

NEFRITE INTERSTICIAL NA LEISHMANIOSE VISCERAL

LEOPOLDINA ALMEIDA GOMES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, para a obtenção do grau Mestre em Ciência Animal, na Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal.

TERESINA

Estado do Piauí – Brasil

2007

NEFRITE INTERSTICIAL NA LEISHMANIOSE VISCERAL

LEOPOLDINA ALMEIDA GOMES

Orientador: Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, para a obtenção do grau Mestre em Ciência Animal, na Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal.

TERESINA

Estado do Piauí – Brasil

2007

G633p Gomes, Leopoldina Almeida
Patologia e patogenia da nefrite intersticial na
leishmaniose visceral / Leopoldina Almeida
Gomes. Teresina : 2007.
68f.

Orientador : Prfº Dr. Francisco Assis Lima
Costa

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –
Universidade Federal do Piauí.

1.Animais doenças. 2.Leishmaniose visceral
canina 3.Nefrite 4.Cão 5.Hamster I.Titulo

CDD 636.089 6

NEFRITE INTERSTICIAL NA LEISHMANIOSE VISCERAL

Leopoldina Almeida Gomes

Dissertação aprovada em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa- CCA/UFPI
Orientador

Prof. Dr. José Ângelo Lauletta Lindoso
Examinador Externo

Prof.^a Dr.^a. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva
Examinadora Interna

DEDICO

*Ao meu pai **Antonio** pela incansável dedicação, confiança, pelos conselhos, e oportunidades dadas durante toda a minha vida, sempre acreditando na minha formação. Um exemplo de trabalho, força, esperança e coragem, que sigo a cada dia, para vencer os obstáculos. **MEU PORTO SEGURO**.*

*À minha mãe e **AMIGA**, **Maria das Graças**, pelo amor incondicional, compreensão, bondade e apoio nas horas difíceis.*

*À minhas irmãs, **Christiane**, **Verônica**, **Carmem Lúcia** e **Raíssa**, pelo **COMPANHEIRISMO** e incentivo, sempre presentes na minha vida.*

*À minha querida filha, **Bárbara**, **AMOR DA MINHA VIDA**, pelo amor e carinho, mesmo distante; pela compreensão em todos os momentos em que estive ausente, sempre acreditando no meu desejo de vencer e no nosso futuro.*

Aos meus lindos sobrinhos, João Vitor e Felipe Gabriel, por suas ALEGRIAS e GRAÇINHAS que me encantam e me fazem acreditar na pureza da alma.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, disposição e persistência que me concedes a cada dia.

Ao prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa, pela orientação, sabedoria, experiência e conhecimentos científicos. Pela boa vontade e disponibilidade em ajudar nos momentos de execução e conclusão deste trabalho.

À prof.^a Dr.^a. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva, pela convivência diária e sugestões críticas em relação à pesquisa.

Aos professores que fazem parte do corpo docente da Pós-Graduação em Ciência Animal e a todos os professores do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Piauí, que contribuíram muito com os conhecimentos passados durante minha graduação e pós-graduação.

À Ana Lys Barradas Bezerra Mineiro, pelo companheirismo e apoio durante todo o trabalho, sempre muito otimista e prestativa a qualquer momento, sem medir esforços em me ajudar..

À Lucilene dos Santos Silva, por sua dedicação, carinho, estímulo e presteza em colaborar.

A todos os alunos de graduação e iniciação científica, que fazem parte do grupo de pesquisa do Setor de Patologia Animal, que de alguma forma colaboraram na execução e confecção deste trabalho.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, Bruno Leandro Maranhão Diniz e Antonio Sampaio Júnior, pela amizade agradável, pelos momentos de pesquisa, estudos e ajuda durante todos esses anos.

Aos colegas de turma da Pós-Graduação, pelo convívio, trocas de conhecimentos e lazer durante o curso.

Ao aluno de graduação de Medicina Veterinária, Daniel César, pela boa vontade e ajuda na elaboração das tabelas.

À Antônia Lúcia Paiva Timbó (Lucinha) e Janildo Lopes Magalhães (Jan), pela amizade ao longo dos anos de Casa Estudantil da UFPI, que perduram até os dias de hoje, pelo carinho, lealdade e apoio em todas as horas.

Às Médicas Veterinárias, Marisa Cruz Borges e Marineusa da Silva C. Costa e a todos da Clínica Bichos em Casa, pela amizade, trabalho e apoio em todos os momentos.

À Dona Rosário, por sua bondade, força, alegria e paz transmitidas nos dias difíceis de minha vida, pela fé e ao Sr. Antonio, Ericelma e Ericely, pelas horas de descontração, risos e incentivos.

Aos amigos, Marcinha, Lobélia, Ramayara, Arcélio, Lorena, Mano, Sr. Barbosa, Socorrinha, Chiquinha, D. Socorro, Jesus e “Niel” pelo carinho, momentos juntos, apoio e incentivo em meus projetos.

A todos os parentes que mesmo distantes me apoiaram e estimularam em todos os meus projetos de vida.

Aos funcionários Sr.Manoel de Jesus, Sr. Luisinho, Raquel Teixeira e Brás, do Setor de Patologia Animal do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Piauí, pelo convívio diário e agradável.

Aos, Luis Gomes da Silva, Laelma e Vicente, funcionários da Pós-Graduação, pela atenção e prestatividade no decorrer do curso.

Aos funcionários dos Departamentos e Secretaria do Centro de Ciências Agrárias que colabaram de alguma forma, meu muito obrigada.

Aos Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) de Teresina- PI e Timon-MA, pelo apoio na execução dos trabalhos.

À Coordenação de Apoio a Pesquisa e Ensino Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pelo apoio financeiro, com a liberação de bolsas durante a vigência do nosso Mestrado.

A todos aqueles que por um momento de distração deixei de mencionar os nomes, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
2 CAPÍTULO I:	
Lesões Renais Túbulo-Intersticiais na Leishmaniose Visceral.....	13
RESUMO	13
ABSTRACT	14
2.1 INTRODUÇÃO	14
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	15
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
3 CAPÍTULO II:	
Patogenia da Nefrite Intersticial na Leishmaniose Visceral.....	33
RESUMO	33
ABSTRACT	34
3.1 INTRODUÇÃO	34
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
4 CONCLUSÕES GERAIS	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	49
ANEXO	

RESUMO

A Leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa grave que acomete o homem e os animais. A doença é causada pelo mesmo agente e se manifesta de modo semelhante no homem, no cão e no modelo experimental de hamster. Neste estudo foi avaliado o comprometimento dos túbulos e interstício renal de 55 cães infectados naturalmente por *Leishmania (L.) chagasi*, de cinco cães controles não infectados e de 32 hamsteres infectados experimentalmente e sacrificados aos 7, 15 e 90 dias pós-infecção. Amostras de tecido renal foram colhidas e processadas para análise histopatológica, imunoistoquímica, morfométrica e estudo ultra-estrutural por microscopia eletrônica de transmissão (ME). Em 11 cães foram realizadas dosagens de creatinina no soro e proteína e creatinina na urina. Seis animais revelaram proteinúria e destes, três apresentaram níveis elevados de creatinina no soro. A análise morfométrica revelou que o infiltrado inflamatório intersticial ocupava uma área maior da região cortical e da região medular nos animais infectados, comparados aos animais do grupo controle. Em hamsteres, nefrite intersticial progressiva foi observada somente nos grupos de 15 e 90 dias pós-infecção. Antígeno de *Leishmania* foi detectado tanto em células fagocíticas quanto em células epiteliais tubulares de tecido renal de cães e de hamsteres e ocupava uma área maior nos cães sintomáticos do que nos controles. Células T CD4⁺ e CD8⁺ estavam presentes em maior número nos cães infectados do que nos cães controles. A área ocupada por células T CD4⁺ foi maior nos padrões de glomerulonefrite proliferativa mesangial e glomerulonefrite de alterações mínimas, quando comparados aos casos com glomeruloesclerose segmentar focal e grupo controle. Os resultados deste estudo mostraram que lesões tubulares e intersticiais são próprias da LV e que células T participam do mecanismo da lesão túbulo- intersticial na leishmaniose visceral canina.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, nefrite intersticial, cão, hamster.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is an infectious disease that committed human and animals. The disease manifest of similar way in the human, in the dog and in the experimental model of hamster. In this study was evaluated the alteration of tubules and renal interstitium of 55 *Leishmania (L.) chagasi*-naturally infected dogs and five non-infected dogs and 32 experimentally infected hamsters sacrificed to the 7, 15 and 90 days pos-infection. Samples of renal tissue were processed to histopathological, morphometric and ultrastructural study by transmission electronic microscope. In 11 dogs were performed dosages of creatinine in the serum and protein and creatinine in the urine. Six dogs revealed elevated protein and of this, three presented elevated creatinine in the serum. The morphometric analyses revealed that the interstitial inflammatory infiltrate was higher in the cortical and medullar region in the infected animals compared to the non-infected controls. In hamsters, progressive interstitial nephritis was observed only in the groups of 15 and 90 days pos-infection. *Leishmania* antigen was present both dogs and hamsters in phagocyte cells of the mononuclear interstitial infiltrate and in tubular epithelial cells being higher in the symptomatic than asymptomatic dogs. The infiltrate of CD4+ and CD8+ T cells was higher in the infected dogs than in non-infected controls. The area with CD4+ T cells was higher in the groups with mesangial proliferative glomerulonephritis and minor glomerular abnormalities, when compared to the cases of focal segmental glomerulosclerosis and control group. These results showed that tubular and interstitial lesions are proper of the VL and T cells participate of the mechanism of tubular and interstitial injuries in canine visceral leishmaniasis.

Key-words: Visceral leishmaniasis, interstitial nephritis, dog, hamster.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa grave que acomete o homem e os animais, caracterizada por alterações mais acentuadas nos órgãos do sistema fagocítico mononuclear (SFM), onde a presença do parasito é abundante (MARZOCHI et al., 1981).

A enfermidade é causada no Brasil pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi*, parasito da família *Trypanosomatidae* pertencente ao complexo *Leishmania donovani* (MARZOCHI et al., 1981).

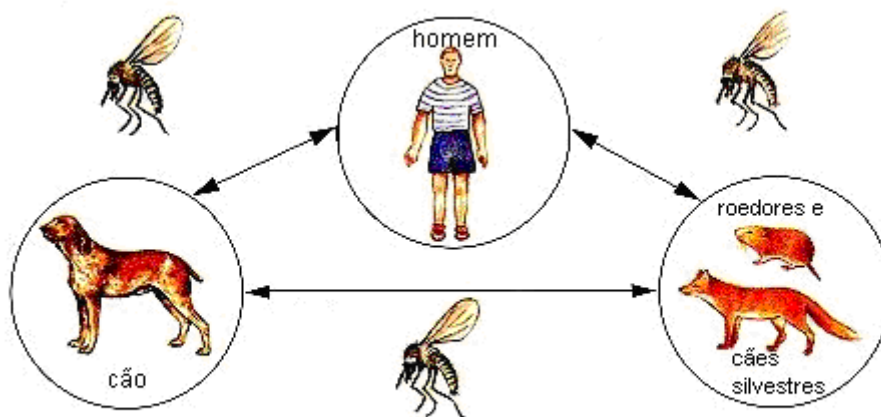
Durante o ciclo biológico, as leishmânias apresentam-se sob duas formas morfológicamente distintas. No hospedeiro vertebrado, no interior de macrófagos, encontram-se as formas amastigotas, medindo de 2 a 5 µm, arredondadas e sem flagelos. No tubo digestivo do inseto vetor, transformam-se em promastigotas, alongadas e flageladas, que evoluem para formas promastigotas metacíclicas, altamente infectantes (SACKS, 1989; WALTERS, 1993).

A transmissão do parasito ocorre durante o repasto sanguíneo do vetor infectado, que inocula promastigotas no hospedeiro. Essas formas são fagocitadas por macrófagos, transformam-se em amastigotas e proliferam-se, principalmente, nos órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), para desencadear as alterações de natureza imunológica, fisiopatológica, clínica e anátomo-patológica no hospedeiro (PEARSON, 1993). Os principais vetores da enfermidade são mosquitos flebotomíneos, pertencentes aos gêneros: *Phlebotomus*, no velho mundo e *Lutzomyia*, no novo mundo. No Brasil, a espécie incriminada na transmissão é a *Lutzomyia longipalpis* (LANZARO e WARBURG, 1995).

A leishmaniose visceral tem distribuição mundial sendo causada pela *Leishmania (L.) donovani* na Índia e no leste da África, *Leishmania (L.) infantum* na China, Ásia Central e nos países mediterrâneos da Europa e África, e *Leishmania (L.) chagasi* na América Latina (LAINSON e SHAW, 1987; BERMAN, 1997; LAINSON e SHAW, 1992).

Desde 1908, quando relataram pela primeira vez na Tunísia a presença de formas amastigotas em cães domésticos (NICOLLE e COMTE, 1908) e no Brasil

(DEANE e DEANE, 1955), quando foi observado intenso parasitismo cutâneo em cães e raposas do Ceará, os cães têm sido considerados como os principais reservatórios no ciclo doméstico da LV (SILVA et al., 2005). O vetor infectado dissemina a enfermidade para o homem e outros animais (LAINSON e SHAW, 1987) (Figura1).



FONTE: THADEI, C. L., 2007.

Figura 1. Ciclo epidemiológico da leishmaniose visceral.

A LV é considerada endêmica em 88 países, 72 em desenvolvimento e 13 desenvolvidos; 65 desses países são acometidos especificamente pela LV, com a maioria dos casos (90%) presentes em áreas pobres e suburbanas (WHO, 1998; DESJEUX, 2004), associados ou não a problemas sócio-econômicos e sanitários. A enfermidade está presente na Europa, Oriente Médio, África e Américas Central e do Sul (CARLTON e MCGAVIN, 1998) e algumas regiões dos Estados Unidos (PAPADOPOULOU et al., 2005). É endêmica em vários estados do Brasil, com destaque no Nordeste (MONTEIRO et al., 1994; ALVES e FAUSTINO, 2004), nos estados do Ceará, Bahia, Maranhão, Piauí, Rio Grande do Norte e Minas Gerais no Sudeste (FILHO et al., 2003). A LV comporta-se como uma zoonose peri-urbana e rural e no ambiente silvestre, as raposas, canídeos, roedores e marsupiais,

mantêm a forma enzoótica silvestre, na ausência do homem (MARZOCHI et al., 1981). A letalidade está próxima a 95 % nos casos não tratados. No Brasil, a incidência da doença no homem é de 3.700 casos / ano. No estado do Piauí foram registrados 123 óbitos de janeiro a julho de 2004 (ALVES e FAUSTINO, 2004) e a positividade média no cão é de 14,88% (FMS, 2006).

