

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CELULAR E  
IMUNODETECÇÃO DE MIF EM LINFONODOS DE CÃES  
COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

**Marcio de Barros Bandarra**

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CELULAR E  
IMUNODETECÇÃO DE MIF EM LINFONODOS DE CÃES  
COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

**Marcio de Barros Bandarra**

**Orientadora: Profa. Ass. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

JABOTICABAL – SP

Agosto - 2010

***“Na viagem pela vida não existem caminhos planos: todos são subidas ou descidas. “***

**Arturo Graf**

**Aos meus pais Enio e Sandra:  
Vocês são meu porto, meu tudo.  
Este trabalho dedico a vocês.**

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Rosemeri de Oliveira Vasconcelos. Você esteve sempre ali do nosso lado, dando conselhos, nos ajudando de todas as formas, nos ensinando a cada dia. Paciente e carinhosa nos momentos difíceis e nos fáceis também.

Você é com certeza, uma grande maetrina, uma grande amiga, e sem duvidas se tornou minha mãe científica, já que a senhora é uma das responsáveis pela minha formação acadêmica.

Aos meus pais, que sempre estiveram do meu lado, incentivando e permitindo que este trabalho e este sonho fossem concretizados. Com certeza sem vocês nada disso seria possível. Obrigado por participarem de cada momento, pelo apoio incondicional e por ser sempre meu porto seguro. Vocês são meu tudo.

Aos meus irmãos, os quais sempre estavam torcendo, cobrando, e com certeza ajudando em todos os momentos difíceis, me encorajando e incentivando neste caminho. Amo vocês.

A minha tia-mãe Herminia Gomes, a qual é imprescindível em todas as fases da minha vida, uma das pessoas que me ensinou a viver e ser homem. Mimi te amo muito. Obrigado.

A Regiane Taize Fantin e ao meu filho Guilherme Davi Fantin Bandarra, pela paciência, colaboração e ajuda indispensáveis neste período da minha vida. Amo vocês.

Ao Professor Danísio Prado Munari, pelo apoio e ajuda indispensáveis durante todo o período do mestrado e com certeza com a colaboração na realização deste trabalho.

A Professora e amiga Renée, que além de eu ser fã é uma das responsáveis pela minha formação acadêmica, sempre um espelho pessoal e profissional, uma amiga que sempre estendeu sua mão para ajudar.

Renée muito obrigado por participar destes momentos especiais em minha vida.

A professora e amiga Giovana Wingeter, uma grande amiga e também responsável pela minha formação profissional e pessoal, desde as conversas durante a residência, assim como as conversas durante o meu estágio na UEL. A conclusão de minha monografia e orientação da mesma foi indispensável para que eu crescesse. Gi obrigado por sempre me ajudar e aconselhar.

Aos meus amigos irmãos da Republica Antro do HV, Beto, Pedro Paulo, Viçosa, Lingüiça, Marcus, Luis Guilherme, Miguel, Dedo, Leandro Zaine, André, Evandro, Diogo, Daniel Bozo, João Paulo, os quais com certeza tornavam os meus dias mais fáceis, mais alegres com o companheirismo, amizade e a alegria da casa. Obrigado a todos.

A minha namorada Ana Beatriz Garcia Faitarone, pessoa especial que me ajudou e sempre aconselhou durante todo este tempo, e com certeza deixou todos os momentos mais fáceis e felizes.

A Katrina, pessoa fundamental no dia a dia, cuidando não só das minhas coisas mas também de mim.

A minha grande amiga Pamela Rodrigues Reinna Moreira, pelo companheirismo, amizade dispensada nesses dois anos, também pela sua paciência, risadas. Com certeza tornou meu mestrado mais feliz pelas inúmeras risadas momentos felizes. Obrigado pela dedicação.

Aos meus companheiros e companheiras de mestrado, com certeza vocês colaboraram muito com esta realização e tornaram tudo mais fácil.

A todos os professores do Departamento de Patologia Animal da FCAV-UNESP, pelas colaborações, ensinamentos, conselhos e com certeza as ajudas. Aqui meu agradecimento.

Aos funcionários do departamento de Patologia Animal da FCAV UNESP, Téo, Edgar, Chica, Moema e Cris, que sem duvida tornaram os dias de trabalhos mais felizes e sempre se mostraram dispostos a ajudar. Obrigado.

Aos Amigos que fiz aqui em Jaboticabal, sem exceção, pelos dias felizes e pelo companheirismo nesta fase.

E a todos aqueles que fizeram ou fazem parte de minha vida e que certamente de alguma forma colaboraram para a conclusão deste trabalho.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MARCIO DE BARROS BANDARRA** – nascido em 13 de janeiro de 1983, na cidade de Botucatu, São Paulo. Médico Veterinário formado em dezembro de 2006, no Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos - UNIFEOB, em São João da Boa Vista - SP. Durante o curso de graduação, foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) Pesquisa, na modalidade de Iniciação Científica, no período de fevereiro de 2005 a novembro de 2006, sob a orientação do Prof. Dr. Enio Pedone Bandarra, na área de Patologia Veterinária. Realizou monitoria junto a disciplina de Patologia Veterinária no período de março de 2004 a junho de 2006. No período de 01 de março de 2007 a 28 de fevereiro de 2008, cursou Residência Médica na área de Patologia Animal, na Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB), sob orientação do Prof. Helder Esteves Thomé. Em agosto de 2008, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Mestrado, área de concentração em Patologia Animal), na FCAV - UNESP, Campus de Jaboticabal, sob a orientação da Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos. Em maio de 2010 foi aprovado para cursar o Doutorado no mesmo programa de pós-graduação e com a mesma orientadora.



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
I. INTRODUÇÃO.....	01
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 A resposta imune e a linfadenopatia na Leishmaniose Visceral Canina (LVC).....	03
2.2 Fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) na modulação de macrófagos .....	05
III. OBJETIVOS.....	08
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	09
4.1 Animais.....	09
4.2 Colheita de material.....	09
4.3 Análise histopatológica.....	10
4.4 Análise imuno-histoquímica.....	11
4.5 Análise estatística.....	12
V. RESULTADOS.....	14
5.1 Análise anatomopatológica.....	14
5.2 Análise em microscopia de luz.....	14
5.3 Análise imuno-histoquímica.....	22
VI. Discussão.....	29
VII. Conclusão.....	36
VIII. Referencias.....	37
Anexos.....	45

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>FIGURA 1</b> - Fotomicrografia de linfonodo de cão com Leishmaniose Visceral (grupo sintomático). (A) Atrofia linfóide acentuada (setas), associada a intensa reação granulomatosa (□). No detalhe observa-se predominância de macrófagos no granuloma do linfonodo poplíteo. (B) Atrofia linfóide (setas) associada a intensa reação granulomatosa (□/ linfonodo subescapular). No detalhe nota-se macrófagos e linfócitos (setas) compondo o granuloma. Hematoxilina e Eosina. Obj. 4x.....	17
<b>FIGURA 2</b> - (A) Proporção de escore dos tipos celulares (Plasmócitos e macrófagos) no linfonodo poplíteo dos grupos de cães infectados para LVC (A = assintomático, O = oligossintomático e S= sintomático), observados no infiltrado celular (plasmócito e macrófago). Escores de intensidade de infiltrado celular: sem alteração (0), discreta (1), moderada (2) e acentuada (3) para os tipos celulares macrófago e plasmócitos. (B) Proporção de escores para a reatividade linfóide: (0) atrofia linfóide, (1) não reativo, (2) discreta reatividade, (3) moderada reatividade, (4) acentuada reatividade linfóide.....	19
<b>FIGURA 3</b> - Proporção de escore celular de macrófagos (1 = discreto; 2 = moderado; 3 = acentuado) no linfonodo subescapular dos grupos de cães infectados para LVC (A = assintomático, O = oligossintomático e S= sintomático). Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).....	21
<b>FIGURA 4</b> - Fotomicrografia de linfonodo de cão com Leishmaniose Visceral (grupo sintomático). (A) Imunodeteccção de <i>Leishmania sp.</i> em macrófagos da região capsular (seta) e cortical (*). (B) Presença de <i>Leishmania sp.</i> em macrófagos da região medular (setas). Complexo de polímero ligado a peroxidase (Obj. de 40x).....	23
<b>FIGURA 5</b> - Médias e respectivos desvios-padrão para a característica carga parasitária por grupo de cães infectados (S = sintomático; O = oligossintomático e A = assintomático), nos linfonodos poplíteo (a) e subescapular (b). Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Tukey (P<0,05).....	24

**FIGURA 6** - Figura 6 - Fotomicrografia de linfonodo de cão com Leishmaniose Visceral (grupo sintomático). (A) Padrão de imunomarcção de MIF em linfonodo poplíteo (\*/Obj. 4x). (A1) Detalhe da intensidade de marcação em macrófagos parasitados. (A2) Controle negativo para imudeteção de MIF. (B) Reação granulomatosa em linfonodo poplíteo positiva para MIF (\*). (B1) Reação granulomatosa em linfonodo subescapular negativa para MIF (\*/Obj. 40x). Complexo de polímero ligado a peroxidase. ....

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
<b>TABELA 1</b> – Comparação entre médias de densidade de macrófagos imunomarcados com MIF por grupo de cães com Leishmaniose Visceral.....	27
<b>ANEXO 1</b> Média transformada em raiz quadrada e média geral com seus respectivos coeficientes de variação da densidade de macrófagos imunomarcados com MIF em cães com Leishmaniose Visceral.....	45

## ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CELULAR E IMUNODETECÇÃO DE MIF EM LINFONODOS DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

**RESUMO** - A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose de interesse em saúde pública e o cão é o principal reservatório doméstico de *Leishmania chagasi*. Este protozoário modula a resposta imune do hospedeiro. A citocina MIF favorece a permanência do macrófago no sítio da injúria e protege-o da apoptose. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de MIF nos linfonodos de cães com LV, comparando estes achados com a densidade de macrófagos parasitados nos linfonodos e com o estadiamento clínico dos cães. Neste estudo utilizou-se 33 cães oriundos de Araçatuba, município endêmico para a LV. Os cães foram distribuídos nos grupos assintomático (A), oligossintomático (O) e sintomático (S). As alterações morfológicas dos linfonodos poplíteo, subescapular, ilíaco e mesentérico foram avaliadas quanto ao perfil celular, determinado por escores. A carga parasitária e a imunodeteção de MIF foi feita pela técnica de imuno-histoquímica. Nos cães dos grupos com sinais clínicos (O e S), as reações inflamatória granulomatosa e plasmocitária foram predominantes. No grupo S, a atrofia linfóide predominou e associou-se ao maior número de granulomas e a maior carga parasitária. A densidade de parasitos nos linfonodos periféricos diferiu significativamente do grupo S para os demais grupos ( $P < 0,05$ ). A densidade de macrófagos imunomarcados com MIF foi maior no grupo S e apresentou uma correlação significativa com a carga parasitária no linfonodo poplíteo ( $P < 0,05$ ). Conclui-se que macrófagos são uma das células mais envolvidas na resposta ao parasito. O protozoário utiliza MIF para manter o macrófago no sítio de infecção, favorecendo a sua sobrevivência no hospedeiro.

