. 1, p. 20-31, 2007
13. STERN, J. J. et al. Role of L3T4+ e Lyt-2+ cells in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 140, p. 3971-3977, 1988
14. McELRATH, M. J. et al. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis, **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, n. 6, p. 1927-1937, 1988
15. REIS, A. B. Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção. 2001. 180 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte
16. MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure – function in experimental visceral leishmaniasis. **Int. J. Exp. Pathol**, vol. 82:249-267, 2001
17. LEMOS et al. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological response in CBA. Mice. **Microbes and infection**, v. 15: 1807-1815, 2000
18. ENGWERDA, C. R. et al. Macrophages, pathology and parasite persistence i experimental visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 11, p. 524-530, 2004
19. SANCHEZ, M .A et al. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 6, p. 618-624, 2004
20. DUARTE, M. I. & CORBETT, C. E. P. Histopathological patterns of the liver involvement in visceral leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 29(3):131-136, 1987