Dentre os fatores predisponentes na manifestação da doença, a má nutrição, é freqüentemente observada, o que contribui muito para a depressão da resposta imune celular e a virulência do parasito no hospedeiro (BADARÓ, 1986; PEARSON e SOUSA, 1996). No Nordeste, a pobreza e a subnutrição são fatores que se destacam na população humana, apresentando reflexos na população canina (ALVES e FAUSTINO, 2004).

As leishmanioses vêm constituindo-se atualmente, em um crescente e importante problema de saúde pública, devido a sua prevalência elevada, associada a expansão para novas áreas; à resistência dos vetores aos inseticidas utilizados; às altas taxas de mortalidade e à sua repercussão sócio-econômica. A ocorrência da doença em novas áreas geográficas e sua urbanização, observadas em algumas capitais da região sudeste do Brasil, como Minas Gerais, Rio de Janeiro e, mais recentemente, São Paulo; bem como na região Nordeste, em cidades como Teresina, Fortaleza, São Luís e Natal, têm causado grande preocupação (BRANDÃO-FILHO e SHAW, 1994). No Estado de São Paulo, no período de 1998 a 2000 foram registrados 23 casos da doença no homem no município de Araçatuba e dois em Birigui (REICHMANN, 2006). Por sua repercussão social, a LV foi incluída entre as seis doenças negligenciadas, tropicais e endêmicas mais importantes (WHO, 1998).

A Fundação Nacional de Saúde (FNS) adota no Brasil, como medida de controle da doença em áreas endêmicas, a eliminação de cães soropositivos; a aplicação de inseticidas no combate ao vetor, e o tratamento da doença no homem. Essa estratégia tem apresentado controvérsias pelos resultados obtidos, principalmente quando relacionados ao cão. Um dos aspectos do insucesso no controle são os critérios na seleção de cães a serem eliminados, baseados em testes com baixa sensibilidade e especificidade, acarretando números subestimados e permitindo a manutenção de animais infectados em áreas endêmicas (SILVA et al., 2005).

A doença é causada pelo mesmo agente e se manifesta de modo semelhante no homem, no cão (KEENAN et al., 1984; DUARTE, 2000) e no modelo experimental de hamster (CARLYLE, 2000; MATHIAS et al., 2001).

No cão, a infecção pode ser assintomática com ausência de sinais; oligossintomática, com sinais inespecíficos (adenopatia, perda de peso e esplenomegalia leve) (POZIO et al., 1981); ou sintomática, caracterizada por hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, hiporexia, perda de peso, linfadenopatia local ou generalizada, onicogribose, lesões cutâneas e oculares (ceratoconjuntivite, úlcera de córnea, hifema e conjuntivite), epistaxe, claudicação, anemia, insuficiência renal, diarreia (FERRER, 1999), descamação furfurácea da pele, febre, apatia, edema de extremidades, paralisia dos membros posteriores (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997) e comprometimento generalizado (POZIO et al., 1981).

A LV é considerada uma doença imunomediada, devido à formação de altos níveis de anticorpos e imunocomplexos circulantes que se depositam em vários órgãos, causando vasculite, uveíte, glomerulonefrite e artrite. (ALVES e FAUSTINO, 2004). O hamster experimentalmente infectado manifesta sinais clínicos, na sua forma clássica, semelhantes aos observados no cão, apresentado hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, adenopatia, esplenomegalia e hepatomegalia. Dentre os achados macroscópicos da LV é observada, emaciação intensa, linfonodos, baço e fígado aumentados e em alguns casos, palidez das mucosas e superfícies serosas e úlceras intestinais (CARLYLE, 2000).

A infecção leishmaniótica canina pode permanecer latente por certo período, com raros casos de cura espontânea, ao contrário do que se observa nos casos em animais sintomáticos, com quadro agudo e grave, levando à morte dentro de semanas (ETTINGER et al., 1997; BRASIL, 2004).

A imunossupressão, causada pela infecção, ao acometer às espécies susceptíveis faz com que o parasito se distribua, também, para órgãos que não pertencem ao sistema fagocítico mononuclear (SFM) (NICKOL e BONVENTRE, 1985). Nos rins, apesar de ser rara a presença de parasitos, as lesões são freqüentes tanto no homem (ANDRADE e IABUKI, 1972; DUARTE et al., 1983; DUTRA et al., 1985) quanto no cão

(BENDERITTER et al., 1988; MACIANTI et al., 1989; POLI et al., 1991) e no modelo experimental de hamster (MATHIAS et al., 2001), levando a nefrite intersticial e glomerulonefrite, principalmente, do tipo proliferativa; lesões que podem desencadear proteinúria, hematúria e aumento dos níveis de uréia e creatinina (ETTINGER, 1997; COSTA et al., 2003).

A nefrite intersticial é uma alteração importante (OLSEN et al., 1986), pois parece existir uma correlação maior entre o comprometimento da função renal e as alterações túbulo-intersticiais, do que com as lesões glomerulares (BOHLE et al., 1987). Corresponde a uma reação inflamatória do interstício e túbulos renais, caracterizada por infiltração de células exógenas mononucleares, degeneração e necrose do epitélio tubular e, dependendo da gravidade e duração da injúria, a lesão pode progredir para uma nefrite intersticial crônica (NIC), caracterizada por uma significativa fibrose intersticial, ausência e dilatação de túbulos (CARLYLE, 2000). Contudo, no caso particular da leishmaniose visceral, a interferência de outros fatores não deixa claro se a lesão túbulo-intersticial que se instala no homem e em animais infectados é específica da LV, pois, no decorrer da vida, a exposição dos rins a drogas (LINTON et al., 1980) e outras enfermidades (TISHER e BRENNER, 1994; KOOTSTRA et al., 1998) que fogem ao controle em casos de infecção natural por *Leishmania (L.) chagasi*, é causa freqüente de lesões renais que podem ocorrer concomitantemente à nefrite intersticial devida à LV.

Muitas pesquisas mostram que a maioria das doenças renais são imunologicamente mediadas (McCLUSKEY e BHAN, 1982). Apesar disso o tipo de mediação imunológica, seja por ativação da resposta imune humoral (WEISINGER et al., 1978), seja por ativação da resposta imune celular (FILLIT e ZABRISKIE, 1982; van ALDERWEGEN et al., 1997) ou pela participação de macrófagos (VILA FRANCA et al., 1994) e apoptose de células renais (BAKER et al., 1994; SHIMIZU et al., 1996), ainda não é bem conhecida. Como na imunidade humoral o mecanismo imune celular pode causar injúria local de tecidos (FILLIT e ZABRISKIE, 1982).

Pesquisas recentes sobre os mecanismos patogênicos das nefropatias revelam a participação de células T na patogênese da doença renal (KELLY, 1997; COSTA et al., 2001). O emprego de anticorpos monoclonais específicos tem possibilitado a identificação de populações de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no tecido renal (BOUCHER et

al., 1986). Estas células são necessárias para a indução da resposta humoral e ao mesmo tempo são necessárias para a defesa e eliminação de patógenos extracelulares e intracelulares (ABBAS et al., 1997).

Apesar de alguns estudos sobre nefropatias, ainda não há uma definição clara dos aspectos morfológicos e dos elementos que participam do mecanismo de lesão renal na leishmaniose visceral canina (COSTA et al., 2001), especificamente na nefrite intersticial. Desse modo o estudo da nefrite intersticial em cães naturalmente infectados e em hamster infectados experimentalmente pela *Leishmania (L.) chagasi*, pode trazer contribuições importantes sobre os aspectos imunopatogênicos da nefropatia da LV canina e em modelo experimental que, num futuro, poderão ser validados para o homem, tendo em vista a semelhança do problema no homem e no cão.

Este estudo teve como objetivo analisar as alterações túbulo-intersticiais e investigar a patogênese da nefrite intersticial em cães infectados naturalmente e em hamsters infectados experimentalmente por *Leishmania (L.) chagasi*, de modo a classificar as lesões, identificar populações celulares, a dinâmica da evolução das alterações e seus reflexos sobre a função renal.

Esta dissertação apresenta a seguinte estrutura formal: resumo geral, seguido de abstract, uma introdução abrangendo revisão de literatura e objetivos; dois capítulos contendo artigos completos; um intitulado “**Lesões Renais Túbulo- Intersticiais na Leishmaniose Visceral**”, e outro com o título “**Patogenia da Nefrite Intersticial na Leishmaniose Visceral**”, encaminhados para publicação na revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, estruturados de acordo com as normas da revista; considerações finais e referências bibliográficas gerais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 3 ed. Philadelphia:W.B. Saunders, p.494, 1997.

ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. G. **Leishmaniose Visceral Canina**. Schering – Plough. Departamento de Medicina veterinária, UFRP. Recife, p.3-8, 2004.

ANDRADE, Z. A; IABUKI, K. A nefropatia do calazar. **Revista do Instituto de Medicina Tropical. São Paulo**, v.14, n.1, p.51-54, 1972.

BADARÓ, R.; JONES, T. C.; LOURENÇO, R. et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v.154, p.639-649, 1986.

BAKER, A. J.; MOONEY, A.; HUGHES, J. et al. Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. **Journal Clinical Investigation**, v.94, n.5, p.2105-2116, 1994.

BENDERITTER, T. H.; CASANOVA, P.; NASHKIDACHVILI, L. et al. Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. **Annual Tropical Medical Parasitology**, v.82, n.4, p.335-341, 1988.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic development in the last years. **Clinical of Infectious Diseases**, v.24, p.684-703, 1997.

BOHLE, A.; MACKENSEN-HAEN, S.; GISE, H. V. Significance of tubulointerstitial changes in the renal cortex for the excretory function and concentration ability of the kidney: a morphometric contribution. **American Journal of Nephrology**, v.7, p.421-33, 1987.

BOUCHER, A.; DROZ, D.; ADAFER, E. et al. Characterization of mononuclear cell subsets in renal cellular interstitial infiltrates. **Kidney International**, v.29, p.1043-1049, 1986.

BRANDÃO-FILHO, S.; SHAW, J. Leishmaniasis in Brasil. **Parasitology Today**, v.10, n.9, p.329-330, 1994.

BRASIL, 2004. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Ministério da Saúde (MS) Secretaria de vigilância em Saúde (SVS). Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília. DF. 2004.

CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, p.343, 1998.

CARLYLE, T. J.; DUNCAN, R. H; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6.ed. Manole, cap.24, p.599-1149, 2000.

COSTA, F. A. L. Patologia e Imunopatogenia da nefropatia da Leishmaniose visceral canina. 2001.129 f. **Tese** (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, São Paulo.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa *Lycalopex vetulus* como reservatórios da *L. donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. **Hospital**, v.48, p.61-70, 1955.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.27, p.307, 2004.

DUARTE, M. I. S.; SILVA, M. R.; GOTO, H. et al. Interstitial nephritis in human Kala-azar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.77, n.4, p.531-537, 1983.

DUARTE, M. I. S. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Leishmaniose visceral (Calazar). In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p.1215-1275.

DUTRA, M.; MARTINELLI, R.; CARVALHO, E. M. et al. Renal involvement in visceral leishmaniasis. **American Journal of Kidney Disease**, v.6, n.1, p.22-27, 1985.

ETTINGER, S. J., FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: moléstia de cão e do gato**. 4ª ed. São Paulo: Manole, v.2, p.3020, 1997.

EVANS, T. G.; SMITH, D.; PEARSON, R. D. Humoral factors and nonspecific immune suppression in Syrian hamsters infected with *Leishmania donovani*. **Journal Parasitology**, v.76, p.212-217, 1990.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. **Proceedings of the International canine Leishmaniasis Forum**. Barcelona, Spain, p.6-10, 1999.

FILHO, N. S.; TELMA, M. A. F. F.; COSTA, J. M. L. Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36, n.2, p.1-9, 2003.

FILLIT, H. M.; ZABRISKIE, J. B. Cellular immunity in glomerulonephritis. **American Association of Pathologists**, v.109, n.2, p.227-243, 1982.

FUNDAÇÃO MUNICIPAL DE SAÚDE. **Centro de controle de Zoonoses**. Teresina-PI, 1998.

FUNDAÇÃO MUNICIPAL DE SAÚDE. **Centro de Controle de Zoonoses**. Teresina-PI, 2006.

KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; LIGHTNER, L. et al. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog: II. Pathology. **Veterinary Pathology**, v.21, p.80, 1984.

KELLY, C. J. Development and Expression of nephritogenic T cells. IN: NEILSON, E. G.; COUSER, W. G. **Immunologic renal diseases**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p.251-263, 1997.

KOOTSTRA, C. J.; SUTMULLER, M.; BAELDE, H. J. et al. Association between leukocyte infiltration and development of glomerulosclerosis in experimental lupus nephritis. **Journal of Pathology**, v.184, p.219-25, 1998.

LAINSON, R e SHAW, J. J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brasil. **Ciência e Cultura**, v.44, n.2-3, 1992.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. IN: PETERS, W.; LILLICK-KENDRICK, R. **Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press, p.120, 1987.

LANZARO, G. C.; WARBURG, A. Genetic variability in phlebotomine sandflies : possible implications for leishmaniasis epidemiology. **Parasitology Today**, v.11, n.4, p.151- 154, 1995.

LINTON, A. L.; CLARK, W. F.; DRIEDGER, A. A. et al. M. Acute interstitial nephritis due to drugs. Review of the literature with a report of nine cases. **Annals of Internal Medicine**, v.93, p.735-41, 1980.

MACIANTI, F.; POLI, A.; BIONDA, A. Analysis of renal immune- deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. **Parasitology**, v.31, n.2-3, p.213-230, 1989.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S. et al. Leishmaniose visceral – Calazar. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.41, n.5, p.69-70, 1981.

MATHIAS, S. R.; COSTA, F. A. L.; GOTO, H. Detection of immunoglobulin in the lung and in the liver during visceral leishmaniasis in hamsters. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, n.3, p.340-55, 2001.