**Palavras-Chave:** MIF, cão, carga parasitária, *Leishmania chagasi*, linfonodos, resposta imune.

## **Analysis of cell composition and MIF immunodetection in lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis**

**ABSTRACT** – Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonotic disease critical for the public health and the dog is the main *Leishmania chagasi*'s domestic reservoir. This protozoan modulates the immune response of the host. The MIF cytokine facilitates the permanence of the macrophage in the site of injury and protects it from apoptosis. The aim of this study was to evaluate the MIF presence in the lymph nodes of dogs with VL, comparing these findings with the parasite density in the lymph nodes and with the clinical outcome of the dogs. Thirty three dogs from Araçatuba, an endemic city for VL, were used in this study. Dogs were distributed in the asymptomatic (A), oligosymptomatic (O) and symptomatic (S) groups. The cellular profile of the morphologic changes of the popliteal, subscapular, iliac and mesenteric lymph nodes were evaluated and scored. Immunohistochemistry did the parasite load and the MIF immunodetection technique. Granulomatous and plasmocitary inflammatory reaction predominated in the groups with clinical signs (O and S). In the S group, lymphoid atrophy predominated and was associated with high number of granulomas and high parasite load. Comparing the groups, the density of the parasites in the peripheral lymph nodes was significantly different for the S group ( $P<0.05$ ). The density of the immunolabeling MIF macrophages was higher in the S group and had a significant positive correlation with the parasite load in the popliteal lymph node ( $P<0.05$ ). In conclusion, the macrophages are the most involved cells, and the protozoan uses the MIF to keep the macrophage in the infection site, helping its survival in the host.

**Key words:** MIF, dog, parasite load, *Leishmania chagasi*, lymph nodes, immune response

## I. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma zoonose causada por um protozoário do gênero *Leishmania* e pode produzir manifestações cutâneas, muco-cutâneas e viscerais, de acordo com a espécie envolvida. Esta zoonose está entre as endemias consideradas de controle prioritário no mundo, com duas formas de apresentação clínica, a Leishmaniose Tegumentar (LT) e a Leishmaniose Visceral (LV), também chamada LV Americana, Calazar ou Calazar Neotropical. Esta enfermidade é uma doença debilitante e freqüentemente fatal, causada pelo protozoário do complexo *Leishmania donovani*. No continente Americano esta doença apresenta altos índices de infecção nas populações humana e canina e já foi descrita em pelo menos 12 países. Cerca de 90% dos casos ocorrem no Brasil. Tem grande incidência na região nordeste, mas devido ao processo de expansão geográfica, vem sendo descrita em vários municípios de todas as regiões do Brasil. No continente americano a forma visceral é de evolução crônica, tendo como agente causador a *Leishmania (Leishmania) chagasi*. O vetor do protozoário para o homem e animais no Brasil é o mosquito *Lutzomyia longipalpis*, mas *Lutzomyia cruzi* foi também incriminado como vetor no estado de Mato Grosso do Sul. Este mosquito está bem adaptado ao ambiente peridomiciliar, alimentando-se em uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, entre aves, homem e outros animais silvestres e domésticos. Os cães são considerados os principais reservatórios domésticos do protozoário. Eles são importantes na manutenção do ciclo epidemiológico da doença, porque LV é mais prevalente na população canina que na humana. O alto índice da infecção humana também se relaciona ao fato de que cães, independentemente da gravidade dos sinais clínicos, tem um elevado número de formas amastigotas do parasito na pele, favorecendo a infecção do vetor.

O ciclo evolutivo de *L. (L.) chagasi* apresenta as formas promastigota (forma que se desenvolve no intestino do inseto vetor) e amastigota (forma que se

desenvolve no interior de macrófagos do hospedeiro vertebrado). Nos macrófagos do hospedeiro vertebrado, os parasitos multiplicam-se, infectam outras células e se disseminam para vários órgãos, inclusive a pele, onde são novamente fagocitados, tornando-se disponíveis para o vetor durante seu repasto sanguíneo.

Nos cães os sinais clínicos mais freqüentes são linfadenomegalia, onicogribose, lesões de pele, caquexia, anormalidades locomotoras, lesões oculares, anorexia, diarreia, epistaxe e falência renal. A gravidade destas manifestações clínicas está diretamente relacionada à capacidade do sistema imune do cão de responder ao protozoário. Cães que conseguem desenvolver uma resposta do tipo celular podem dificultar a multiplicação do protozoário em seus tecidos. Já aqueles animais que respondem com uma resposta predominantemente humoral geralmente mostram as lesões mais exuberantes e uma maior carga parasitária. Além disso, também possuem altos títulos de anticorpos circulantes, que são inespecíficos e não protetores, ao mesmo tempo em que agravam as lesões em vários órgãos, tais como, os rins, devido à deposição de complexos imunes.

Os macrófagos são o alvo principal do protozoário *Leishmania*, para sua multiplicação e disseminação pelo organismo do hospedeiro. Alguns estudos paralelos, com nosso grupo de pesquisa mostraram que a atividade microbicida do macrófago pode estar inibida, devido a reduzida expressão da enzima iNOS, que é precursora do óxido nítrico, um potente agente microbicida presente no fagolisossomo do macrófago. Observou-se também que a expressão de moléculas de MHC-II está reduzida ou ausente em macrófagos dos granulomas causados por *Leishmania* em cães naturalmente infectados. Portanto surgiu o interesse de avaliar a atividade da citocina MIF nestes animais, pois na literatura salienta-se sua ação na manutenção do macrófago no foco de injúria tecidual e na proteção desta célula da apoptose. A presença de MIF em animais infectados pode sugerir um mecanismo de evasão imune induzido pelo parasito, para favorecer a sua sobrevivência no hospedeiro.



## II. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A resposta imune e a linfadenopatia na Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

A LVC pode ser considerada uma doença imunomediada, já que o parasito tem capacidade para modificar o sistema imunológico do hospedeiro (SLAPPENDEL e FERRER, 1990).

Cães susceptíveis possuem lesões mais exuberantes e isso se deve a capacidade de desenvolver resposta de linfócitos T helper tipo 2 (Th2), com proliferação de células B e produção de interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10), que irão promover uma plasmocitose. Esta resposta humoral leva a hipergamaglobulinemia e contribui para a formação de imunocomplexos. Já a resistência à infecção (animais assintomáticos), dependerá da resposta Th1, a qual está associada à produção de citocinas como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12, além de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (GOTO e LINDOSO, 2004; BARBIÉRI, 2006).

O principal mecanismo efetor envolvido na resposta imune protetora de cães infectados com *L. infantum* é a ativação de macrófagos por INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  para destruir amastigotas intracelulares via L-arginina e a síntese de óxido-nítrico. Esse fato pode ser observado no tratamento quimioterápico de cães infectados por *L. infantum* (BARBIÉRI, 2006). Interleucina-6 (IL-6) é uma citocina multifuncional, com atividade biológica principalmente na indução da diferenciação das células B e na ativação das células T. Em mamíferos, a IL-6 tem sido implicada no desenvolvimento de ambas as respostas Th1 e Th2 (ABBAS et al., 2008). A produção de IL-6 aumenta no soro de cães com leishmaniose visceral e este parâmetro pode ser um marcador para a doença ativa (LIMA et al., 2007).

Macrófagos, células dendríticas, linfócitos, citocinas como INF- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  e fatores de transcrição como o fator de regulação de interferon-1 (IRF-1), são cruciais para a resolução de infecções com todas as espécies de *Leishmania* e para uma imunidade protetora longa (BOGDAN e ROLLINGHOFF, 1998).

O aumento de volume generalizado dos linfonodos periféricos é um aspecto importante da LVC (LIMA et al., 2004; BRASIL, 2006; GIUNCHETTI et al.; 2008). Nos linfonodos as alterações citológicas mais comuns são descritas em cães sintomáticos, sendo observado mais comumente a hiperplasia reativa do linfonodo. Em cães sintomáticos, as principais células encontradas são plasmócitos seguidos de macrófagos e neutrófilos. A presença de plasmócitos é esperada, devido à ativação policlonal e proliferação de linfócitos B, que induzem a um aumento dessas células na cortical, no centro germinativo e nos cordões medulares dos linfonodos (MYLONAKIS et al. 2005).

Em relatos prévios sobre alterações morfológicas nos linfonodos de cães com LV, descreve-se um aumento de volume de folículos linfóides da cortical e hiperplasia e reatividade de macrófagos na medular do linfonodo. Não se encontrou correlação desses achados com a intensidade da carga parasitária ou com o estadiamento clínico dos cães sintomáticos ou assintomáticos (LIMA et al., 2004). Estas alterações resultam em uma linfadenopatia generalizada em mais de 90% dos casos. Nesse caso, os linfonodos lesados têm um aspecto exsudativo inicial e evoluem gradativamente para um aspecto proliferativo (MARZOCHI et al., 1985; NUNES et al., 2001). Os linfonodos destes cães geralmente apresentavam linfadenite crônica, caracterizadas por infiltrado inflamatório composto por macrófagos, plasmócitos e linfócitos. Além de hiperplasia folicular da cortical, hipertrofia e hiperplasia dos macrófagos nos sinusóides e cordões medulares, congestão, hemossiderose e presença de formas amastigotas do protozoário dentro de macrófagos (LIMA et al., 2004).