McCLUSKEY, R. T.; BHAN, A. K. Cell-mediated mechanism in renal diseases. **Kidney International**, v.21, p.2-6, 1982. Sup. 11.

MONTEIRO, P. S.; LACERDA, M. M.; ARIAS, J. R. Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.27, p.67, 1994. Suplemento III.

NICKOL, A. D.; BONVENTRE, P. F. Immunossuppression associated with visceral leishmaniasis of hamsters. **Parasite Immunology**, v.7, p.439-449, 1985.

NICOLLE, C.; COMTE, C. **Origine du Kala-azar**. *CRL' Acad Sci*; 146:789, 1908.

OLSEN, T. S.; WASSEF, N. F.; OLSEN, H. S. et al. Ultrastructure of the kidney in acute interstitial nephritis. **Ultrastructural Pathology**, v.10, p.1-16, 1986.

PAPADOPOULOU, C.; KOSTOULA, A.; DIMITRIOU, D. et al. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwatern. **Journal of Infection**, v.50, p.53-60, 2005.

PEARSON, R. D. Pathology of leishmaniasis. In: WARREN, K. S. **Immunology and molecular biology of parasitic infections**. Massachusetts, Blackwell Scientific Publications, 1993, p.71-86.

PEARSON, R. D.; SOUSA, Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical of Infections Diseases**, v.22, p.1-13, 1996.

POLI, A.; ABRAMO, F.; MANCIANTI, et al. Renal involvement in canine leishmaniasis: a light- microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. **Nephron**, v.57, n.4, p.444-452, 1991.

POZIO, E.; GRANDONI, L.; GRAMICCIA, M. et al. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). **Acta Tropical**, v.38, p.383-393, 1981.

REICHMANN, M. L. A. B. Leishmaniose visceral canina como zoonose reemergente. 1º Fórum sobre leishmaniose visceral canina. **Anais**. Jaboticabal-SP, 2006.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania promastigotas*. **Experimental Parasitology**, v.69, p.100-103, 1989.

SANTA ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, v.2, n.11, p.24-28, 1997.

SHIMIZU, A.; MASUDA, Y; KITAMURA, H. et al. Apoptosis in progressive crescentic glomerulonephritis. **Laboratory Investigation**, v.74, n.5, p.941, 1996.

SILVA, A. V. M.; PAULA, A. A.; CABRERA, M. A. A. et al. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21, n.1, p.324-328, 2005.

THADEI, C. L. **Leishmaniose (Calazar)**. Disponível em: < <http://www.viralata.org/doc2.shtml>>. Acessado em: 14 set. 2007.

TISHER, C. C.; BRENNER, B. M. **Renal pathology with clinical and functional correlations**, 2.ed. v.1., J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1994, 978p.

Van ALDERWEGEN, I. A.; BARRETO, A. C.; ROSA, A. C. et al. Natural infection of *Equus asinus* by *Leishmania braziliensis brasiliensis*-Bahia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, p.237-238, 1986.

VILAFRANCA, M.; FERRER, L.; WOHLSEIN, P. et al. Participation of monocytes and macrophages in canine glomerular disease, **Journal Veterinary Medicine**, v.41, p.770-779, 1994.

WALTERS, L. L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. **J. EUK. Microbiology**, v.40, p.196-206, 1993.

WEISINGER, J. R.; PINTO, A.; VELAZQUEZ, G. A. et al. Clinical and histological kidney involvement in human kala-azar. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.27, n.2, p.357-359, 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Division of control of tropical disease. Leishmaniasis control**. WHO/CTD, 1998. Disponível em: <<http://www.who.int/ctd/html/leisgeo.html>> Em : 03, nov. 2005.

CAPÍTULO 1

Lesões Renais Túbulo - Intersticiais na Leishmaniose Visceral¹

Renal Lesions in Tubule and Interstitium in Visceral Leishmaniasis

Leopoldina Almeida *Gomes*²; Hiro *Goto*³; José Luiz *Guerra*⁴; Ana Lys Barradas *Mineiro*⁵; Silvana Maria Medeiros de Sousa *Silva*⁶; Francisco Assis Lima *Costa*^{6*}

¹ Parte da dissertação de Mestrado em Ciência Animal – CCA – UFPI

² Mestre em Ciência Animal – CCA – UFPI

³ Departamento de Medicina Preventiva, Faculdade de Medicina e Instituto de Medicina Tropical- USP

⁴ Departamento de Patologia Experimental e Comparada, FMVZ-USP

⁵ Doutoranda em Ciência Animal - CCA-UFPI

⁶ Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí
Campus da Socopo, 64046-550 Teresina-PI

RESUMO

A Leishmaniose visceral (LV) é causada no Brasil pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi*. O parasito acomete principalmente órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, mas outros órgãos também podem ser comprometidos, dentre eles, os rins. Neste estudo foi avaliado o comprometimento tubular e intersticial renal de 55 cães infectados naturalmente por *Leishmania (L.) chagasi*, de cinco cães controles não infectados e de 32 hamsters infectados experimentalmente e sacrificados aos 7, 15 e 90 dias pós-infecção. Amostras de tecido renal foram colhidas e processadas para análise histopatológica, análise morfométrica e estudo ultra-estrutural por microscopia eletrônica de transmissão. Em 11 cães foram realizadas dosagens de creatinina no soro e proteína e creatinina na urina. Nefrite intersticial foi observada em 45 e lesões tubulares em 51 cães, em intensidade variando de mínima a severa. A análise morfométrica revelou que o infiltrado inflamatório intersticial ocupava uma área maior nas regiões cortical e medular nos animais infectados, comparados aos animais do grupo controle. A área de infiltrado inflamatório foi maior nos cães com glomerulonefrite membranoproliferativa e glomerulonefrite de alterações mínimas. Em hamster, nefrite intersticial progressiva foi observada somente nos grupos de 15 e 90 dias pós-infecção. Dos 11 cães em que foram realizadas prova de função renal, seis revelaram proteinúria e destes, três apresentaram níveis elevados de creatinina no soro. Os resultados deste estudo mostraram que lesões tubulares e intersticiais renais são próprias da leishmaniose visceral, progridem com o tempo de infecção e podem provocar perda da função renal.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, nefrite intersticial, cão, hamster.

* Autor para Correspondência – E-mail fassisle@ufpi.br

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (LV) is a disease caused by *Leishmania (Leishmania) chagasi* which affect, mainly, organs of the mononuclear phagocyte system, but other organs can also be compromised, including the kidneys. In this study was evaluated the alteration of tubules and renal interstitium of 55 naturally infected dogs by *Leishmania (L.) chagasi* and five non-infected dogs and 32 experimentally infected hamsters, sacrificed to the 7, 15 and 90 days pos-infection. Samples of renal tissue were processed to histopathologic, morphometric and ultrastructural study by transmission electronic microscope. In 11 dogs were performed dosages of creatinine in the serum and protein and creatinine in the urine. Interstitial nephritis was observed in 45 and tubular injuries in 51 dogs of minimum to severe intensity. The morphometric analyses revealed that the interstitial inflammatory infiltrate was higher in the cortical and medullar region in the infected animals compared to the non-infected controls. The area of interstitial inflammatory infiltrate was higher in the dogs with membranoproliferative glomerulonephritis and minor glomerular abnormalities. In hamsters, progressive interstitial nephritis was observed only in the groups of 15 and 90 days pos-infection. Prove of renal function revealed protein in the urine in six dogs and of these three present elevated levels of creatinine in the serum. The results of this study showed that tubular and interstitial injuries are proper of the visceral leishmaniasis, progress with the time of infection and can cause loss of the renal function.

Keywords: Visceral leishmaniasis, interstitial nephritis, dog, hamster.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada no Brasil pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Lainson e Shaw, 1987). Após a infecção inicial o parasito dissemina-se pelo organismo, comprometendo, principalmente, órgãos do sistema fagocítico mononuclear (SFM), onde a presença do parasito é abundante (Marzochi et al., 1981), mas outros órgãos também são comprometidos, embora a presença do parasito seja escassa (Duarte, 2000).

Na nefropatia da LV, apesar da rara presença de parasitos nos rins, as lesões são freqüentes tanto no homem (Andrade e Iabuki, 1972; Duarte et al., 1983; Dutra et al., 1985) quanto no cão (Benderitter et al., 1988; Macianti et al., 1989; Poli et al., 1991; Costa et al., 2003) e no modelo experimental de hamster (Mathias et al., 2001). O comprometimento renal pode levar à proteinúria, hematúria e ao aumento dos níveis de uréia e creatinina (Ettinger, 1997).

Apesar das evidências do comprometimento renal na LV e dos conhecimentos até então acumulados sobre as nefropatias, pouco sabemos a respeito das alterações renais túbulo-intersticiais, em seus aspectos histopatológicos, morfométricos e ultra-estruturais (Caravaca et al., 1991).

A nefrite intersticial, do ponto de vista fisiopatológico, é uma alteração importante (Olsen et al., 1986), pois parece existir uma maior correlação entre o comprometimento da função renal e as alterações túbulo-intersticiais, do que entre o comprometimento da função renal e as lesões glomerulares (Bohle et al., 1987). Contudo, no caso particular da leishmaniose visceral, a interferência de outros fatores não deixa claro se a lesão túbulo-intersticial é específica da enfermidade, pois, no decorrer da vida do homem e dos animais, a exposição dos rins a drogas (Linton et al., 1980) e outras enfermidades (Tisher e Brenner, 1994; Kootstra et al., 1998), que fogem ao controle em casos de infecção natural por *Leishmania (L.) chagasi*, é causa frequente de lesões renais, que podem ocorrer concomitantemente à nefrite intersticial devida à LV.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as alterações túbulo-intersticiais do rim de cães naturalmente infectados e de hamsters experimentalmente infectados pela *Leishmania (L.) chagasi*, de modo a classificar as lesões, avaliar sua extensão, seus reflexos sobre a função renal e a dinâmica da evolução das alterações.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foi analisado tecido renal de 60 cães, dos quais 55 apresentavam-se naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi* e cinco controles não infectados. Os animais eram todos adultos, machos ou fêmeas, de idades e raças diferentes, e muitos sem raça definida, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses do município de Teresina no estado do Piauí e selecionados de uma população estimada em 61.536 cães em 1998 (Fundação Municipal de Saúde, 1998), quando esse material foi colhido para realização de estudo sobre nefropatia da leishmaniose visceral canina, com enfoque sobre glomerulonefrite (Costa et al., 2003).

Foram analisados também tecidos renal de hamsters (*Mesocricetus auratus*), infectados por inoculação intraperitoneal com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*, amostra MHOM/BR/72/cepa 46 e sacrificados aos 7, 15 e 90 dias pós-

infecção. Os grupos foram compostos, respectivamente, por oito, seis e oito animais, com idades entre 45 e 60 dias, mantidos no biotério do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (CCA/UFPI).

O diagnóstico de leishmaniose visceral canina (LVC) foi confirmado pela detecção de anticorpos anti-*Leishmania* no soro, por teste de imunofluorescência indireta (Collins, 1995) e ELISA (Evans et al., 1990) e exame parasitológico em esfregaço de pele, baço e linfonodo poplíteo e cultura de material da medula óssea esternal, baço e linfonodo poplíteo (Evans et al., 1990; Berman, 1997). De dois animais, foram isoladas leishmânias e enviadas ao Instituto Evandro Chagas de Belém do Pará para caracterização do parasito, por meio de anticorpos monoclonais. Em hamsters, o diagnóstico de LV foi determinado pela presença de amastigotas em esfregaços de baço e fígado corados por Giemsa.

Foram realizadas dosagens bioquímicas no soro utilizando kits do LABTEST (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil). A concentração de proteína na urina foi avaliada pelo método de Bradford modificado (Bradford, 1976) e com o uso do “kit” LABTEST (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) foram avaliadas as concentrações de creatinina (catálogo N°35) e colesterol (catálogo N°60) no sangue e creatinina na urina (catálogo N°35).

Os fragmentos de rins foram fixados em Duboscq-Brasil por 60 minutos e posteriormente conservados em formol a 10% tamponado com fosfato 0,01M pH 7,4 (formol tamponado) e posteriormente processados segundo técnicas de rotina e os cortes corados com hematoxilina-eosina (H-E), ácido periódico de Schiff (PAS), tricrômico de Masson (TM), ácido periódico prata metanamine (PAMS) e vermelho-congo (VC).

Cortes de rim de cães de aproximadamente 3 a 4 µm de espessura, corados com H-E, foram submetidos a análise morfométrica 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 de 20 a 127 campos por corte de tecido renal de cada animal, tanto da região cortical quanto da região medular. Desse total, foram selecionados, aleatoriamente, de 20 a 50 campos por fragmento de tecido renal e por animal, para análise morfométrica do infiltrado inflamatório intersticial em cães controles não infectados e cães com padrões diversos de glomerulonefrite, previamente diagnosticadas e descritas por Costa et al. (2003):

glomerulonefrite de alterações mínimas (GNAM), glomeruloesclerose segmentar focal (GESF), glomerulonefrite proliferativa mesangial (GNPM) e glomerulonefrite membranoproliferativa (GNMP). Nos campos selecionados foram mensuradas as áreas correspondentes à presença de células inflamatórias em comparação à área total de cada campo, previamente definida pelo programa de análise de imagem.

Tecido renal de cães e de hamsters foram submetidos, também, à técnica de imunohistoquímica, utilizando anticorpo policlonal de camundongo anti-*Leishmania (L.) amazonensis* e o sistema de amplificação “Catalyzed Signal Amplification (CSA), system” e “EnVision, peroxidase” (Dako Corporation, código K4000, Carpinteria, USA). A revelação foi feita com 0.3 mg/ml 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) em PBS e a contracoloração com hematoxilina de Harrys.

Na avaliação histopatológica, ao microscópio óptico, foram analisadas as alterações renais túbulo-intersticiais de cães infectados naturalmente pela *Leishmania (L.) chagasi* e controles, de forma semi-quantitativa, de acordo com a localização, distribuição e intensidade das lesões, numa escala de 0 a 5, onde 0 = normal, 1 = mínima ou duvidosa; 2 = média; 3 = moderada; 4 = moderadamente severa; 5 = severa (Tisher e Brenner, 1994).

Tecido renal de cão foi fixado em glutaraldeído a 2% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7.4, posteriormente pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%, lavados em solução salina e incubados “overnight” em solução aquosa de acetato de uranila a 0,5%. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona e embebidas em araldite 502 (Polysciences, Warrington, PA). Os cortes ultrafinos foram corados com citrato e acetato de uranila para análise em microscópio eletrônico de transmissão (Modelo E.M. 201, Philips).

Os resultados quantitativos e semi-quantitativos foram analisados no programa estatístico Sigma Stat, por testes não-paramétricos: a) método de Kruskal-Wallis para análise de variância; b) método de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos. Havendo diferença significativa, aplicava-se o teste de Dunn, para comparação múltipla de grupos. Adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 55 animais positivos para LVC, 33 apresentaram manifestações clínicas e revelaram dentre elas, lesões cutâneas (alopecia, eczemas furfuráceos, escabioses, úlceras), conjuntivite, onicogrifose; outros oligossintomáticos apresentaram somente aumento dos linfonodos poplíteos, emagrecimento, apatia, febre e alguns assintomáticos, de acordo com a classificação de Pozio et al. (1981).

Anticorpos anti-*Leishmania* foram detectados em todos os cães, exceto no grupo controle, e o título variou de 1:40 a 1:1280. A titulação de anticorpos não apresentou relação com as manifestações clínicas da enfermidade, pois animais com baixa titulação apresentavam sintomas evidentes da doença e animais com alta titulação apresentavam poucos sintomas ou eram assintomáticos. A presença de *Leishmania* foi observada em esfregaços de linfonodos poplíteos ou medula óssea esternal de cães com sorologia positiva para LV e em esfregaços de baço e fígado de hamsters. Nos animais controles, não foram detectados leishmânias. De dois cães, leishmânias foram recuperadas, cultivadas e caracterizadas como *Leishmania (L.) chagasi*, pelo Instituto Evandro Chagas de Belém do Pará.

Nos 11 animais nos quais foram avaliados a função renal, seis (54,5%) revelaram proteinúria elevada (taxa de proteína: creatinina > 1,0); três mostraram creatinina no soro elevada (creatinina > 1,0 g/dl) e, em somente dois casos, foram observadas taxas elevadas de colesterol (colesterol > 210,0 g/dl). Esses resultados foram encontrados por Costa et al. (2003) que utilizou os mesmos cães que fizeram parte deste estudo sobre nefrite intersticial. Nos casos com proteinúria, creatinemia e hipercolesterolemia, nefrite intersticial e alterações tubulares, também, estavam presentes. Na ausência de nefrite intersticial e alterações tubulares, mesmo com presença de glomerulonefrite, não havia alterações da função renal, conforme revelado pelas provas de função renal. A literatura registra que em injúrias do tecido renal, é observada uma maior relação entre as alterações túbulo-intersticiais e a presença de insuficiência renal do que entre a severidade da lesão glomerular e o comprometimento da função excretora do rim (Bohle et al., 1987). No presente estudo esta relação foi observada. Os casos controles não infectados não apresentaram alterações nos parâmetros bioquímicos analisados.

Dentre as lesões túbulo-intersticiais observadas no estudo histopatológico, dos 60 animais, somente dois (3,3%) não apresentaram alterações. 45 (75,0 %) casos apresentaram nefrite intersticial e 51 (85 %) apresentaram alterações tubulares. Lesões simultâneas de nefrite intersticial e lesões tubulares foram observadas em 49 (81,7%) animais. As alterações nos casos controles limitaram-se a um infiltrado de células inflamatórias intersticiais de intensidade mínima. As lesões observadas nos cães infectados, variaram de intensidade mínima a severa e consistiram de congestão e reação inflamatória intersticial com presença, predominante, de células mononucleares, caracterizadas como macrófagos, linfócitos e, mais raramente, células plasmáticas; eram de distribuição focal nas regiões cortical, córtico-medular e medular. As lesões localizavam-se abaixo da cápsula renal, nas regiões peritubular, intertubular, periglomerular e perivascular (Fig.1).

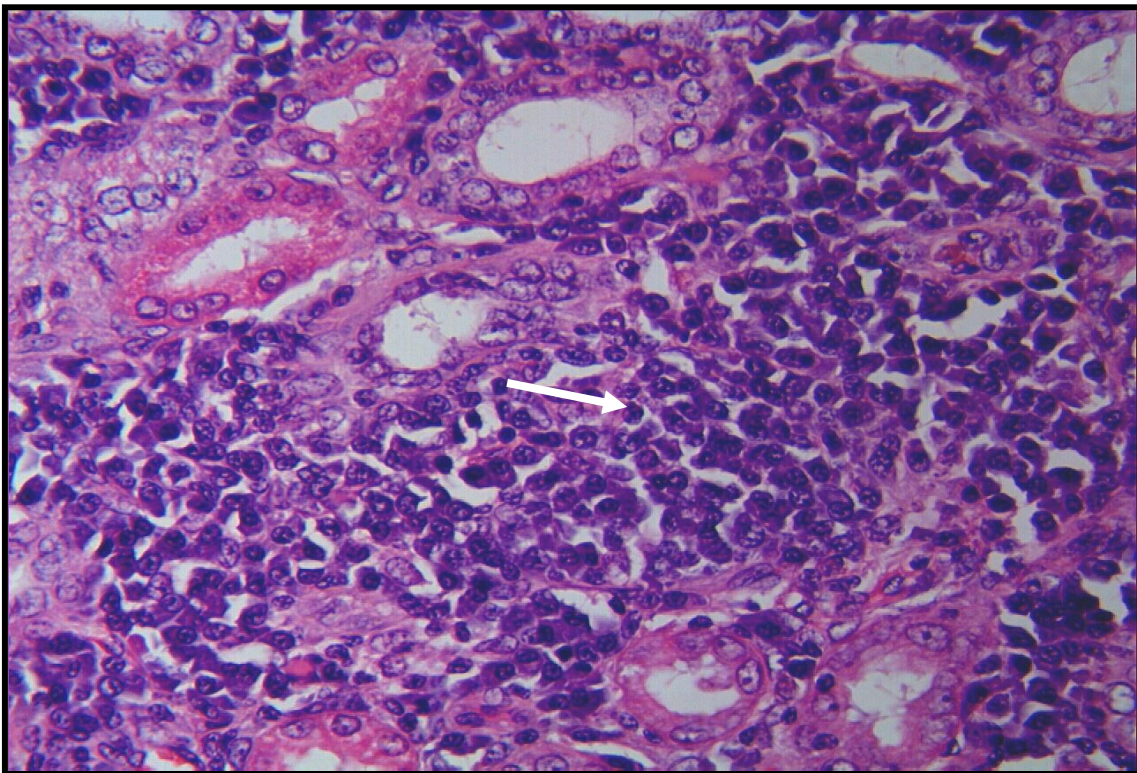


Figura 1. Rim. Cão infectado naturalmente pela *Leishmania (L.) chagasi*. Infiltrado inflamatório intersticial de células mononucleares, intertubular, de intensidade severa (seta). H-E. 140 x.

Células polimorfonucleares foram observadas em quantidade mínima. Somente em dois casos o infiltrado inflamatório mononuclear era severo e apresentava-se com

distribuição difusa. Na maioria dos casos, os focos inflamatórios apresentavam-se intercalados por regiões de fibrose intertubular e perivascular na região cortical (Fig.2) e raros casos de calcificação dos túbulos coletores na região medular.

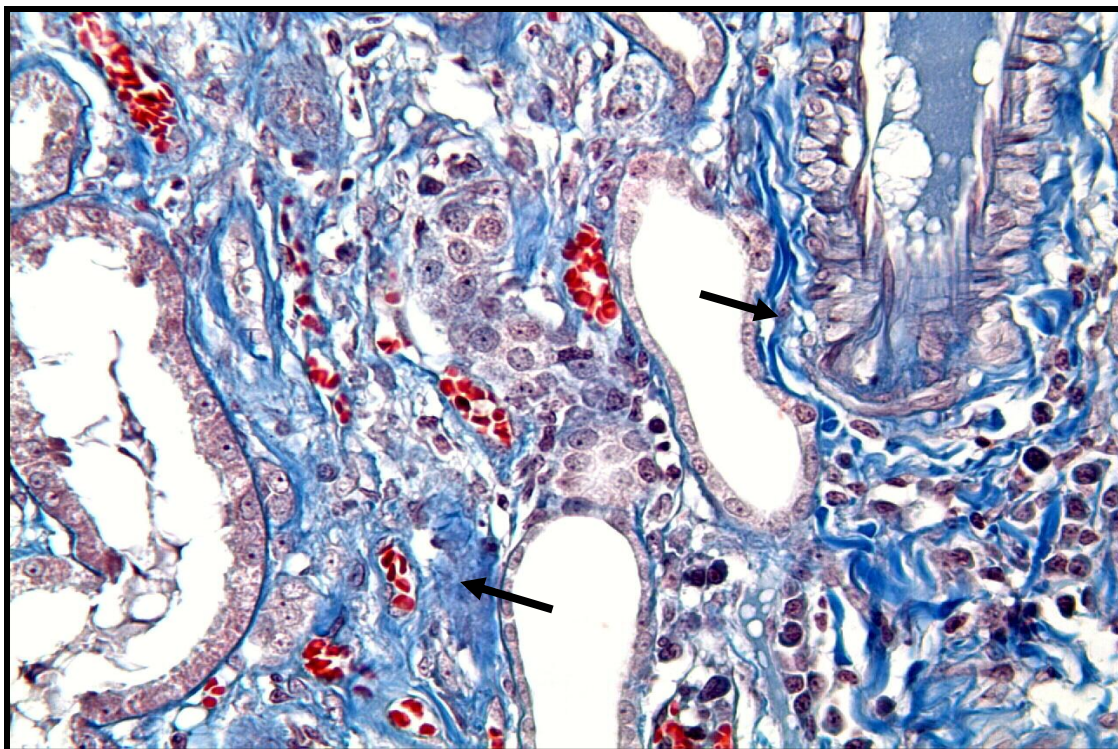


Figura 2. Rim. Cão infectado naturalmente pela *Leishmania (L.) chagasi*. Proliferação de tecido conjuntivo intersticial na cortical, de intensidade severa (setas). TM. 140 x.

Dos 51 animais com alterações tubulares, três (5%) apresentaram calcificação, vinte e cinco (41,6%) apresentaram degeneração hialina goticular, trinta e cinco (58,2%) apresentaram cilindros hialinos (Fig.3), vinte e oito (46,6%) degeneração hidrópica (Fig.4), trinta e oito (63,2%) atrofia tubular (Fig.5) e sete (11,6%) com dilatação tubular.

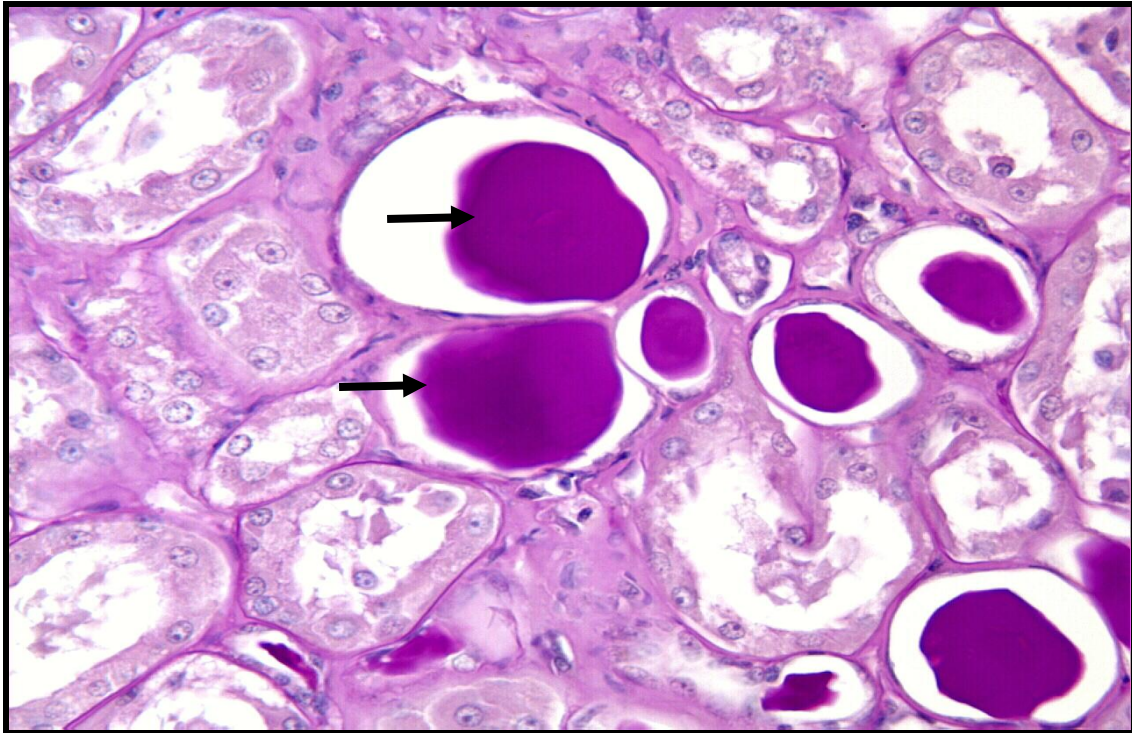


Figura 3. Rim. Cão infectado naturalmente pela *Leishmania (L.) chagasi*. Presença de cilindros hialinos (setas) em túbulos renais. PAS. 140 x.



Figura 4. Rim. Cão infectado naturalmente pela *Leishmania (L.) chagasi*. Células epiteliais tubulares com degeneração hidrópica (setas). PAS. 140 x.