Na análise histológica de linfonodos de animais assintomáticos é descrita uma prevalência de reatividade linfóide na zona cortical e nos cordões da zona medular. Nos cães sintomáticos, o aspecto mais marcante é a atrofia da região cortical (GIUNCHETTI et al., 2008; REIS et al., 2009).

## 2.2 Fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) na modulação de macrófagos

O fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF) foi a primeira linfocina descoberta em 1966, quando foi demonstrado que linfócitos estimulados por antígenos, produziam um fator solúvel que inibia a migração de macrófagos *in vitro*. Sobrenadantes contendo MIF provenientes de linfócitos estimulados demonstraram subseqüentemente alterar a função de macrófagos e aumentar a morte de microorganismos e células tumorais (WEISER et al. 2006).

MIF é uma citocina de estrutura única (12.5kDa) e é um mediador crítico de doenças inflamatórias agudas e crônicas, tais como, choque séptico, artrites reumatóides, arterioesclerose e câncer (MITCHELL e BUCALA, 2000; MORAND et al. 2006; CALANDRA e ROGER, 2003). Esta citocina é produzida por células T ativadas (ABBAS et al., 2008), macrófagos e células da glândula pituitária (JÜTTNER et al., 1998). Uma das suas principais funções é imobilizar fagócitos mononucleares, retendo estas células no local da inflamação, embora esta atividade fisiológica ainda não esteja bem definida (ABBAS et al., 2008).

Esta citocina pró-inflamatória é um importante ativador da resposta inata por ligar-se a receptores CD74, expressos na superfície de células apresentadoras de antígenos (monócitos e linfócitos B). Este processo resulta na ativação dos macrófagos, que leva a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1, prostaglandina E2. Os macrófagos ativados por MIF são mais eficientes na destruição de patógenos intracelulares. Da mesma forma a interação entre MIF e os receptores CD74 e CD44 resulta na sobrevivência de linfócitos B pela supressão da apoptose. Esses fatos fazem de MIF uma ponte entre as respostas imunes inata e adaptativa (KAMIR et al., 2008).

MIF pode atuar como um contra-regulador da resposta antiinflamatória e imunossupressora de glicocorticóides (CALANDRA e BUCALA, 1995) e induzir a

liberação de óxido nítrico em macrófagos ativados. Além de ser um ativador da imunidade inata, que protege os monócitos/macrófagos da apoptose (CALANDRA e ROGER, 2003). Foi comprovada também a sua atividade na morte de formas amastigotas intracelulares nos macrófagos com *Leishmania major*, em associação ou não com IFN- $\gamma$  (JÜTTNER et al., 1998).

A elucidação do genoma da *Leishmania major* revelou dois genes que apresentam identidade de seqüência significativa com a citocina MIF de mamíferos (IVENS, 2005). Eucariontes primitivos codificam genes de MIF que mostram similaridade notável com o de mamíferos, como os parasitos nematóides humanos *Brugia malayi* e *Ancylostoma ceylonicum*, bem como o carrapato *Amblyomma americanum*, vetor da anaplasmoze, que produzem um ortólogo de MIF (PASTRANA et al. 1998; CHO et al. 2007; JAWORSKI et al. 2001).

A produção de MIF também foi relatada em *Eimeria*, *Trichinella* e *Plasmodium*. Talvez esta citocina ortóloga desempenhe um papel importante na interação parasito-hospedeiro (MISKA et al. 2007; WU et al. 2003; CORDERY et al. 2007; AUGUSTIJN et al. 2007). O papel endógeno de MIF já foi avaliado também em infecções causadas por protozoários, tais como, *Trypanosoma cruzi* (REYES et al., 2006), na leishmaniose cutânea experimental em camundongos inoculados com *Leishmania major* (JÜNTNER et al., 1998; SATOSKAR et al., 2001) e em pacientes humanos com leishmaniose visceral (BIMAL et al., 2005).

A clonagem de ortólogos de MIF de *L. major* e a caracterização funcional do ortólogo Lm1740MIF deste parasito mostraram que há 22% de identidade desta seqüência com a do MIF humano. Lm1740MIF interage com o receptor CD74 de MIF e apresenta uma atividade anti-apoptótica, que pode facilitar a persistência de *Leishmania* em macrófagos (KAMIR et al., 2008). A citocina MIF pode atuar no aumento da sobrevivência e manutenção da função de macrófagos pela supressão da apoptose p53-dependente. Camundongos “knockout” para MIF, desafiados com LPS, apresentaram redução da viabilidade de macrófagos, aumento da apoptose e diminuição da função pró-inflamatória (MITCHELL et al., 2002). Contraditoriamente, na infecção experimental por *Leishmania major* em camundongos deficientes em MIF<sup>-/-</sup>, o desenvolvimento de lesões cutâneas foi

mais grave, a produção de óxido nítrico foi inibida e houve maior carga parasitária, quando comparados à mesma linhagem MIF+/+ (SATOSKAR et al., 2001).

Estudos com MIF recombinante de *L. major*, identificaram dois tipos desta citocina com arquitetura similar a de mamíferos, mas com alguns aspectos estruturais distintos. Uma delas foi encontrada em todos os estágios do ciclo de *L. major* (MIF2), já a outra é exclusiva de formas amastigotas (MIF1). É sugerido então que MIF parasitário modula a resposta macrofágica do hospedeiro, promovendo a sobrevivência do parasito, talvez com a participação de MIF1 nesta modulação (RICHARDSON et. al, 2009).

Tendo em vista a importância relevante para a saúde pública dos cães no ciclo e na transmissão da *Leishmania*, bem como, da capacidade deste parasito de modular a resposta imune do hospedeiro vertebrado ao seu favor, por meio da inibição da atividade microbicida e da capacidade de apresentação antigênica dos macrófagos, faz-se necessário o estudo das alterações dos linfonodos associadas à expressão da citocina MIF. Em relatos da literatura científica, comprovou-se a capacidade de MIF de ativar macrófagos e protege-los de mecanismos de morte celular, durante o processamento antigênico. Portanto, fica evidente que parasitos, incluindo algumas espécies de *Leishmania*, utilizam MIF como uma ferramenta na modulação da resposta imune do hospedeiro. Como existem divergências entre os resultados em camundongos e nenhum estudo foi feito com *Leishmania chagasi* em nenhuma espécie de hospedeiro natural, o estudo do comportamento de MIF na infecção espontânea em cães pode contribuir para a compreensão da complexa patogenia da LVC.

### III. OBJETIVOS

Os objetivos gerais do presente estudo foi avaliar a presença de MIF em linfonodos periféricos e cavitários de cães com Leishmaniose Visceral.

Os objetivos específicos foram:

- Comparar o perfil celular nos diferentes linfonodos;
- Comparar o perfil celular com a densidade de células parasitadas nos diferentes linfonodos estudados;
- Relacionar a imunomarcção de MIF entre diferentes linfonodos;
- Comparar a densidade de células positivas para MIF com a de células parasitadas e com o estadiamento clínico dos cães;
- Associar a presença de MIF com o perfil celular nos diferentes linfonodos estudados.

## IV. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram avaliados 33 cães submetidos à eutanásia no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Araçatuba (SP), com diagnóstico positivo para LVC. Avaliou-se uma amostra desta população canina, sem predileção por sexo, raça ou idade.

A eutanásia de animais com LVC foi feita em cumprimento ao Decreto no. 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose devam ser submetidos à eutanásia. O método de eutanásia empregado seguiu as recomendações da Resolução nº. 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, com indução anestésica com barbitúrico (Tiopental, Cristália Itapira, SP), seguida da administração de uma ampola de cloreto de potássio 19,1%, por via intravenosa.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal da FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal (CEBEA Protocolo nº. 0020676-08).

### 4.2 Colheita de material

A necropsia foi realizada imediatamente após o óbito dos cães e no exame externo dos cadáveres foram avaliadas as alterações macroscópicas que permitiram classificá-los nos grupos deste estudo. A classificação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006) foi considerada para formação dos grupos: cães sintomáticos (lesões de pele, onicogrifose, emagrecimento), oligossintomáticos (linfadenomegalia e perda de peso) e assintomáticos (ausência de sinais clínicos sugestivos de infecção por *Leishmania*).

Linfonodos de cães hígidos foram utilizados para a composição do grupo controle para a imunodeteção de MIF, estes linfonodos foram oriundos da rotina do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP, do Campus de Jaboticabal, região não endêmica para LVC.

Os órgãos colhidos foram submetidos à análise histopatológica e imuno-histoquímica.

### **4.3 Análise histopatológica**

Foram colhidos fragmentos de linfonodos periféricos (poplíteo, subescapular) e cavitários (mesentéricos e ílfacos), para análise em microscopia de luz. Os linfonodos foram selecionados de regiões superficiais e profundas para avaliar se há o mesmo padrão de resposta celular, quando comparado ao estágio clínico da doença nos cães.

Os fragmentos dos linfonodos foram fixados em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos, com pH 7,2. Após 24 horas de fixação, os fragmentos foram desidratados em soluções de concentração decrescente de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os cortes foram feitos na espessura de 5µm e corados com hematoxilina e eosina, para posterior identificação das principais alterações morfológicas do linfonodo.

Foram avaliadas as alterações microscópicas presentes nos linfonodos poplíteo, subescapular, mesentérico e ílfaco, considerando a reação celular predominante (reatividade linfóide, granulomas, plasmocitose) e a intensidade das lesões foi graduada por escores: sem alterações (0), discreta (1), moderada (2) e acentuada (3) para os tipos celulares macrófagos e plasmócitos. Para os linfócitos considerou-se o seguinte escore: (0) atrofia linfóide, (1) não reativo, (2) discreta reatividade, (3) moderada reatividade, (4) acentuada reatividade linfóide.



#### 4.4 Análise imuno-histoquímica

A carga parasitária e a imunodeteção de MIF foram feitas em cortes dos linfonodos poplíteo, subescapular, mesentérico, ilíaco, incluídos em parafina, por meio da técnica de imuno-histoquímica. A técnica utilizada para a densidade parasitária seguiu o protocolo descrito por TAFURI et al. (2004), com modificações. De uma forma geral, as lâminas foram desparafinizadas em estufa 60°C por uma hora, seguida de banhos em xilol e álcool. Para a imunomarcação de *Leishmania* sp., a recuperação antigênica foi feita pelo calor, utilizando-se o banho-maria (Quimis, Cód. Q-304-160) na temperatura de 95°C, em solução tampão de citrato de sódio 10 mM (pH 6,0), por 30 minutos. Para MIF, utilizou-se também a recuperação pelo calor, com o mesmo tampão, porém em microondas, na potencia de 720W, em 3 banhos de 5 minutos cada.

Os passos seguintes foram similares para ambos os anticorpos. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio 30 volumes, adicionado ao álcool metílico, com concentração final da solução de 8%, com incubação de 20 minutos. Em seguida fez-se o bloqueio de proteínas inespecíficas com produto comercial (Protein Block, DAKO, cód. X0909), por 20 minutos, à temperatura ambiente. A incubação de ambos os anticorpos primários foi feita em câmara úmida, por 18 horas, na temperatura de 4°C. Para *Leishmania* sp. utilizou-se o soro<sup>1</sup> de cão positivo para Leishmaniose Visceral (diluição 1:1000). Para MIF, usou-se o anticorpo policlonal anti-MIF (FL-115), produzido em coelho (Santa Cruz, SC 20121) na diluição de 1:700. Como complexo secundário utilizou-se um polímero ligado a peroxidase (Kit Advance HRP, Dako, cód. K4068), segundo protocolo do fabricante. Para a revelação da reação utilizou-se o cromógeno diaminobenzidina (DAB, Dako, cód. K3468), por cerca de 3 minutos por lâmina.

---

<sup>1</sup> A soropositividade deste cão foi avaliada pela técnica de ELISA, com titulação de 1:40.000.

A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris por 30 segundos, com posterior lavagem em água corrente, seguida de desidratação em soluções crescentes de álcoois e xilol e montagem com Entellan (Merk, cód. HX888585).

Após a desparafinização e banhos em álcool, todos os passos foram precedidos por lavagem em água deionizada e solução tampão Tris HCL (pH 7,4). Como controle negativo optou-se por excluir o anticorpo primário da reação, para a imunomarcação do protozoário. Para o MIF optou-se por substituir o anticorpo primário por IgG de coelho (Dako), na diluição de 1:16000. Um aspecto desta reação pode ser visto na Figura 6A2.

Para a determinação da porcentagem de células imunomarcadas, consideraram-se cinco campos microscópicos, com objetiva de 40x, abrangendo todas as áreas anatômicas do linfonodo (cápsula, seio subcapsular, cortical e medular). A partir dos valores obtidos nestes campos, fez-se uma média do número de células imunomarcadas por animal. A média da carga parasitária e o número de células imunomarcadas para MIF foram avaliados em cada grupo de cães infectados (assintomático, oligossintomático e sintomático). Para a determinação da densidade de células MIF positivas optou-se por fotografar os cinco campos nos linfonodos estudados, no aumento de 400x e fez-se a contagem no programa de análise de imagens Micrometrics SE Premium.

#### **4.5 Análise estatística**

As contagens de células imunomarcadas para carga parasitária e anticorpo anti-MIF foram submetidas à análise de variância pelo método dos quadrados mínimos, utilizando o programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA). Foram verificadas as pressuposições de normalidade dos resíduos e homogeneidade de variâncias. Para atender estas pressuposições, os dados de carga parasitária foram submetidos à transformação logarítmica e as médias das contagens de MIF foram submetidas à transformação para raiz quadrada (Anexo

1). Para avaliar as diferenças das médias entre os grupos, foi proposto um modelo linear geral que incluiu o efeito de grupo (assintomático, oligossintomático, sintomático), sendo que para a densidade de células imunomarcadas por MIF foi incluído o grupo controle. A comparação de médias de carga parasitária por grupo, bem como das médias de macrófagos imunomarcados por MIF por grupo foram realizadas pelo Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Correlações simples de Pearson foram obtidas entre as médias das contagens de macrófagos imunomarcados com MIF e a carga parasitária para os linfonodos poplíteo e mesentérico por grupos de cães.

Os escores de tipo celular verificados no infiltrado inflamatório do linfonodo poplíteo foram avaliados por regressão logística, considerando o efeito de grupo. A comparação entre grupos para os escores foi feita pelo Teste de Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). Coeficientes de correlação de Spearman entre os escores de tipo celular foram obtidos por grupo para cada célula (macrófago, plasmócito e linfócito). Para o parâmetro tipo celular, nos demais linfonodos, além da regressão logística foi feito o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

## V. RESULTADOS

### 5.1 Análise anatomopatológica

Na análise macroscópica dos cães sintomáticos, durante a necropsia, as principais alterações observadas foram: conjuntivite, caquexia, onicogribose, áreas de alopecia, descamação e ulceração de pele com distribuição variada, principalmente na região de ouvido externo, região periocular e extremidade de membros, Na necropsia destes animais também foi observada linfadenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia e degeneração hepática.

Nos cães classificados como oligossintomáticos foi observado um aumento generalizado de linfonodos e em alguns animais deste grupo foram vistas algumas áreas de lesões cutâneas discretas (dermatite descamativa). Os animais que não apresentavam sinais clínicos evidentes foram classificados como assintomáticos.

Os achados anatomopatológicos mais frequentes foram o aumento de volume dos linfonodos periféricos, que ao corte apresentavam um aspecto edemaciado. Na região da cortical de muitos cães dos grupos assintomático e oligossintomático notaram-se áreas esbranquiçadas, que correspondia a hiperplasia linfóide. A hemossiderose foi observada nos animais dos grupos com manifestação clínica da doença e tinha uma coloração alaranjada (ferrugem) na superfície de corte da região medular.

### 5.2 Análise em microscopia de luz<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> Pamela Rodrigues Reina Moreira; Lais Mendes Vieira; Mariana Macedo Costa de Andrade; Marcio de Barros Bandarra; Gisele Fabrino Machado; Danísio Prado Munari; Rosemeri de Oliveira Vasconcelos Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitol. Res.**, 2010.

Os linfonodos analisados apresentaram algumas diferenças relacionadas à sua reatividade celular, referente a localização na carcaça do animal (periféricos e cavitários). Essas diferenças foram muito evidentes nos linfonodos periféricos poplíteo e subescapular. Nos linfonodos cavitários (ilíaco, mesentérico) esta reação celular foi pouco significativa. Devido a essa observação. Apenas os linfonodos periféricos foram avaliados quanto aos demais aspectos.

Na cápsula, o infiltrado celular tinha distribuição difusa a focal, com intensidade discreta a moderada. A composição celular predominante foi composta por infiltrado de plasmócitos e macrófagos, sendo que estes últimos muitas vezes formavam granulomas, com formas amastigotas do protozoário, visíveis somente nos casos de alta carga parasitária.

Na região subcapsular, a presença de macrófagos com hemossiderose e eritrofagocitose e, em algumas situações parasitados com formas amastigotas do protozoário, foram as células mais freqüentes. Em alguns animais com elevada carga parasitária notou-se a presença de granulomas nestes locais, que se estendiam até a região trabecular da cortical do linfonodo, atingindo a camada medular, desestruturando a arquitetura deste órgão linfóide.

Na região cortical, a reatividade linfóide variou de discreta a moderada (grupo assintomático) e, nos casos mais avançados de LVC houve atrofia linfóide (grupo sintomático), devido à invasão granulomatosa (Figura 1A e 1B). Nesses casos a observação de debris celulares e células com características de apoptose foi vista na cortical, tanto em nodo linfóide (composta por linfócitos B), como na região paracortical (linfócitos T).

O aspecto histológico dos granulomas foi de agregados de macrófagos reativos, por vezes associados a linfócitos e com carga parasitária intracitoplasmática variável. Estes granulomas distribuíam-se de forma focal a difusa, dependendo da intensidade do quadro clínico.

Os granulomas focais eram mais comuns e apareciam na região de transição córtico-medular e nos cordões da medular e em menor proporção na

cápsula e nos sinusóides. Nos casos mais avançados, em cães com elevada carga parasitária (grupo sintomático) foi possível observar a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp intracitoplasmáticas nestes macrófagos. Nestes casos a reação granulomatosa era difusa e atípica, composta por agregados de macrófagos, de aspecto reativo (citoplasma abundante e acidófilo), que raramente formavam células multinucleadas (células gigantes).



Estes granulomas invadiam a cortical do linfonodo e nestas situações sempre se observava atrofia linfóide. Na medular, estes granulomas distorciam a arquitetura dos cordões e sinusóides. A reatividade celular teve diferenças marcantes entre os linfonodos poplíteo e subescapular. No poplíteo foi mais marcante a presença de granulomas e a atrofia linfóide, já no subescapular a reatividade linfóide foi mais prevalente nos diferentes grupos de cães infectados. Da mesma forma o aspecto dos granulomas diferiu entre ambos os linfonodos. No poplíteo, o tipo celular predominante no granuloma foi o macrófago, com grau variado de parasitismo (Figura 1A – detalhe). Já no subescapular estes granulomas eram compostos por macrófagos e linfócitos (Figura 1B - detalhe).

Na camada medular havia hiperplasia e hipertrofia de macrófagos nos sinusóides, geralmente associada à eritrofagocitose e hemossiderose. Nos cordões predominavam plasmócitos e células Mott.

Na análise do perfil celular predominante no linfonodo poplíteo houve diferença significativa entre grupos para linfócitos e macrófagos ( $P < 0,05$ ). Os cães dos grupos S e O tiveram uma maior densidade de macrófagos e diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) do grupo A (Figura 2A). Os escores de linfócitos apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre todos os grupos de cães infectados (Figura 2B). Para os escores de plasmócitos as diferenças significativas ocorreram entre os grupos A e O (Figura 2A).