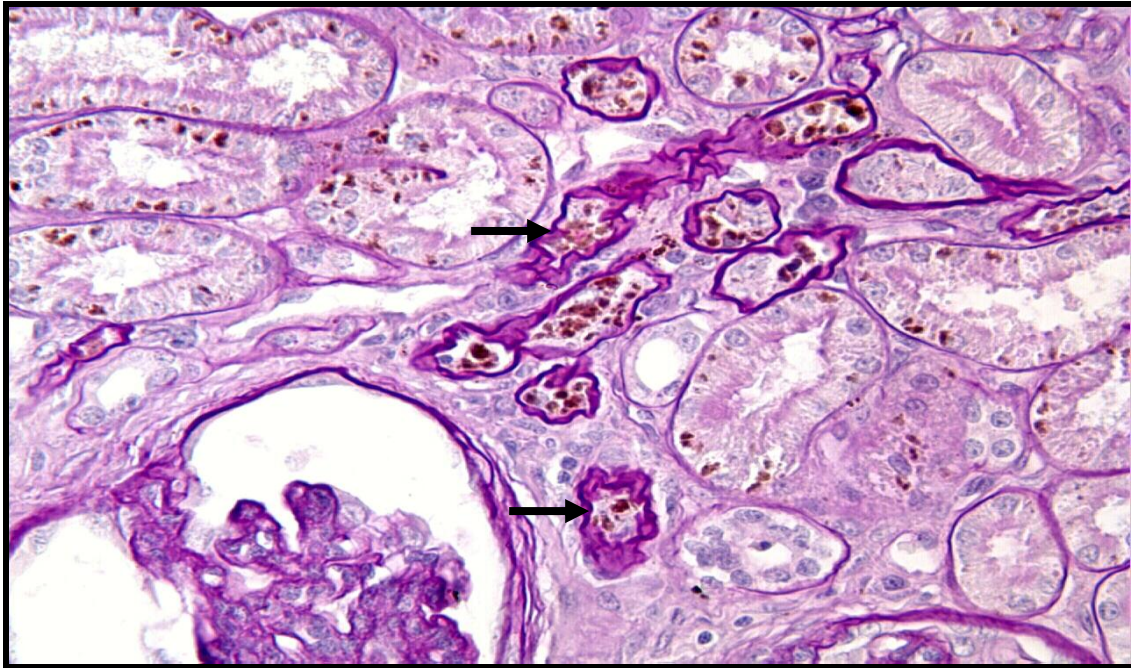


Figura 5. Rim. Cão infectado naturalmente pela *Leishmania (L.) chagasi*. Atrofia de túbulos renais (setas). PAS. 140 x.

A análise ultra-estrutural do interstício renal de cão revelou a presença de fibroblastos em atividade com produção de fibras colágenas e presença de células necróticas (Fig.6). No epitélio dos túbulos proximais foi observado a presença de material eletro-denso (gotas protéicas) (Fig.7) e edema de mitocôndria (Fig.8).

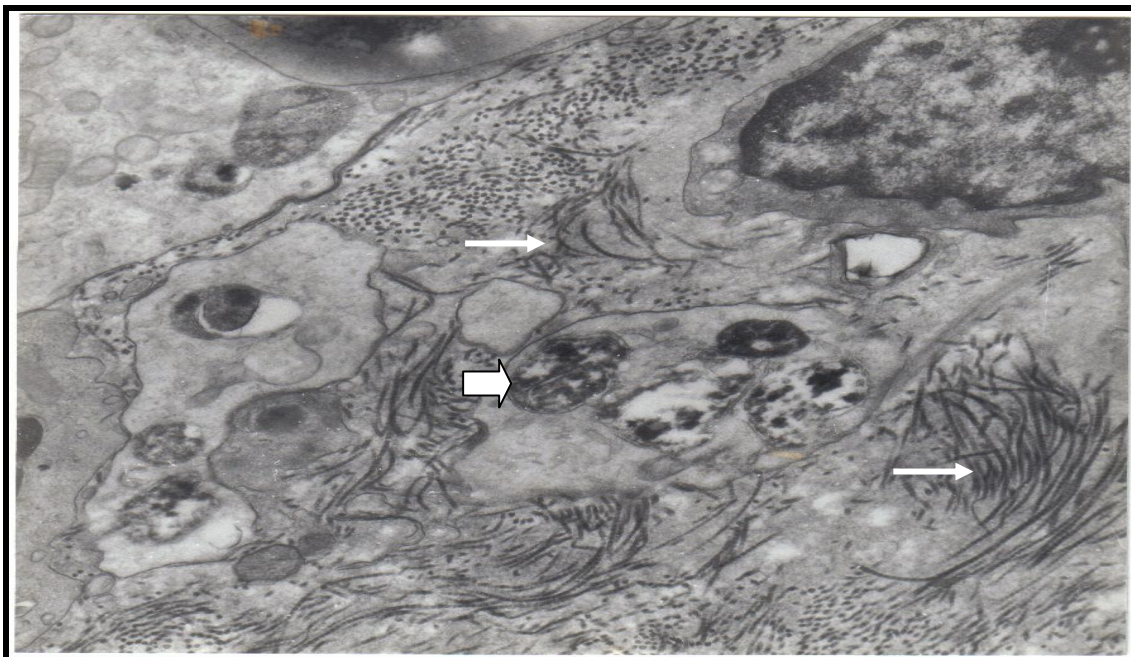


Figura 6. Rim. Cão infectado naturalmente por *Leishmania (L.) chagasi*. Necrose intersticial, restos celulares (seta larga) e proliferação de colágeno (setas finas). ME. Aumento: 19648 x.

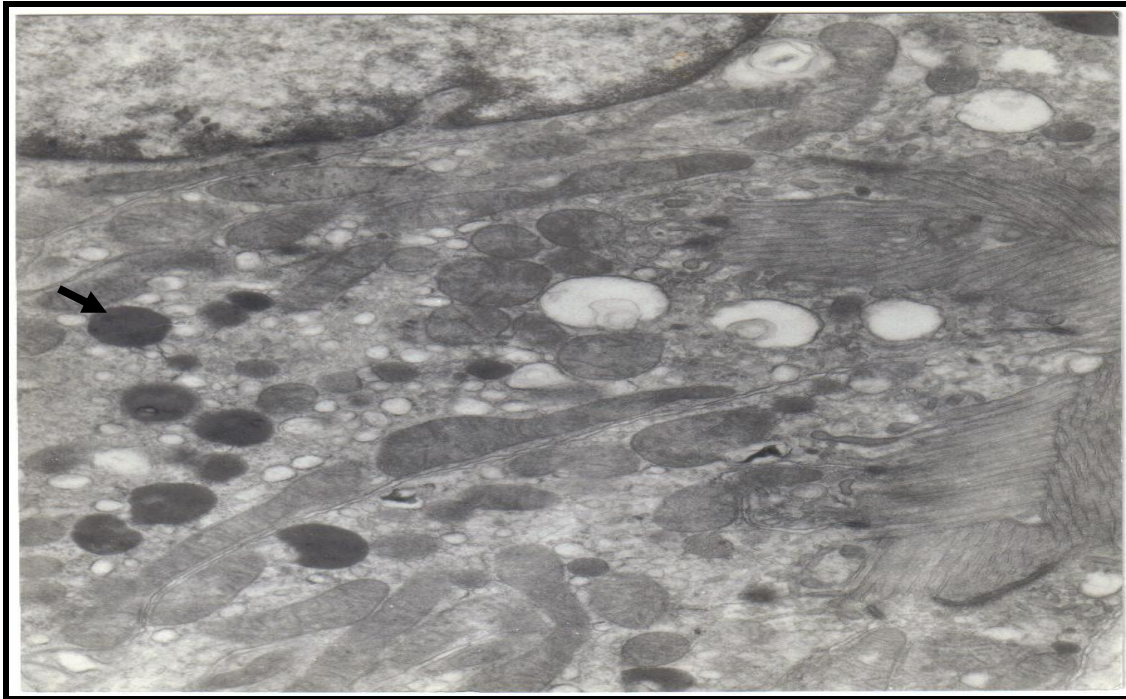


Figura 7. Rim. Cão infectado naturalmente por *Leishmania (L.) chagasi*. Citoplasma de células epiteliais tubulares com material eletrondenso no citoplasma (gotas protéicas) (seta). ME. Aumento:19520 x.

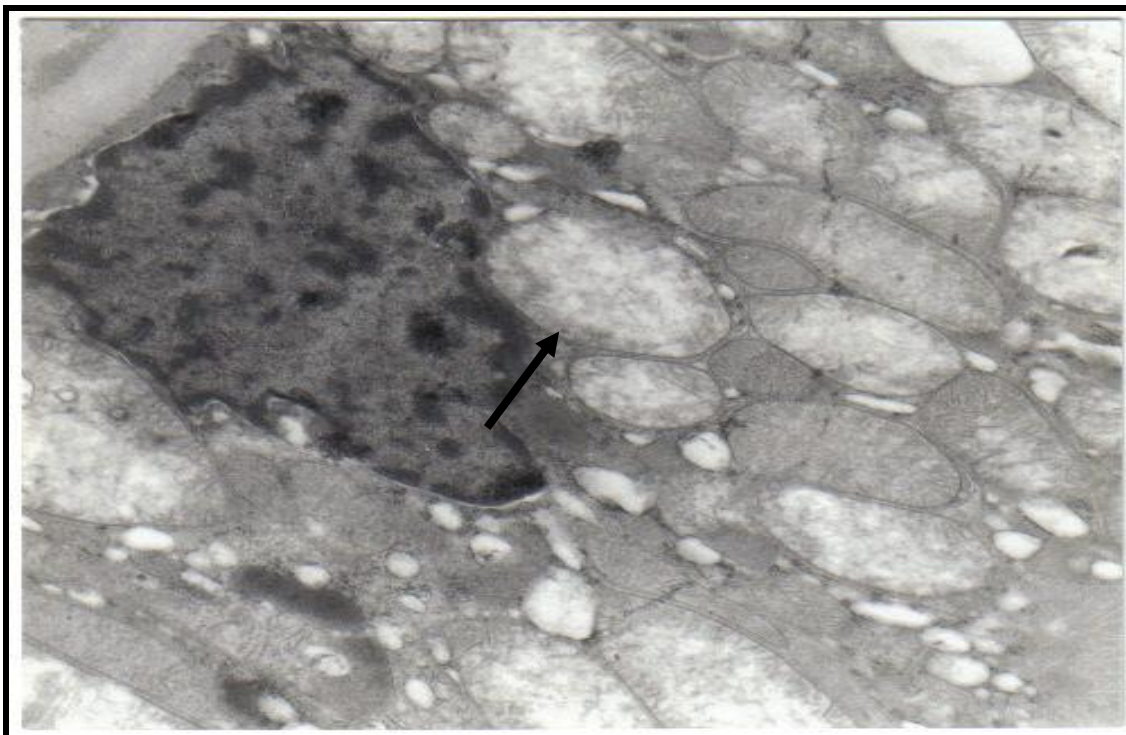


Figura 8. Rim. Cão infectado naturalmente por *Leishmania (L.) chagasi*. Edema de mitocôndria (↑). ME. Aumento: 10000 x.

A análise histopatológica e ultra-estrutural revelou que muitas lesões, destacando-se o infiltrado inflamatório, atrofia e fibrose, eram de natureza grave,

provocando alterações celulares (Tisher e Brenner, 1994), que levaram seis dos 11 animais infectados, em que foi realizado prova de função renal, a manifestarem proteinúria.

Em hamsteres as lesões túbulo-intersticiais eram progressivas e similares às encontradas em cães, como a presença de infiltrado inflamatório intersticial (Fig.9) observada nos cães, mas, diferentemente do que foi observado nesta espécie, no grupo de hamsteres com 90 dias de infecção, havia deposição de amilóide na parede dos túbulos contorcidos proximais (Fig.10).

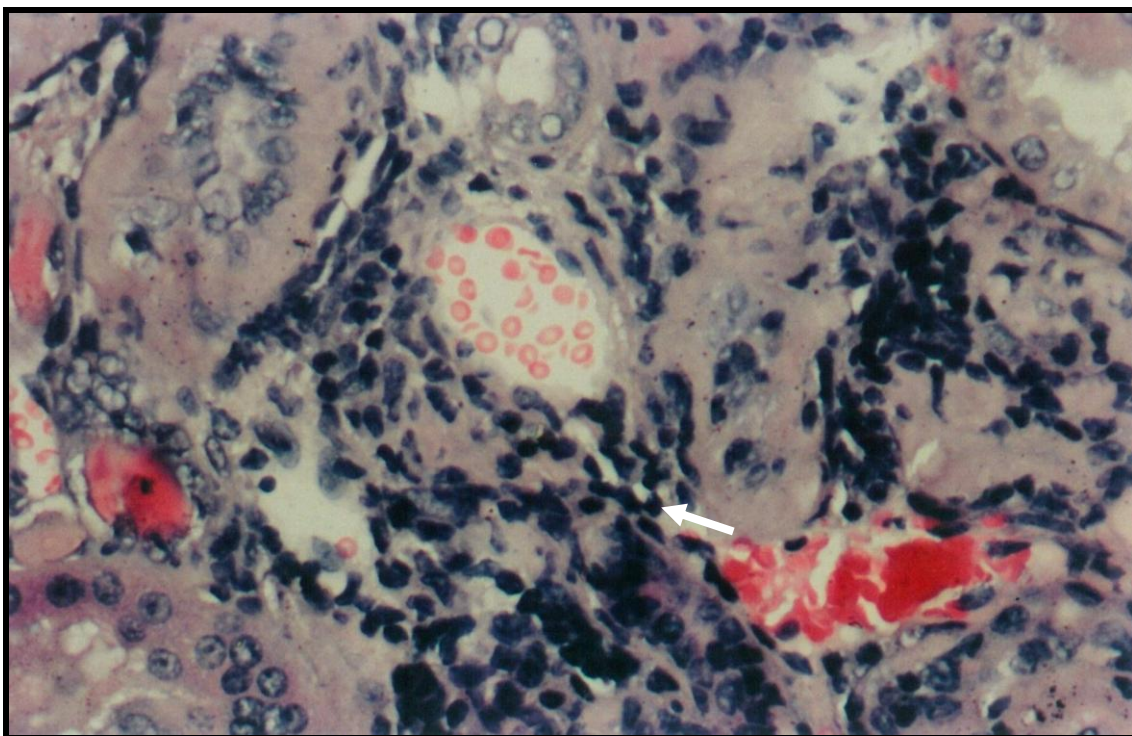


Figura 9. Rim. Hamster infectado experimentalmente por *Leishmania (L.) chagasi*. Infiltrado inflamatório intersticial (seta). H-E. 140 X.

A diferença no padrão da alteração intersticial observada no cão e no modelo experimental de hamster, no qual foi observado amiloidose, parece estar relacionada a fatores como: superestimulação do sistema retículo-endotelial do hamster com o aparecimento de amiloidose inespecífica (Brito et al., 1975); alta dose de antígeno usado na indução da infecção experimental (Benderitter et al., 1988), ou à via de inoculação intracardíaca (Sartori et al., 1987) ou intraperitoneal (Duarte, 1978) usada para reproduzir a doença. Tais vias são completamente diferentes da via de infecção

natural que é feita através da pele por um vetor, a *Lutzomyia longipalpis* (Magil, 1995), que possui propriedades intrínsecas importantes na definição da doença (Donnelly et al., 1998; Yin et al., 2000).

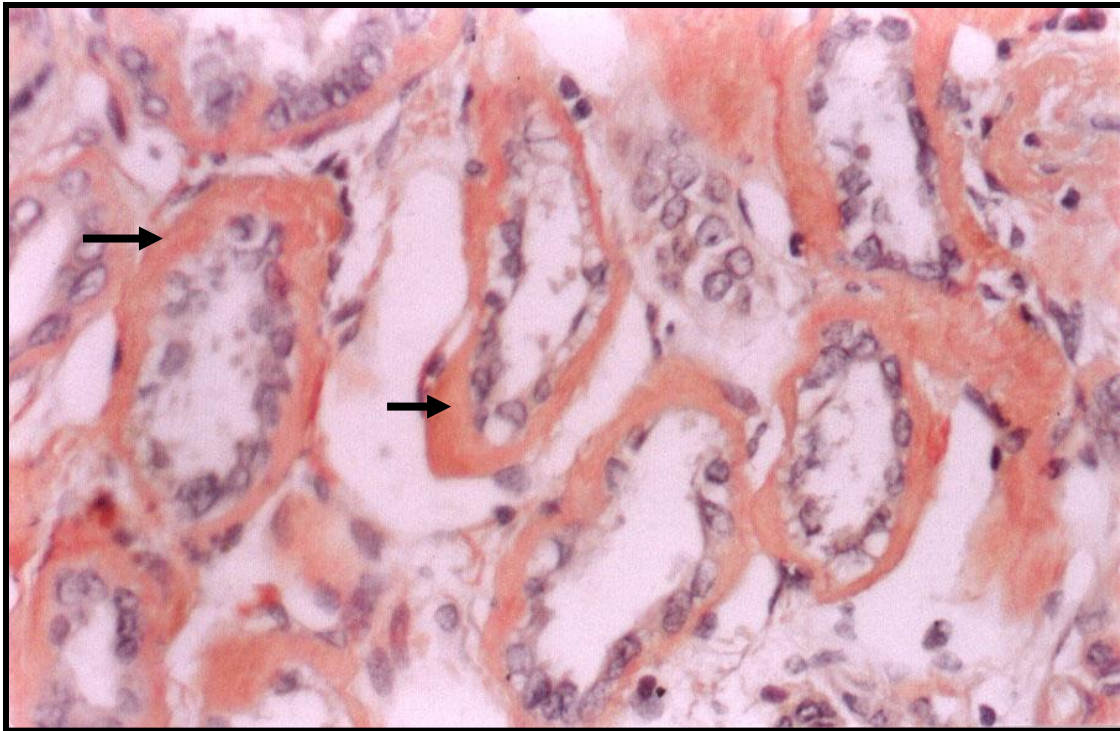


Figura 10. Rim. Hamster infectado experimentalmente por *Leishmania (L.) chagasi*. Parede de túbulos com depósito de amilóide (setas). VC. 140 x.

Deve-se salientar, por outro lado, que nefrite intersticial em cães é uma lesão frequentemente encontrada, pois a mesma está presente no decurso de várias enfermidades que acometem essa espécie ao longo da vida (Jubb et al., 1994; Oliveira et al., 2005; Camargo et al., 2006), mas no presente estudo tais lesões estavam associadas à leishmaniose visceral, pois em todos os casos foi detectada a presença de antígeno de leishmânia em células do infiltrado inflamatório intersticial e em células epiteliais tubulares, tanto em cão quanto em hâmmsteres, não sendo encontrado nos animais controles. Além disso, mesmo não tendo sido possível um controle ou conhecimento prévio das condições sanitárias e nutricionais em que viviam os cães deste estudo, pois se tratavam de animais de rua que foram capturados para o controle da leishmaniose visceral e raiva urbana, o estudo em hâmmsteres, em que tal controle pôde ser feito, apresentou alterações túbulo-intersticiais, demonstrando que a nefrite intersticial observada é própria da leishmaniose visceral.

Observaram-se, também, em tecido renal de cão, células epiteliais tubulares de tamanho reduzido, hiperconradas, provavelmente devido à condensação citoplasmática, cariólise e picnose nuclear, o que permitiu classificá-las, pelo aspecto morfológico, provavelmente, como células em apoptose, conforme definido por Zeiss (2003). A participação de apoptose no mecanismo de lesão é um evento bem conhecido em vários processos patológicos renais (Wong et al., 2001). Apoptose é evidente nos rins em casos de cisto renal, inflamação intersticial e glomerulonefrite, cicatrização e esclerose renal (Mené e Amore, 1998), tendo grande importância na regulação do número de células durante a indução e resolução de uma lesão (Ortiz et al., 2000). A caracterização de apoptose apenas pela análise histopatológica não é a técnica mais adequada, em função disso, estudos posteriores serão realizados com aplicação de técnicas imunoistoquímicas específicas, para melhor esclarecimento desta questão. Contudo deve ser enfatizado que em outras enfermidades, como na leptospirose tem sido observado apoptose de células epiteliais tubulares de rim (Carvalho, 2005).

A análise morfométrica realizada em tecido renal corado com H-E de 47 cães revelou que o infiltrado inflamatório intersticial ocupava uma área maior da região cortical ($p = 0,00$; teste de Mann-Whitney) (Fig.11) e da região medular ($p = 0,00$; teste de Mann-Whitney) nos animais infectados, comparados aos animais do grupo controle.

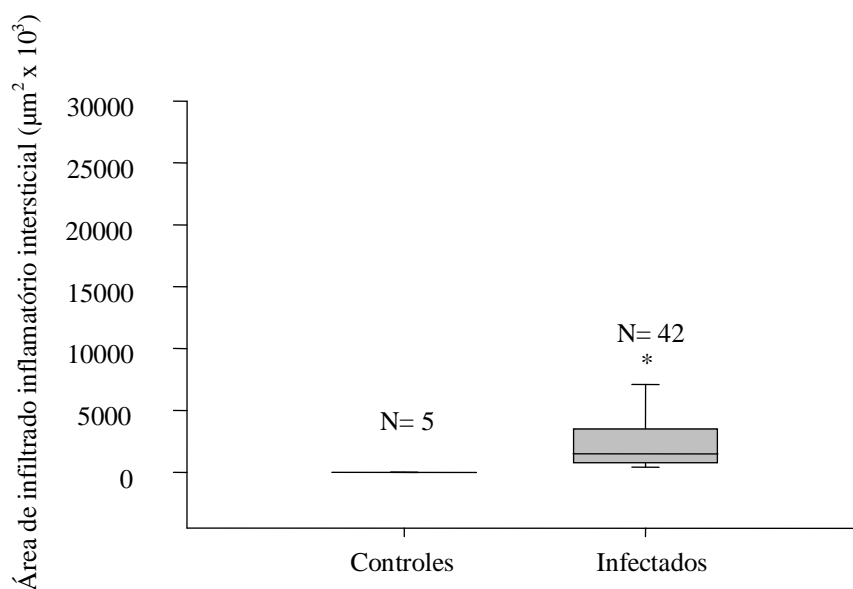


Figura 11. Análise morfométrica da área de infiltrado inflamatório intersticial em tecido renal de cães controles não infectados e infectados por *Leishmania (L.) chagasi*. Analisados 50 campos da região cortical / caso. N = número de casos por grupo. *□ $p = 0,00$. (Teste de Mann-Whitney).

A análise realizada entre os animais controles não infectados e os diversos grupos de animais infectados com padrões de glomerulonefrite previamente definida por Costa et al. (2003), revelou que a área ocupada pelo infiltrado inflamatório intersticial era maior nos grupos de glomerulonefrite membranoproliferativa ($p = 0,002$; teste de Kruskal-Wallis e Dunn) e glomerulonefrite de alterações mínimas ($p = 0,002$) quando comparados ao grupo controle (Fig.12).

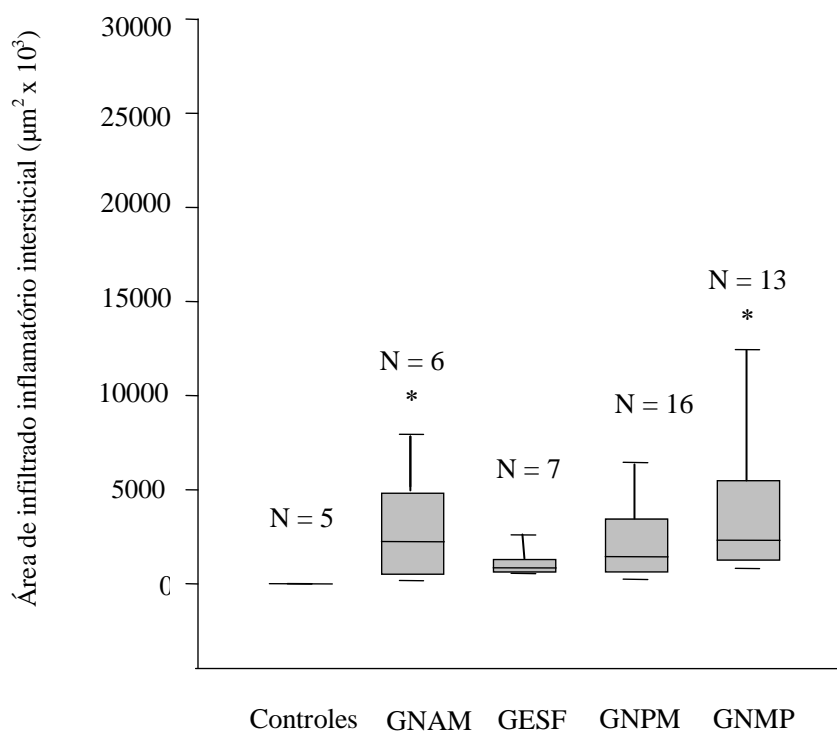


Figura 12. Análise morfométrica da área de infiltrado inflamatório intersticial renal em cães controles não infectados e infectados por *Leishmania (L.) chagasi*. Analisados 50 campos da região cortical / caso. N = número de casos por grupo. * $p = 0,002$ em relação ao grupo controle não infectado. (Testes de Kruskal Wallis e Dunn).

Os rins são órgãos que possuem grandes reservas funcionais e a manifestação de insuficiência renal somente é observada quando $\frac{2}{3}$ ou $\frac{3}{4}$ do tecido renal de ambos os rins estão comprometidos (Tisher e Brenner, 1994). No presente estudo, a análise morfométrica realizada em 47 animais, revelou a presença de nefrite intersticial em todos, entretanto, a prova de função renal, realizada em 11 animais, revelou manifestação de insuficiência renal em apenas seis animais (54,5%), como previamente mostrado por Costa et al. (2003), o que demonstra que em quase metade dos animais

(45,5%), a lesão não foi suficientemente extensa para comprometer a função renal. Tendo em vista que não foi possível avaliar o tempo de infecção dos cães, por se tratar de infecção natural, não foi possível estabelecer relação entre a gravidade da lesão renal e a progressão da infecção; mas no modelo experimental de hamster, onde a lesão se agravou com o tempo de infecção, essa relação pôde ser observada, o que permitiu inferir que o comprometimento renal pode ser causa de morte de cães com leishmaniose visceral, como tem sido sugerido por outros autores (Keenan et al., 1984). Não foi observada diferença significativa da área de nefrite intersticial nos grupos com padrões distintos de glomerulonefrite, o que leva a acreditar que a nefrite intersticial não está relacionada com o tipo de glomerulonefrite presente.

Sem descartar totalmente que outras infecções subclínicas pudessem estar presentes nos casos estudados, tanto nos cães como nos hâmmsteres, considera-se que as lesões renais foram causadas por *Leishmania (L.) chagasi*, pois, a presença de antígeno de *Leishmania* foi expressiva em todos e os exames clínicos e de necropsia não mostraram quadros sugestivos de outras infecções e os animais não foram submetidos a qualquer tratamento com drogas que pudessem causar alterações renais.

Os resultados obtidos revelaram que a leishmaniose visceral provoca lesões renais túbulo-intersticiais graves que progridem com o tempo de infecção e são capazes de comprometer área de tecido renal suficiente para provocar perda da função.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, Z. A.; IABUKI, K. A nefropatia do calazar. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.14, n.1, p.51-4, 1972.

BENDERITTER, T. H.; CASANOVA, P.; NASHKIDACHVILI, L. et al. Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, v.82, n.4, p.335-341, 1988

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic development in the last years. *Clin. Infect. Dis.*, v.24, p.684-703, 1997.

BOHLE, A.; MACKENSEN-HAEN, S.; GISE, H. V. Significance of tubulointerstitial changes in the renal cortex for the excretory function and concentration ability of the kidney: a morphometric contribution. *Am. J. Nephrol.*, v.7, p.421-33, 1987.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, v.7, n.72, p.248-54, 1976.

BRITO, T.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; AMATO NETO, V. et al. Glomerular involvement in human kala azar: A light, immunofluorescent and electron microscopic study based on kidney biopsies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.24, n.1, p.9-18, 1975.

CAMARGO, B. M. H.; MORAES, J. R. E.; CARVALHO, M. B. et al. Alterações morfológicas e funcionais dos rins de cães com insuficiência renal crônica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n.5, p.781-787, 2006.

CARAVACA, F.; MUNHOZ, A.; PIZARRO, J. L. et al. Acute renal failure in visceral leishmaniasis. *Am. J. Nephrol.*, v.11, p.350, 1991.

CARVALHO, S. M. Patologia e patogenia da nefropatia na infecção por leptospiras em ovinos. *Dissertação* (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, p.64, 2005.

COLLINS, A. B. Immunofluorescence. In: COLVIN, R. B.; BHAN, A. K.; McCLUSKEY, R. T. *Diagnostical immunopathology*, 2.ed. New York: Raven Press, 1995, p.699-710.