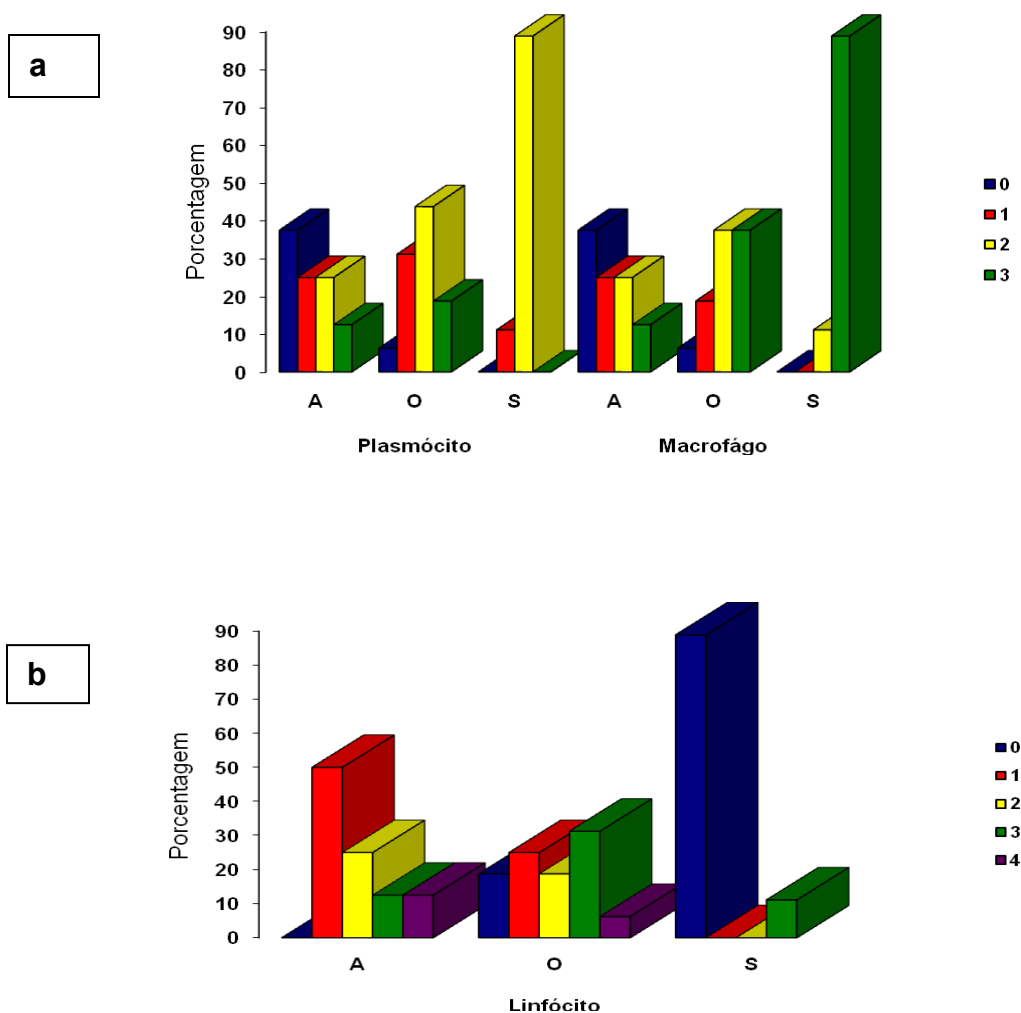


Figura 2 – (A) Proporção de escore dos tipos celulares (Plasmócitos e macrófagos) no linfonodo poplíteo dos grupos de cães infectados para LVC (A = assintomático, O = oligossintomático e S= sintomático), observados no infiltrado celular (plasmócito e macrófago). Escores de intensidade de infiltrado celular: sem alteração (0), discreta (1), moderada (2) e acentuada (3) para os tipos celulares macrófago e plasmócitos. (B) Proporção de escores para a reatividade linfóide: (0) atrofia linfóide, (1) não reativo, (2) discreta reatividade, (3) moderada reatividade, (4) acentuada reatividade linfóide.

Pelo teste de Correlação de Spearman, o grau de associação entre os escores para os três tipos celulares foi -1.0 ( $P < 0.0001$ ) entre linfócitos e macrófagos no grupo S; 0.72 ( $P < 0.01$ ) entre plasmócitos e macrófagos no grupo O. No grupo A, a correlação foi 0.83 ( $P < 0.05$ ) entre macrófagos e linfócitos e, 1.0 ( $P < 0.0001$ ) entre plasmócitos e macrófagos e 0.83 ( $P < 0.05$ ) entre plasmócitos e linfócitos. Nota-se que há uma associação inversamente proporcional entre macrófagos e linfócitos no grupo S ( $P < 0,05$ ).

O perfil celular predominante no linfonodo subescapular foi de macrófagos, com diferenças significativas entre grupos ( $P < 0,05$ ). Na comparação entre grupos, os cães do grupo S diferiram significativamente do grupo A e O (Figura 3).

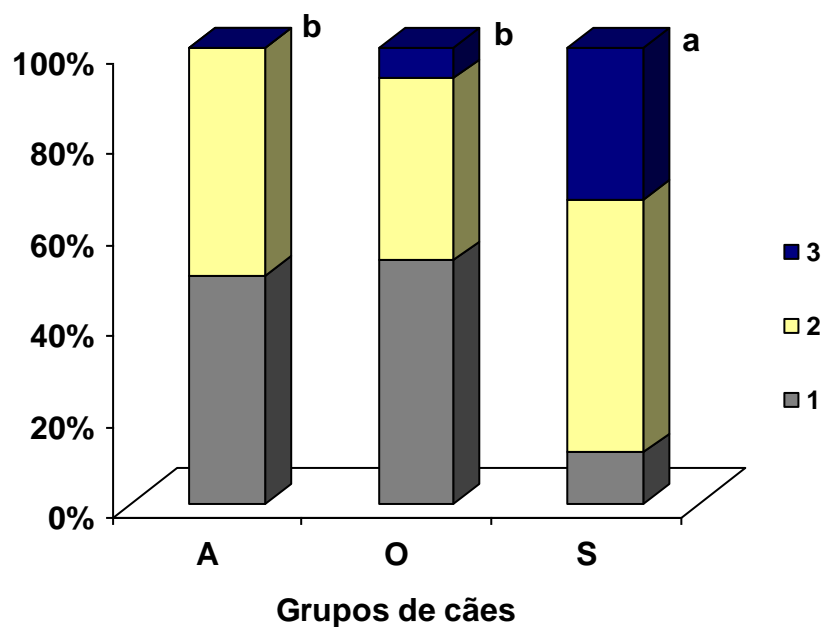


Figura 3 - Proporção de escores celulares de macrófagos (1 = discreto; 2 = moderado; 3 = acentuado) no linfonodo subescapular dos grupos de cães infectados para LVC (A = assintomático, O = oligossintomático e S= sintomático). As médias de escores seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

Os outros tipos celulares não diferiram estatisticamente no linfonodo subescapular, bem como, nos linfonodos mesentéricos e ilíacos não foi possível observar diferenças estatísticas significativas em relação ao tipo celular predominante entre os grupos de cães infectados ( $P > 0,05$  / dados não mostrados).

### 5.3 Análise imuno-histoquímica

A identificação de macrófagos imunomarcados com formas amastigotas de *Leishmania* sp. foi vista nos granulomas presentes em todas as regiões do linfonodo (Figuras 4A e 4B), com maior frequência na região medular. Também foi observada positividade de fibroblastos da região capsular (Figura 4A). Portanto, a imunomarcação ocorreu no citoplasma de macrófagos, células dendríticas das regiões subcapsular e medular, bem como, em fibroblastos da região capsular.

O número de células parasitadas no linfonodo poplíteo foi maior nos grupos sintomático (S) e oligossintomático (O), com diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para o grupo assintomático (A), como pode ser observado na Figura 5a.

No linfonodo subescapular a carga parasitária foi maior no grupo S ( $P < 0,05$ ), como observado na Figura 5b. Já os linfonodos mesentéricos e ilíacos não houve diferenças estatísticas significativas entre eles e ambos tiveram uma carga parasitária baixa.



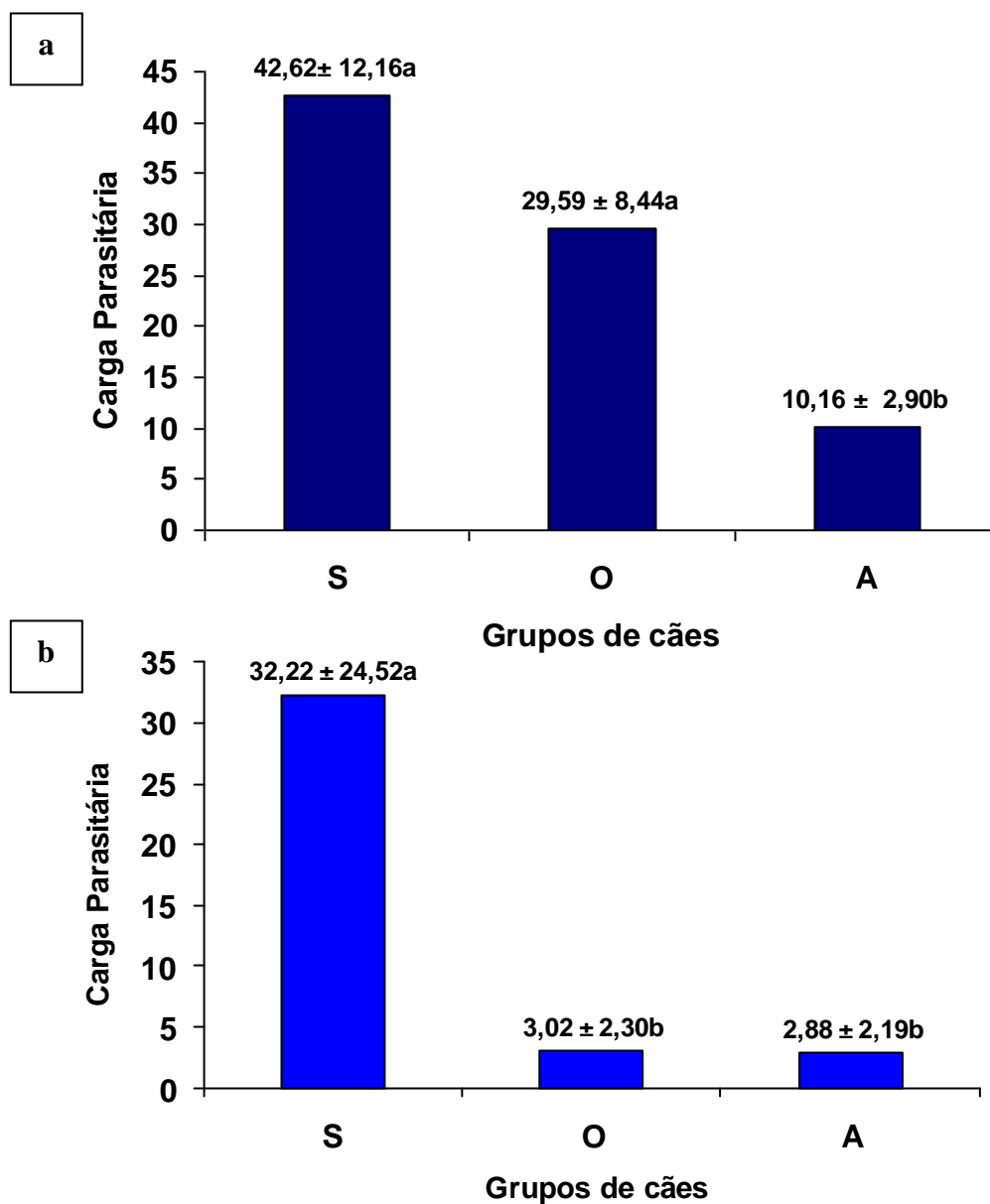


Figura 5 - Médias e respectivos desvios-padrão para a característica carga parasitária por grupo de cães infectados (S = sintomático; O = oligossintomático e A = assintomático), nos linfonodos poplíteo (a) e subescapular (b). Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A imunomarcção de MIF foi observada no citoplasma de macrófagos, linfócitos, plasmócitos e fibroblastos capsulares, mostrando uma reatividade intensa nestes diferentes tipos celulares (Figura 6A), portanto a determinação da densidade de células MIF positivas foi avaliada somente em macrófagos, o principal alvo do protozoário *Leishmania* sp. Notou-se que os granulomas imunomarcados por MIF apresentavam maior intensidade de coloração nos cães do grupo sintomático, no linfonodo poplíteo (Figura 6B). Além da imunomarcção dos macrófagos observou-se também a mesma em formas amastigotas intracitoplasmáticas. No entanto nem todos os macrófagos parasitados apresentavam formas amastigotas positivas para MIF. Este aspecto foi observado somente em animais com elevado número de parasitas no linfonodo, o que coincidiu com o grupo sintomático.

No linfonodo subescapular esta reatividade foi menor ou muitas vezes nula nos macrófagos dos granulomas (Figura 6B1).





A partir da análise de variância, verificou-se que houve efeito de grupo sobre as médias gerais de contagens para MIF apenas nos linfonodos poplíteo ( $p < 0,0001$ ) e mesentérico ( $p < 0,05$  / Tabela 1).

Na comparação entre grupos pelo teste de Tukey, no linfonodo poplíteo, foi possível observar que houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os grupos de cães infectados (S, O, A) com o grupo controle (C). Ou seja, os grupos de cães infectados apresentaram as maiores médias de macrófagos produzindo MIF. Dentro dos grupos infectados esta diferença somente ocorreu entre os grupos S e A, ou seja, animais com doença avançada e com maior densidade de parasitos possuem macrófagos produzindo maiores concentrações de MIF (Tabela 1).

No linfonodo mesentérico as diferenças foram significativas somente entre os grupos S e C ( $P < 0,05$ ). Os linfonodos ilíaco e subescapular não apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os grupos infectados e entre estes e o controle, para a presença de MIF (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação entre médias de densidade de macrófagos imunomarcados com MIF por grupo de cães com Leishmaniose Visceral.

<b>Linfonodo/Grupo</b>	<b>A (n =9)</b>	<b>O (n =16)</b>	<b>S (n =9)</b>	<b>C (n =7)</b>
	<b>Média/DP</b>	<b>Média/DP</b>	<b>Média/DP</b>	<b>Média/DP</b>
<b>Poplíteo</b>	4,72 <sup>b</sup> /3,0	5,98 <sup>a, b</sup> /2,2	7,86 <sup>a</sup> /2,0	1,29 <sup>c</sup> /1,6
<b>Mesentérico</b>	4,72 <sup>a, b</sup> /2,8	3,98 <sup>a, b</sup> /2,6	5,81 <sup>a</sup> /3,3	1,29 <sup>b</sup> /1,6

Variável transformada em raiz quadrada. Médias seguidas de letras distintas por grupo para cada linfonodo difere significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. DP = desvio-padrão. Grupos: A = assintomático, O = oligossintomático, S = sintomático e C = controle

Considerando o linfonodo poplíteo, verificou-se que houve correlação positiva linear significativa, entre a média geral de macrófagos imunomarcados e a

média geral de carga parasitária no grupo A (0,87;  $P < 0,005$ ) e no grupo S (0,81;  $P < 0,01$ ). Portanto, para esses grupos constatou-se que o elevado número de células parasitadas e a densidade de macrófagos imunomarcados estão altamente associadas, isto é o aumento de uma variável correlaciona-se com o aumento da outra.

Para o linfonodo mesentérico, não houve associação linear significativa ( $P > 0,05$ ) entre as médias gerais de carga parasitária e as médias gerais de macrófagos imunomarcados com MIF.

## VI DISCUSSÃO

A linfadenopatia é um aspecto importante da LVC e os achados neste estudo coincidiram com os relatos de LIMA et al. (2004) e GIUNCHETTI et al. (2008), em que os cães sintomáticos apresentaram alterações mais marcantes macro e microscopicamente. Neste trabalho, os linfonodos poplíteos apresentaram maior comprometimento da resposta linfóide, quando comparados ao subescapular. Ou seja, no poplíteo predominou a atrofia linfóide associada à elevada carga parasitária em cães sintomáticos. Já no subescapular era mais evidente a reatividade linfóide, embora a atrofia também tenha sido observada no mesmo grupo de cães infectados. Assim, estes resultados coincidem com GIUNCHETTI et al. (2008). Já LIMA et al. (2004) avaliaram que não há relação entre o estadiamento clínico e carga parasitária de cães naturalmente infectados com a intensidade das lesões.

No linfonodo poplíteo verificou-se também que a reatividade linfóide foi marcante nos grupos oligossintomático e assintomático ( $P < 0,05$ ). GIUNCHETTI et al. (2008) também descrevem esse tipo de resposta em animais assintomáticos, coincidindo com uma menor carga parasitária.

No presente estudo, os linfonodos cavitários (ilíaco, mesentérico) não apresentaram respostas celulares significativas ( $P > 0,05$ ) que fossem importantes para caracterizar o quadro sistêmico da LVC. Os linfonodos periféricos possivelmente são mais reativos, devido à área anatômica que drenam, ou seja, a pele. As diferenças de reatividade entre eles poderiam ser explicadas pela evolução da doença. No subescapular, a pele da cabeça (focinho e orelhas) mostrou-se mais acometida por reatividade inflamatória e densidade de parasitos, quando comparada à região abdominal (dados não publicados). Considerando que estas áreas anatômicas são de predileção do inseto vetor, o linfonodo subescapular teria um contato inicial com o agente etiológico e, portanto desenvolveria uma resposta mais intensa e de evolução crônica. Já no linfonodo poplíteo, esse contato é mais tardio e, portanto o protozoário teria maior capacidade de modular o sistema imune para favorecer a sua multiplicação,

caracterizada pela evidente atrofia linfóide deste linfonodo. O poplíteo drena a região dos membros posteriores (DYCE et al., 2004). Em animais com sinais clínicos pouco evidentes observam-se alterações discretas na pele, já em animais sintomáticos esta área de drenagem é bastante acometida e as lesões do linfonodo poderiam indicar uma visceralização de LVC, ou seja, a presença do parasita em vários sistemas do organismo do hospedeiro. FEITOSA et al. (2000) observaram que os linfonodos poplíteos de cães com LVC foram os que apresentaram mais linfadenomegalia, independente da intensidade das lesões cutâneas. Essas diferenças entre o relato de Feitosa e colaboradores (2000) e os nossos resultados poderiam ser explicadas pelo tipo de análise do linfonodo, pois na palpação feita durante o exame clínico do cão, o poplíteo é o mais acessível em relação aos outros linfonodos periféricos. Já em nosso estudo esta avaliação foi feita durante a necropsia dos cães, facilitando uma análise mais detalhada de todos os linfonodos periféricos. Portanto, o linfonodo poplíteo é um importante órgão a ser avaliado para a pesquisa parasitária e para a avaliação do perfil celular do cão, em áreas endêmicas para Leishmaniose Visceral.

Neste linfonodo, o perfil celular predominante entre os grupos foi de macrófagos e plasmócitos. A predominância de macrófagos nos grupos oligossintomático e sintomático pode estar relacionada com um perfil de citocinas pró e antiinflamatórias que estejam modulando a resposta imune nestes grupos. Algumas destas citocinas interferem na ação microbicida de macrófagos (CORRÊA et al., 2007).

A presença de macrófagos estava relacionada à formação de reação granulomatosa, independente de grupo clínico. Nos animais com sintomatologia avançada (grupo sintomático), esta reação inflamatória era intensa, ocupando o lugar de linfócitos na cortical e causando atrofia dos cordões na medular. Esse aspecto sempre ocorreu concomitante a maior quantidade de parasitos no tecido (Figura 5a e 5b). Os granulomas observados no presente estudo, no linfonodo poplíteo, eram difusos e do tipo lepromatoso, em que o aspecto característico do infiltrado inflamatório é composto predominantemente por macrófagos, com poucos linfócitos e plasmócitos. Neste tipo de granuloma descreve-se a

predominância de citocinas do tipo Th2 (ACKERMANN, 2009). No linfonodo subescapular notou-se um aspecto diferenciado, em que a presença de linfócitos entremeados aos macrófagos foi mais intensa que no linfonodo poplíteo (Figura 1A e 1B). Essas diferenças na composição celular dos granulomas entre os linfonodos periféricos poderiam estar associadas à maior reatividade linfóide vista no subescapular. A maior densidade de linfócitos poderia sugerir uma tendência à resposta do tipo Th1. Já no poplíteo esse padrão de resposta seria possivelmente do tipo Th2. Estes aspectos podem ser observados nas Figuras 5a e 5b, onde fica evidente a diferença na densidade de parasitos entre os linfonodos. No subescapular a diferença no número de células parasitadas entre o grupo S com o A e O é muito marcante. Aliado a isso, o perfil celular de linfócitos não diferiu entre os grupos, isso foi observado somente para macrófagos (Figura 3), no grupo sintomático. Este grupo apresentou os escores de maior intensidade de granulomas. Por esse fato pode-se inferir que o linfonodo subescapular é mais eficiente em conter a multiplicação do parasito, quando comparado ao poplíteo, nos grupos A e O. Seria possível sugerir um padrão de resposta compartimentalizada dentro dos linfonodos, como já foi descrito por REIS et al. (2009). Estes autores descrevem perfis de resposta variados em diferentes órgãos de cães com LVC e esse padrão de resposta poderia estar relacionado à proliferação ou ao controle da multiplicação do parasito nos órgãos infectados.