COSTA, F. A. L.; GUERRA, J. L.; SILVA, S. M. M. S. et al. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet. Pathol.*, v.40, p.677-684, 2003.

DONNELLY, K. B.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Histologic Characterization of Experimental Cutaneous Leishmaniasis in Mice Infected with *Leishmania braziliensis* in the Presence or Absence of Sand Fly Vector Salivary Gland Lysate. *J. Parasitol.*, v.84, n.1, p.97-103, 1998.

DUARTE, M. I. S. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Leishmaniose visceral (Calazar). In: BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo Patologia*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p.1215-1275.

DUARTE, M. I. S.; SESSO, A.; BRITO, T. Relationship between glomerular mesangial cell proliferation and amyloid deposition as seen by ultrastructural and morphometric

analysis in experimental Kala-azar of the hamster. *Am. J. Pathol.*, v.92, n.1, p.85-98, 1978.

DUARTE, M. I.; SILVA, M. R.; GOTO, H. et al. Interstitial nephritis in human kala-azar. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.77, n.4, p.531-7, 1983.

DUTRA, M.; MARTINELLI, R.; CARVALHO, E. M. et al. Renal involvement in visceral leishmaniasis. *Am. J. Kidney Dis.*, v.6, n.1, p.22-7, 1985.

ETTINGER, S. J., FELDMAN, E. C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária: moléstia de cão e do gato*. 4ª ed. São Paulo: Manole, v.2, p.3020, 1997.

EVANS, T. G.; SMITH, D.; PEARSON, R. D. Humoral factors and nonspecific immune suppression in Syrian hamsters infected with *Leishmania donovani*. *J. Parasitol.*, v.76, p.212-217, 1990.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. *Proceedings of the International canine Leishmaniasis Forum*. Barcelona, Spain, p.6-10, 1999.

FUNDAÇÃO MUNICIPAL DE SAÚDE. *Centro de controle de Zoonoses*. Teresina-PI, 1998.

GRAUER, G. F. Glomerulonephritis. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*, v.7, n.3, p.187-197, 1992.

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. *Pathology of domestic animals*. IN: MAXIE, M. G. The urinary system. New York: Academic Press, cap.5, v.2, p.447-538, 1985.

KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; LIGHTNER, L. et al. Visceral leishmaniasis in the german shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet. Pathol.*, v.21, p.74, 1984.

KOOTSTRA, C. J.; SUTMULLER, M.; BAELDE, H. J. et al. Association between leukocyte infiltration and development of glomeruloesclerosis in experimental lupus nephritis. *J. of Pathol.*, v.184, p.219-25, 1998.

LAINSON, R. & SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; LILLICK-KENDRICK, R. (Ed). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press, p.120, 1987.

- LINTON, A. L.; CLARK, W. F.; DRIEDGER, A. A. et al. Acute interstitial nephritis due to drugs. Review of the literature with a report of nine cases. *Ann. of Int. Med.*, v.93, p.735-41, 1980.
- MACIANTI, F.; POLI, A.; BIONDA, A. Analysis of renal immune- deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. *Parasitol.*, v.31, n.2-3, p.213-230, 1989.
- MAGIL, A. B. Tubulointerstitial lesions in human membranous glomerulonephritis: relationship to proteinuria. *Am. J. Kidney. Dis.*, v.25, n.3, p.9-375, 1995.
- MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S. et al. Leishmaniose visceral – Calazar. *Braz. J. Med.*, v.41, n.5, p.69-70, 1981.
- MATHIAS, R.; COSTA, F. A. L.; GOTO, H. Detection of immunoglobulin in the lung and in the liver during visceral leishmaniasis in hamsters. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.34, n.3, p.340-55, 2001.
- MENÉ, P.; AMORE, A. Apoptosis: potential role in renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.13, p.1936-43, 1998.
- NIETO, C. G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M. A. et al. Pathological changes in Kidneys of dogs with natural leishmania infection. *Vet. Parasitol.*, v.45, n.1-2, p. 33-47, 1992.
- OLIVEIRA, C. R.; FREITAS, J. C.; SILVA, F. G. et al. Diagnóstico laboratorial da leptospirose em um cão utilizando diferentes técnicas. *Arq. Inst. Biol.*, v.72, n.1, p.111-113, 2005.
- OLSEN, T. S.; WASSEF, N. F.; OLSEN, H. S. et al. Ultrastructure of the kidney in acute interstitial nephritis. *Ultrastruct. Pathol.*, v.10, p.1-16, 1986.
- ORTIZ, A.; LORZ, C.; MARINA, P. et al. Role and regulation of apoptotic cell death in the kidney. *Front. Biosc.*, n.5, p.735-749, 2000.
- POLI, A.; ABRAMO, F.; MANCIANTI, F. et al. Renal involvement in canine leishmaniasis: a light- microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron.*, v.57, n.4, p.444-52, 1991.
- POZIO, E.; GRANDONI, L.; GRAMICCIA, M. et al. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Act. Trop.*, v.38, p.383-393, 1981.

RAMOS, G. P.; FILHO, F. B. R.; BOTELHO, G. G. et al. Valores bioquímicos-séricos de cães portadores de leishmaniose visceral. *R. Bras. Med. Vet.*, v.16, n.5, p.192-196, 1994.

SARTORI, A.; OLIVEIRA, A. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C. et al. Immune complex glomerulonephritis in experimental Kala-azar. *Parasit. Immun.*, v.9, n.1, p.93-103, 1987.

TISHER, C. C.; BRENNER, B. M. *Renal pathology with clinical and functional correlations*, 2.ed. v.1., J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1994, 978p.

WONG, V. Y.; KELLER, P. M.; NUTTALL, M. E. et al. Role of caspases in human renal proximal tubular epithelial cell apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.*, v.433, p.135-0, 2001.

YIN, H.; NORRIS, D. E.; LANZARO, G. C. Sibling species in the *Lutzomyia longipalpis* complex differ in levels of mRNA expression for the salivary peptide, maxadilan. *Insect. Mol. Biol.*, v.9, n.3, p.309-314, 2000.

ZEISS, C. J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet. Pathol.*, n.40, p.481-495, 2003.

CAPÍTULO 2

Patogenia da Nefrite Intersticial na Leishmaniose Visceral¹

Pathogenesis of the Interstitial Nephritis in Visceral Leishmaniasis

Leopoldina Almeida *Gomes*²; Hiro Goto³; José Luiz Guerra⁴; Ana Lys Bezerra Barradas *Mineiro*⁵; Silvana Maria Medeiros de Sousa e *Silva*⁶; Francisco Assis Lima *Costa*^{6*}

¹ Parte da dissertação de Mestrado em Ciência Animal – CCA – UFPI

² Mestre em Ciência Animal – CCA – UFPI

³ Departamento de Medicina Preventiva, Faculdade de Medicina e Instituto de Medicina Tropical- USP

⁴ Departamento de Patologia Experimental e Comparada - FMVZ-USP

⁵ Doutoranda em Ciência Animal - CCA-UFPI

⁶ Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí
Campus da Socopo, 64046-550 Teresina-PI

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica causada no Brasil pelo protozoário *Leishmania (L.) chagasi*. Ainda que a presença de *Leishmania sp* nos rins seja rara, antígenos parasitários são frequentemente encontrados nesses órgãos em associação às lesões renais. Contudo, pouco se conhece do mecanismo de lesão renal na LVC. No presente trabalho foi analisado a patogenia da nefrite intersticial em cães naturalmente infectados e em hamsteres infectados experimentalmente com *Leishmania (L.) chagasi*. Os resultados revelaram a presença de antígeno em células fagocíticas do infiltrado inflamatório mononuclear intersticial e em células epiteliais tubulares ocupando uma área maior nos animais infectados do que nos controles não infectados ($p = 0,0016$; teste de Mann Whitney). Células T CD4⁺ ($p = 0,0073$; teste de Mann Whitney) e CD8⁺ ($p = 0,0445$; teste de Mann Whitney) estavam presentes em maior número nos animais infectados do que nos animais controles. A área ocupada por células T CD4⁺ foi maior nos padrões de glomerulonefrite proliferativa mesangial e glomerulonefrite de alterações mínimas, quando comparados aos casos com glomeruloesclerose segmentar focal e grupo controle ($p = 0,0343$; teste Kruskal-Wallis e Dunn). Os resultados mostraram que células T participam do mecanismo de lesão túbulo- intersticial na LVC.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, nefrite intersticial, patogenia, cão.

* Autor para Correspondência – E-mail fassisle@ufpi.br

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis is a systemic disease caused, in Brazil, for protozoan *Leishmania (L.) chagasi*. The presence of *Leishmania sp* in the kidneys is rare, but parasite antigens are frequently finding in association to the renal lesions. However the mechanism of renal lesion in the LVC, still, is few known. In the present study was analyzed the pathogenesis of the interstitial nephritis in naturally infected dogs and experimentally infected hamsters with *Leishmania (L.) chagasi*. The results revealed the presence of antigen in both dogs and hamsters in phagocyte cells of the interstitial inflammatory infiltrate and in tubular epithelial cells being higher in the symptomatic than asymptomatic dogs. The infiltrate of CD4⁺ and CD8⁺ T cells was higher in the infected dogs compared to the non-infected controls. The area with CD4⁺ T cells was higher in the groups of dogs with mesangial proliferative glomerulonephritis and minor glomerular abnormalities, when compared to the cases of focal segmental glomerulosclerosis and control group. The results showed that T cells participate of the mechanism of tubule interstitial lesions in the LVC.

Key-words: Visceral leishmaniasis, interstitial nephritis, pathogenesis, dog.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica causada no Brasil pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Lainson e Shaw, 1987). Durante o repasto sanguíneo o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* infectado inocula formas promastigotas do parasito na pele do hospedeiro susceptível (Lanzaro e Warburg, 1995), de onde se transformam em formas amastigotas e disseminam-se, provocando lesões, principalmente, nos órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) (Duarte, 2000).

A doença é mediada imunologicamente e a imunossupressão, causada pelo parasito, ao acometer as espécies susceptíveis faz com que o parasito se distribua, também, para órgãos que não pertencem ao SFM (Nickol e Bonventre, 1985).

Ainda que a presença de *Leishmania sp* nos rins seja rara, antígenos parasitários são frequentemente encontrados nesses órgãos em associação às lesões renais, como observado no cão (Costa et al., 2000) e no homem (Duarte et al., 1983). Contudo pouco se conhece do mecanismo de lesão renal na LVC. De um modo geral sabe-se que as lesões renais são mediadas imunologicamente (McCluskey e Bhan, 1982), mas o tipo de mediação imunológica seja por ativação da resposta imune humoral (Weisinger et al.,

1978), seja por ativação da resposta imune celular (Fillit e Zabriskie, 1982; van Alderwegen et al., 1997) ainda não é bem conhecido.

Na nefropatia da LVC foi observada, em uma amostra pequena de animais, a presença de células T CD4⁺ em tecido renal de quatro animais e de células T CD8⁺ em dois animais, permitindo a conclusão de que células T CD4⁺ estão envolvidas no processo de lesão renal na LVC (Costa et al., 2001).

No presente trabalho foi avaliado uma amostra bem maior de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi* e de hamsteres infectados experimentalmente com *Leishmania (L.) chagasi*, com enfoque específico sobre a participação de antígeno de *Leishmania*, e células T CD4⁺ e CD8⁺ na patogênese da lesão túbulo-intersticial na LVC.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados tecidos renais de vinte cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Teresina no estado do Piauí. Cinco cães eram negativos para leishmaniose visceral. Os animais eram todos adultos, machos ou fêmeas, de idades e raças diferentes e muitos não apresentavam raça definida. Os animais foram selecionados de uma população estimada em 61.536 cães em 1998 (Fundação Municipal de Saúde, 1998), quando esse material foi colhido para realização de estudo sobre nefropatia da leishmaniose visceral canina (Costa et al., 2003).

Foram analisados também tecido renal de hamsteres (*Mesocricetus auratus*), infectados por inoculação intraperitoneal com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*, amostra MHOM/BR/72/cepa 46 e sacrificados aos 7, 15 e 90 dias pós-infecção. Os grupos foram compostos, respectivamente, por oito, seis e oito animais, com idades, entre 45 e 60 dias, mantidos no biotério do CCA-UFPI (Centro de Ciências Agrárias-Universidade Federal do Piauí), recebendo água e ração à vontade.

O diagnóstico de leishmaniose visceral canina (LVC) foi confirmado pela detecção de anticorpos anti-*Leishmania* no soro por teste de imunofluorescência indireta (Collins, 1995) e ELISA (Evans et al., 1990) e exame parasitológico em esfregaço de pele, baço e linfonodo poplíteo e cultura de material da medula óssea esternal, baço e linfonodo poplíteo, para pesquisa de *Leishmania* (Evans et al., 1990; Berman, 1997). De

dois animais, leishmânias foram isoladas e enviadas ao Instituto Evandro Chagas de Belém do Pará para caracterização do parasito, por meio de anticorpos monoclonais. Em hamster, o diagnóstico de leishmaniose visceral (LV) foi determinado pela presença de amastigotas em esfregaços de baço e fígado corados por Giemsa.

Os fragmentos de rins fixados em Duboscq-Brasil por 60 minutos e posteriormente conservados em formol a 10% tamponado com fosfato 0,01M pH 7,4 (formol tamponado), foram processados segundo técnicas de rotina e os cortes corados com hematoxilina-eosina (H-E), ácido periódico de Schiff (PAS), tricrômico de Masson (TM), ácido periódico prata metanamine (PAMS) e vermelho-congo (VC).