Poderíamos sugerir que a reação granulomatosa observada nos linfonodos poderia indicar uma resposta do tipo Th2, caracterizada por macrófagos com inibição da sua capacidade de destruir o protozoário, induzida por estas citocinas. Por esse fato, nos casos mais avançados da LVC, a capacidade de resposta imune do cão está comprometida, devido à atrofia dos linfócitos da região cortical secundária a intensa reação granulomatosa. Estes resultados são similares aos descritos por LIMA et al. (2004), no entanto neste estudo foi observada também a presença de granulomas altamente parasitados na região cortical, contrariando as observações deste autor. ALVES et al. (2009) observaram que citocinas Th2 (IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ ) nos linfonodos pré-escapulares de cães sintomáticos, associadas à elevada carga parasitária, levavam a uma maior susceptibilidade à infecção por

*Leishmania chagasi* em cães. Da mesma forma, as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$  já foram descritas em baços de cães sintomáticos e assintomáticos infectados por *Leishmania chagasi*, confirmando a predominância do perfil Th2 na doença ativa. Concomitante a isso houve a redução dos níveis de INF- $\gamma$ , que são essenciais para a ativação dos macrófagos (CORRÊA et al., 2007).

No presente estudo seria possível sugerir que cães mais resistentes à infecção pelo protozoário (grupo A) poderiam responder mais eficientemente caso tivessem tempo viável para isso, já que são submetidos à eutanásia por serem soropositivos, sem tempo de uma análise da evolução da doença.

LIMA et al. (2004) observaram maior reatividade do linfonodo cervical, sem diferenças estatísticas entre os grupos assintomático e sintomático para a carga parasitária. No presente estudo essas diferenças foram marcantes e os cães sintomáticos tiveram as alterações mais graves na população linfóide e a maior carga parasitária.

BOGDAN et al. (2000), relataram que fibroblastos podem ser hospedeiros de formas amastigotas de *Leishmania chagasi*, o que está de acordo com o achado de um cão do grupo sintomático com elevada carga parasitária no presente estudo. Sabe-se que fibroblastos quando ativados, produzem citocinas, fatores de crescimento, entre outros (MORAES e JOAZEIRO, 2005). Estudos *in vitro* com fibroblastos parasitados por *L. major* mostram que esta célula não possui capacidade microbicida, portanto o parasito teria um ambiente menos hostil para sobreviver, embora não seja descrita sua multiplicação no interior destas células (BOGDAN et al. 2000). Por este fato, com base nos relatos da literatura e nas observações deste estudo sugere-se que o protozoário *Leishmania* sp poderia utilizar o fibroblasto para modular a resposta imune do hospedeiro, juntamente com os macrófagos, favorecendo sua evasão imune. O envolvimento do fibroblasto na resposta imune já foi descrito em outras situações, onde estas células são denominadas de fibroblastos sentinelas e são capazes de expressar citocinas e receptores de superfície similares aos dos linfócitos T CD<sup>4+</sup>. Estas subpopulações de fibroblastos podem expressar citocinas do tipo Th1 (IL-2, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ) ou Th2 (IL-4, TGF- $\beta$  e MPC-1). Estas citocinas permitem ao fibroblasto

interagir com os componentes da matriz extracelular e com leucócitos, tais como, macrófagos, granulócitos, mastócitos e linfócitos (MORAES e JOAZEIRO, 2005).

A presença de plasmocitose e de células Mott (plasmócitos com corpúsculos de Russell) foi um aspecto marcante nos linfonodos periféricos. O perfil de plasmócitos não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os grupos de cães infectados ( $P > 0,05$ ). Possivelmente este perfil celular indica uma predominância de resposta humoral, já que plasmócitos produzem imunoglobulinas (corpúsculos de Russell). Portanto, cães com a predominância deste tipo celular não responderiam eficientemente ao protozoário. Em camundongos infectados com *L. amazonensis*, a predominância de linfócitos B e anticorpos favoreceu a progressão da doença, devido à supressão da migração de linfócitos T CD<sup>4+</sup> para o sítio da lesão (WANASEN e SOONG, 2008).

Na avaliação da presença do Fator de Inibição de Macrófagos (MIF) em cães naturalmente infectados por *Leishmania*. (*L.*) *chagasi* observou-se que esta citocina está presente de forma mais significativa ( $P < 0,05$ ) nos cães que apresentam sinais clínicos de LVC (grupos S e O). Um dos principais papéis desta citocina é manter o macrófago por mais tempo no local da injúria, evitando sua apoptose (KAMIR et al., 2008). Desta forma, o local se torna apropriado para a multiplicação da *Leishmania*, já que macrófagos são células-alvo deste protozoário.

Foi possível também observar que as formas amastigotas no interior dos macrófagos, muitas vezes apresentavam-se imunomarcadas, demonstrando assim que a *Leishmania* também produz esta citocina. Este achado está de acordo com estudos realizados com formas ortólogas de MIF descritas em *Leishmania major* (RICHARDSON et al., 2009). Essa observação mostra que MIF pode ser utilizado pelo protozoário para modular a resposta imune do hospedeiro, tendo em vista a similaridade da citocina produzida pelo protozoário com a citocina de mamíferos. Talvez, pelo fato de termos observado a imunomarcagem de MIF no macrófago do cão e na membrana citoplasmática do parasito, possamos sugerir que, conforme as observações de Richardson e colaboradores (2009) exista uma elevada homologia entre o MIF parasitário e do hospedeiro canino.

SATOSKAR et al. (2001) realizaram um estudo com camundongos deficientes em MIF, infectados experimentalmente por *Leishmania major* e constataram que nos camundongos deficientes eram mais susceptíveis a lesão cutânea causada por *Leishmania major*. Esse estudo não está de acordo com os resultados do presente estudo, tendo em vista que os cães com doença crônica e com lesões mais exuberantes apresentaram maior densidade de macrófagos imunomarcados para MIF. Nos macrófagos cultivados *in vitro* dos camundongos houve um estímulo com INF- $\gamma$ , favorecendo a ativação de macrófagos e sua atividade leishmanicida. Nos cães do nosso estudo, possivelmente a *Leishmania* leva vantagem, pois já está comprovado que existe um predomínio de citocinas Th2 nos linfonodos de cães sintomáticos (ALVES et al., 2009), portanto há inibição da expressão de INF- $\gamma$  e conseqüentemente da função do macrófago. Portanto, o parasito consegue multiplicar-se com facilidade dentro da célula e disseminar-se pelo organismo do cão hospedeiro, atraindo cada vez mais macrófagos para os tecidos infectados.

A presença da citocina MIF no linfonodo poplíteo foi maior que no subescapular. Isso pode estar relacionado ao tipo de resposta predominante neste linfonodo. No linfonodo subescapular os granulomas têm uma maior quantidade de linfócitos, permitindo assim uma resposta mais eficiente frente ao protozoário. No poplíteo este aspecto foi inverso e pôde ser comprovado pela maior carga parasitária, maior intensidade da reação granulomatosa e pela atrofia linfóide. Os granulomas causavam nos casos mais graves distorção da arquitetura do linfonodo. A atrofia estava relacionada a apoptose de linfócitos T, mais prevalente e significativa ( $P < 0,05$ ) no grupo sintomático (MOREIRA, 2010). Fica claro, que a *Leishmania* torna o linfonodo poplíteo um ambiente bastante favorável para sua sobrevivência no hospedeiro. KAMIR et al. (2008) observaram a inibição da apoptose de macrófagos infectados por *Leishmania major*, por meio de um ortólogo de MIF produzido pelo parasito.

A citocina pró-inflamatória MIF faz a ligação entre a imunidade inata e a adaptativa. Esta citocina tem ação também sobre linfócitos B, por meio de sua interação com os receptores de linfócitos B CD74 e CD44. Por meio de vias complexas, esta interação inibe a apoptose destas células e favorece a sua



proliferação (GORE et al., 2008). Talvez esse relato de Gore e seus colaboradores poderiam explicar a elevada densidade de plasmócitos observada nos cães deste estudo. MIF protege o macrófago e os linfócitos B da apoptose, assim como pode influenciar no perfil de citocinas do microambiente do linfonodo. A elevada plasmocitose está relacionada ao elevado título de anticorpos inespecíficos circulantes, agravando ainda mais o quadro clínico dos cães, devido à deposição de imunocomplexos. Possivelmente, MIF seja uma das principais ferramentas que a *Leishmania chagasi* utiliza para a sua evasão imune, já que faz a ligação entre as imunidades inata e adaptativa.

## VII CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo foi possível concluir que:

- O macrófago é a célula predominante nos linfonodos periféricos dos cães naturalmente infectados, principalmente nos grupos oligossintomático e sintomático;
- Os linfonodos periféricos mostram as lesões mais significativas quanto a perfil celular e densidade de macrófagos parasitados, quando comparados aos linfonodos cavitários;
- O linfonodo poplíteo é o mais susceptível a proliferação do parasito e tem menor densidade de linfócitos, nos animais com sintomatologia crônica de LV;
- O maior número de macrófagos parasitados e a maior intensidade das lesões foram observados nos cães sintomáticos;
- A densidade e intensidade de imunomarcção de MIF em macrófagos foram maiores no grupo de cães sintomáticos e no linfonodo poplíteo;
- A imunomarcção de MIF também foi observada na membrana citoplasmática da *Leishmania*, sugerindo evasão imune.

## VIII. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Editora Saunders Elsevier, 2008. 564p.

ACKERMANN, M. R. Chronic inflammation and wound healing. In: MCGAVIN, M.D; ZACHARY, J. F. **Pathologic basis of veterinary disease**, 4 ed. Saint Louis: Editora Mosby Elsevier, 2009. cap. 4, p. 153–191.

ALVES C. F.; AMORIM I. F. G.; MOURA E. P.; RIBEIRO R. R.; ALVES C. F.; MICHALICK M. S.; KALAPOTHAKIS E.; BRUNA-ROMERO O.; TAFURI W. L.; TEIXEIRA M. M.; MELO M. N. Expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and TGF- $\beta$  in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 128, n. 4, p. 349- 358, 2009.

AUGUSTIJN, K. D.; KLEEMANN, R.; THOMPSON, J.; KOOISTRA, T.; CRAWFORD, C. E.; REECE, S. E.; PAIN, A.; SIEBUM, A. H. G.; JANSE, C. J.; WATERS, A. P. Functional characterization of the *Plasmodium falciparum* and *P. berghei* homologues of macrophage migration inhibitory factor. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 3, p. 1116–1128, 2007.

BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 329-337, 2006.

BIMAL, S.; SINGH, S. K.; DAS, V. N. R.; SINHA, P. K.; GUPTA, A. K.; BHATTACHARYA, S. K.; DAS, P. *Leishmania donovani*: effect of therapy on expression of CD2 antigen and secretion of macrophage migration inhibition factor by T-cells in patients with visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 111, n. 2, p. 130-132, 2005.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to leishmania mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 1, p.121-134, 1998.

BOGDAN C.; DONHAUSER N.; DÖRING R.; RÖLLINGHOFF M.; DIEFENBACH A.; RITTIG M. G. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 191, n. 12, p. 2121–2130, 2000.

BRASIL - Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120p.

CALANDRA, T.; BUCALA, R. Macrophage migration inhibitory factor: a counterregulator of glucocorticoid action and critical mediator of septic shock. **Journal of Inflammation**, New York, v. 47, n. 1, p. 39-51, 1995.

CALANDRA, T.; ROGER, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 3, n. 10, p. 791–800, 2003.

CHO, Y.; S.; JONES, B. F.; VERMEIRE, J. J.; LENG, L.; DiFEDELE, L.; HARRISON, L. M.; XIONG, H.; KWONG, Y. K. A.; CHEN, Y.; BUCALAI, R.; LOLIS, E.; CAPPELLO, M. Structural and functional characterization of a secreted hookworm macrophage migration inhibitory factor (MIF) that interacts with the human MIF receptor CD74. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 282, p. 23447–23456, 2007.

CORDERY, D. V.; KISHORE, U.; KYES, S.; SHAFI, M. J.; WATKINS, K. R.; WILLIAMS, T. N.; MARSH, K.; URBAN, B. C. Characterization of a *Plasmodium*

*falciiparum* macrophage-migration inhibitory factor homologue. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 195, n. 6, p. 905–912, 2007.

CORRÊA A. P. F. L.; DOSSI A. C. S.; VASCONCELOS R. O.; MUNARI D. P.; LIMA V. M. F. Evaluation of transformation growth factor-beta1, interleukin-10 and interferon-gama in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, p. 267–274, 2007.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. Sistema Cardiovascular. In: \_\_\_\_\_. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2004. cap.7, p.215-255.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos Clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.28, p.36-44, 2000.

GORE, Y.; STARLETS, D.; MAHARSHAK, N.; BECKER-HERMAN, S.; KANEYUKI, U.; LENG, L.; BUCALA, R.; SHACHAR, I. Macrophage migration inhibitory factor induces B cell survival by activation of a CD74–CD44 receptor complex. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 283, n. 5, p. 2784–2792, 2008.

GIUNCHETTI, R. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; CORREIA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 121, n. 1-2, p.23-33, 2008.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 4, p. 615-623, 2004.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; MURPHY, L.; AGGARWAL, G.; BERRIMAN, M.; SISK, E.; RAJANDREAM, M. A.; ADLEM, E.; AERT, R. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, Washington, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005.

JAWORSKI, D. C.; JASINSKAS, A.; METZ C. N.; BUCALA R.; BARBOUR A. G. Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor in the tick, *Amblyomma americanum*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 323–331, 2001.

JÜTTNER, S.; BERNHAGEN, J.; METZ, C. N.; RÖLLINGHOFF, M.; BUCALA, R.; GESSNER, A. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF- $\alpha$ . **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 161, n. 5, p. 2383-2390, 1998.

KAMIR, D.; ZIEROV, S.; LENG, L.; CHO, Y.; DIAZ, Y.; GRIFFITH, J.; MCDONALD, C.; MERK, M.; MITCHELL, R. A.; TRENT, J.; CHEN, Y.; KWONG, Y. K. A.; XIONG, H.; VERMEIRE, J.; CAPPELO, M.; MCMAHON-PRATT, D.; WALKER, J.; BERNHAGEN, J.; LOLIS, E.; BUCALA, R. A. *Leishmania* Ortholog of Macrophage Migration Inhibitory Factor Modulates Host Macrophage Responses. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 180, n.12, p. 8250-8261, 2008.

LEÃO, S. S.; LANG, F.; PRINA, E.; HELLIO, R.; ANTOINE, J. C. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **Journal of Cell Science**, London, v. 108, n. 10, p. 3219–3223, 1995.

LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, Basel, v. 92, n. 1, p. 43-53, 2004.

LIMA, V. M. F.; PEIRO, J. R.; VASCONCELOS, R. O. IL-6 and TNF alfa productions during active canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 115, n. 1-2, p.189-193, 2007.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SABROZA, P. C.; SOUZA, M. A.; SOUZA, P. P.; TOLEDO, L. M.; FILHO, F. B. R. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 4, p. 432-446, 1985.

MICHALICK, M. S. M. Gênero Leishmania. In: Neves, D.P. **Parasitologia Humana**. 11 ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap. 07, p. 41-46.

MISKA, K. B.; FETTERER, R. H.; LILEHOJ, H. S.; JENKINS, M. C.; ALLEN, P. C.; HARPER, S. B. Characterisation of macrophage migration inhibitory factor from *Eimeria* species infectious to chickens. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 151, n. 2, p. 173–183, 2007.

MITCHELL, R. A.; BUCALA, R. Tumor Growth-promoting properties of Macrophage Migration Inhibitory Factor. **Seminars in Cancer Biology**, New York, v. 10, n. 5, p. 359-366, 2000.

MITCHELL, R. A.; LISO, H.; CHESNEY, J.; FINGERLE-ROWSON, G.; BAUGH, J., DAVID, J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. **PNAS**, Boston, v. 99, n. 1, p. 345-350, 2002.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN ANDRES, M.; GONZALES, F.; CASTILLO, J. A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum* to Colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transaction of the Royal Society of Medicine and Hygiene**, Araçatuba, v. 88, p. 491-493, 1994.

MORAES S. G.; JOAZEIRO, P. P. Fibroblastos. In: CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B. **Células: Uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: Editota Manole, 2005. cap.3, p.22-33.

MORAND, E. F.; LEECH, M.; BERNHAGEN, J. MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 5, p. 399–411, 2006.

MOREIRA, P. R. R. **Apoptose em linfonodos de cães com Leishmaniose Visceral**. 2010. 54f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

MYLONAKIS, M. E., PAPAIOANNOU, N., SARIDOMICHELAKIS, M. N., KOUTINAS, A. F., BILLINIS C., KONTOS, V. I. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 34, n. 3, p. 243-247, 2005.

NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; NUNES, D. A.; ZINEZZI, R. O.; SAVANI, E. S. M. M.; ISHIKAWA, E.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'AURIA, S. R. N.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C. Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Salvador, v. 34, n. 3, p. 301-302, 2001.



PASTRANA, D. V.; RAGHAVAN, N.; FITZGERALD, P.; EISEINGER, S.W.; METZ, C.; BUCALA, R.; SCLEIMER, R. P.; BICKEL, C.; SCOTT, A. L. Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5955–5963, 1998.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARVALHO, A .T.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; TAFURI W. L; OLIVEIRA, R. C. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 128, n. 1-3, p. 87–95, 2009.

REYES, J. L.; TERRAZAS, L .I.; ESPINOZA, B.; CRUZ-ROBLES, D.; SOTO, V.; RIVERA-MONTOYA, I.; GÓMEZ-GARCIA, L.; SINIDER, H.; SATOSKAR, A. R.; RODRIGUEZ-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 6, p. 3170-3179, 2006.

RICHARDSON, J. M.; MORRISON, L. S.; BLAND, N. D.; BRUCE, S.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C.; WALKINSHAW, M. D. Structures of *Leishmania major* orthologues of macrophage migration inhibitory factor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 380, p. 442-448, 2009.

SATOSKAR, A. R.; BOZZA, M.; SOSA, M .R.; LIN, G.; DAVID, J. R. Migrationinhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 2, p. 906-911, 2001.

SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: Greene, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Editora W.B. Saunders Co, 1990., p. 450–458.

WANASEN, N.; XIN, L.; SOONG, L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 38, n. 3-4, p. 417–429, 2008.

WEISER, W. Y.; POZZI, L. M.; DAVID, J. R. Human recombinant migration inhibitory factor activates human macrophages to kill *Leishmania donovani*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 147, n. 6, p. 2006-2011, 2006.

WHO. **Research to support the elimination of visceral leishmaniasis.** Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/svc/publications/about-tdr/annual-reports/visceral-leishmaniasis-elimination-2008>>. Acesso em: 11/jan./2010.

WU, Z.; BOONMARS, T.; NAGAMO, I.; NAKADA, T.; TAKAHASHI, Y. Molecular expression and characterization of a homologue of host cytokine macrophage migration inhibitory factor from *Trichinella* spp. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 89, n. 3, p. 507–515, 2003.

ZAFRA, R.; JABER, J. R.; PEREZ-ECIJA, R. A.; BARRAGAN, A.; MARTINEZ-MORENO, A.; PEREZ, J. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.123, n. 3-4, p.353–359, 2008.

## ANEXOS

Anexo 1 – Média transformada em raiz quadrada e média geral com seus respectivos coeficientes de variação da densidade de macrófagos imunomarcados com MIF em cães com Leishmaniose Visceral.

<b>LINFONODOS</b>	<b>MÉDIA*</b>	<b>CV (%)*</b>	<b>MÉDIA</b>	<b>CV (%)</b>
<b>Poplíteo</b>	5,31	42,9	37,6	90,6
<b>Subescapular</b>	3,57	79,5	21,15	116,0
<b>Íliaco</b>	3,82	81,4	24,6	110,2
<b>Mesentérico</b>	4,07	65,5	25,12	118,2

\* Variável transformada em raiz quadrada. CV = coeficiente de variação.