Cortes de tecidos incluídos em parafina foram desparafinados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico; foram submetidos a bloqueio de peroxidase endógena, com peróxido de hidrogênio 0,03%, em metanol por 30 minutos no escuro e tratados em forno de microondas (Sanyo, Brasil), potência máxima, em solução Tris-HCl, pH 1,0, sucessivamente por 10 e 5 minutos. Após lavagem com solução de PBS, os cortes de tecido renal de cão foram tratados com reagentes do “Blocking Kit” segundo o protocolo do fabricante, seguidos de lavagem em PBS. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com “protein block” segundo o protocolo do fabricante, nos cortes de tecido renal de cão, e com soro normal de coelho, nos cortes de tecido renal de hamsteres. Após essa etapa foi realizada incubação dos cortes com anticorpo policlonal de camundongo anti-*Leishmania (L.) amazonensis* na diluição de 1:1600 em solução salina tamponada com fosfato 0,01M, pH 7,2 (PBS) e anticorpos monoclonais de camundongo anti-CD4⁺ (VMRD, hibridoma DH29A, Lote 1089, Pullman, USA) e anti-CD8⁺ caninos (VMRD, Inc., hibridoma CAD046A, Lote 0395-0598, Pullman, USA) na diluição de 1:500 em PBS, “overnight,” em temperatura de 2° C. Seguiram-se as etapas de amplificação da reação utilizando o sistema “Catalyzed Signal Amplification (CSA)”, peroxidase (Dako Corporation código K1500, Carpinteria, USA), nos testes de detecção de antígeno de *Leishmania*, células T CD4⁺ e CD8⁺, para tecido renal de cão, e o sistema “EnVision, peroxidase” (Dako Corporation código K4000, Carpinteria, USA), no teste de detecção de antígeno de *Leishmania*, para tecido renal de hamsteres. As amostras foram incubadas em atmosfera úmida intercaladas por lavagens em PBS e a revelação feita com 0,3 mg/ml de 3,3’-

diaminobenzidina (Sigma Chemical, USA) em PBS com 0,06% de peróxido de hidrogênio e contracoloração com hematoxilina de Harrys.

Cortes de rim de cães de aproximadamente 3 a 4 μm de espessura, corados com imunoperoxidase, foram submetidos a análise morfométrica 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 de 20 a 127 campos por corte de tecido renal de cada animal, tanto da região cortical quanto da região medular. Desse total, foram selecionados, aleatoriamente, de 20 a 50 campos por fragmento de tecido renal e por animal, para a análise morfométrica de antígeno de *Leishmania* e do infiltrado inflamatório de células T CD4⁺ e CD8⁺, em correspondência aos padrões de glomerulonefrite de alterações mínimas (GNAM), glomeruloesclerose segmentar focal (GESF), glomerulonefrite proliferativa mesangial (GNPM) e glomerulonefrite membranoproliferativa (GNMP), conforme previamente classificadas por (Costa et al., 2003). Nos campos selecionados foram mensuradas as áreas correspondentes à presença de antígeno e de células T em comparação à área total ($\mu\text{m}^2 \times 10^3$) de cada campo, previamente definida pelo programa de análise de imagem.

Os resultados foram analisados, no programa estatístico Sigma Stat, por testes não-paramétricos: a) método de Kruskal-Wallis para análise de variância; b) método de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos. Havendo diferença significativa, aplicava-se o teste de Dunn para comparação múltipla de grupos. Adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi analisado o comprometimento dos túbulos e interstício renal, de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*, com padrões de glomerulonefrite previamente definidos por Costa et al. (2001), que investigou a patogenia da lesão glomerular na LVC, utilizando os mesmos animais, e de hamsteres infectados experimentalmente e sacrificados aos 7, 15 e 90 dias pós-infecção. A análise da presença de antígeno de *Leishmania*, de células T CD4⁺ e de células T CD8⁺, nos túbulos e interstício renal, foi realizada em 20 cães infectados e em cinco cães não infectados. Em hamsteres foi analisada apenas a presença de antígeno de *Leishmania*,

visto que não havia anticorpos específicos, disponíveis para detecção de células T CD4⁺ e CD8⁺ para aplicação em tecido renal dessa espécie. Em todos os cães infectados e nos hamsters com 15 e 90 dias pós-infecção, havia presença de nefrite intersticial, variando de intensidade mínima a severa. Nos cães controles não infectados, nefrite intersticial, também estava presente, mas era de intensidade mínima.

Antígeno de *Leishmania* foi detectado no interstício renal em 95% dos cães infectados e em todos os hamsters. O antígeno apresentava-se principalmente sob padrão celular em células fagocíticas do infiltrado mononuclear intersticial (Fig.1A e 1B) e em menor proporção, como material extracelular particulado.

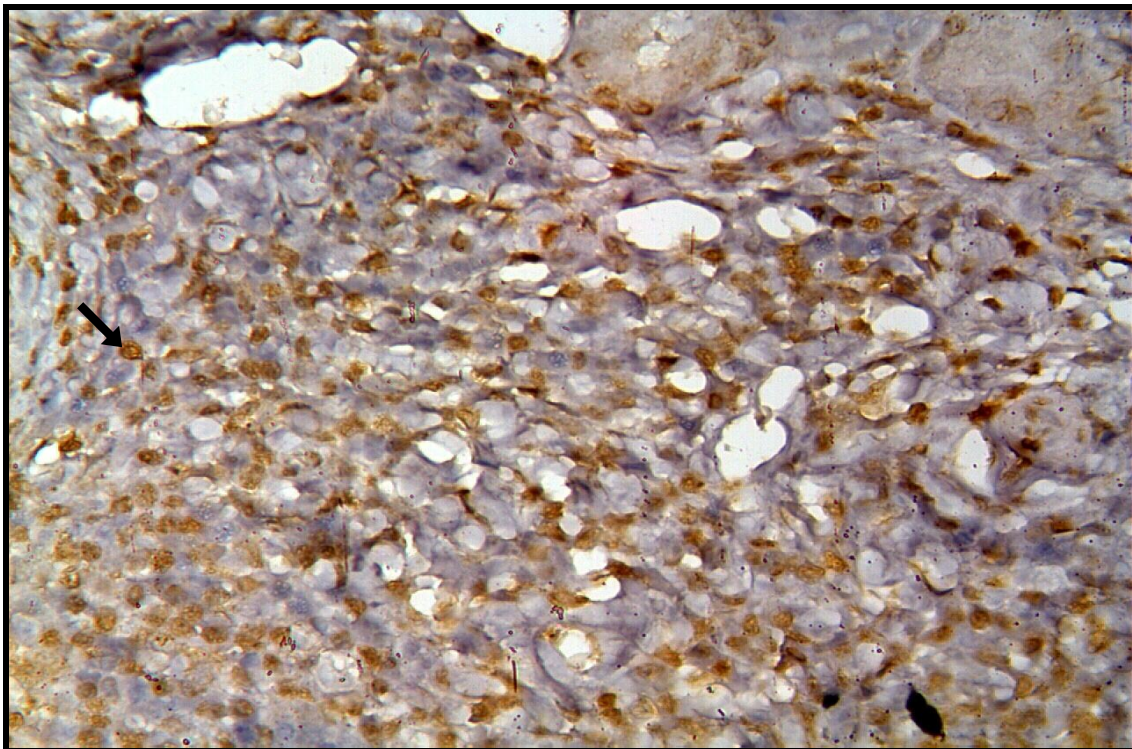


Figura 1A. Rim. Cão infectado naturalmente por *Leishmania (L.) chagasi*. Antígeno de *Leishmania* (↑) no padrão celular em células fagocíticas do infiltrado inflamatório intersticial. Imunoperoxidase. 140x.

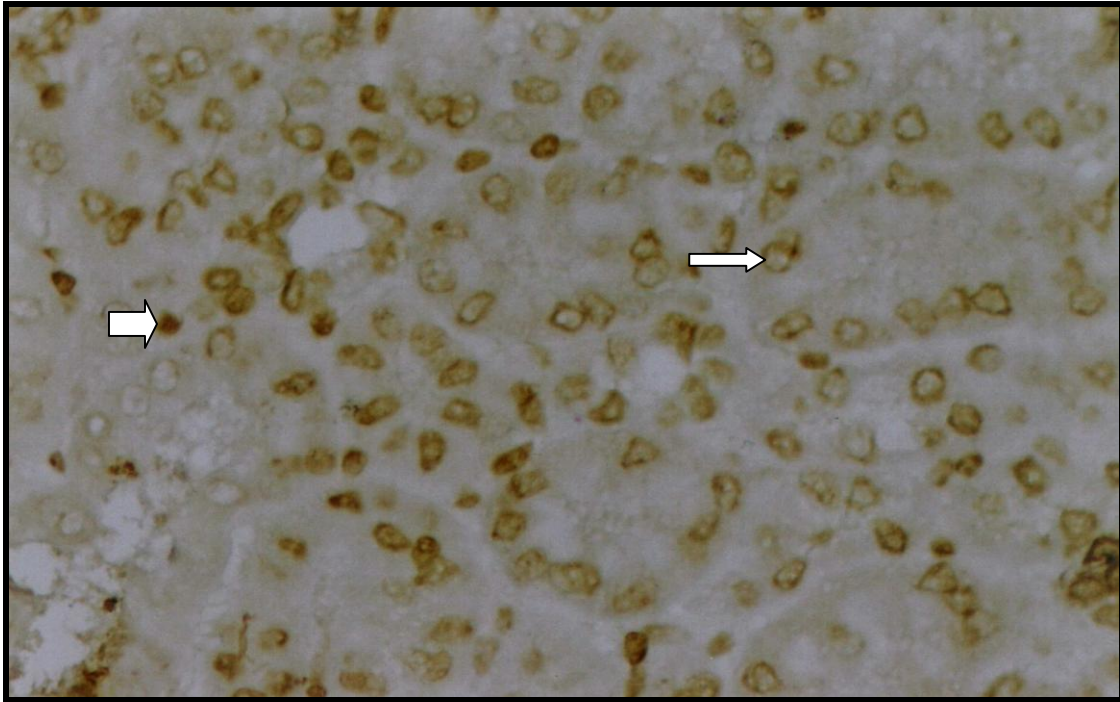


Figura 1B. Rim. Hamster infectado experimentalmente por *Leishmania (L.) chagasi*. Antígeno de *Leishmania* no padrão celular em células fagocíticas do infiltrado inflamatório intersticial (seta larga) e em células do epitélio tubular (seta fina). Imunoperoxidase. 140 x.

Antígeno foi observado, também, em células epiteliais tubulares, o que leva a acreditar que tais células tenham atividade fagocítica e atuem como apresentadoras de antígeno, conforme preconizado por Martin et al. (1989). Essa possibilidade confere, portanto, às células epiteliais tubulares, em casos de infecção por *Leishmania (L.) chagasi*, a capacidade de envolvimento real no processo de lesão túbulo-intersticial, pois há interação entre essas células (como apresentadoras de antígeno) e células T CD4⁺ presentes no infiltrado inflamatório intersticial dos animais analisados, durante o processo de reconhecimento de antígenos extracelulares, conforme se conhece da literatura pertinente (Abbas et al., 1997). Amastigotas íntegras no interstício renal não foram detectadas em nenhum dos casos, revelando que a presença do parasito no rim é bastante rara. Visto que não foram detectadas amastigotas no rim, nem por histopatologia e nem por imunohistoquímica, a presença do antígeno de *Leishmania* foi fundamental para estabelecer relação entre a infecção leishmaniótica e as lesões intersticiais no tecido renal dos animais analisados.

A análise morfométrica, realizada em tecido renal da região cortical de cão, revelou um número maior de células expressando antígeno por área do infiltrado

inflamatório intersticial ($p = 0,0016$; teste de Mann Whitney) (Fig.2), nos animais infectados em relação ao grupo dos animais controles não infectados. Esse resultado revelou que, muito embora não tenha sido detectada a presença de amastigotas, antígeno de *Leishmania* estava presente no rim, indicando sua participação no processo de lesão intersticial, pois o antígeno estava presente em todos os casos onde havia infiltrado inflamatório, enquanto nos animais controles não havia essa relação.

A área ocupada por antígeno no infiltrado inflamatório intersticial da região cortical, era maior nos animais com glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite proliferativa mesangial e glomerulonefrite de alterações mínimas ($p = 0,0077$; testes de Kruskal Wallis e Dunn), quando comparada ao grupo controle, mas não havia diferença entre a área ocupada por antígeno nos animais com glomeruloesclerose segmentar focal e o grupo controle (Fig.3). Esse resultado indicou que não existia relação da presença de antígeno de *Leishmania* no interstício renal com o padrão de glomeruloesclerose segmentar focal. Por outro lado, foi observado, também, que não existia diferença da área ocupada por antígeno, no infiltrado inflamatório intersticial, associada aos diversos padrões de lesão glomerular, quando comparados entre si, sugerindo que a presença do antígeno no interstício renal não define o tipo de lesão glomerular.

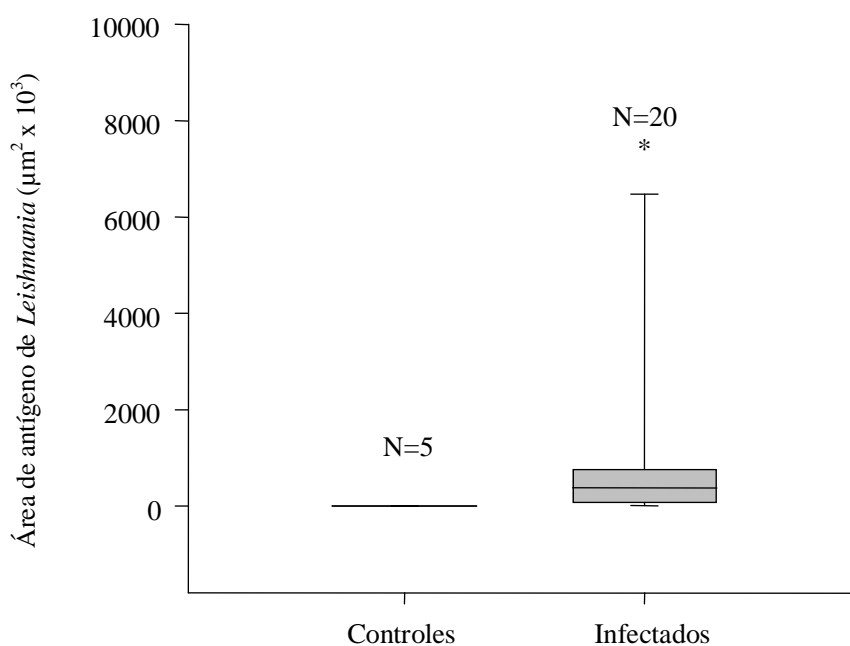


Figura 2. Análise morfométrica da área de antígeno de *Leishmania* no infiltrado inflamatório intersticial em cães controles não infectados e infectados naturalmente por *Leishmania (L.) chagasi*. N= n° de casos por grupo. * $p = 0,0016$ (teste de Mann-Whitney).

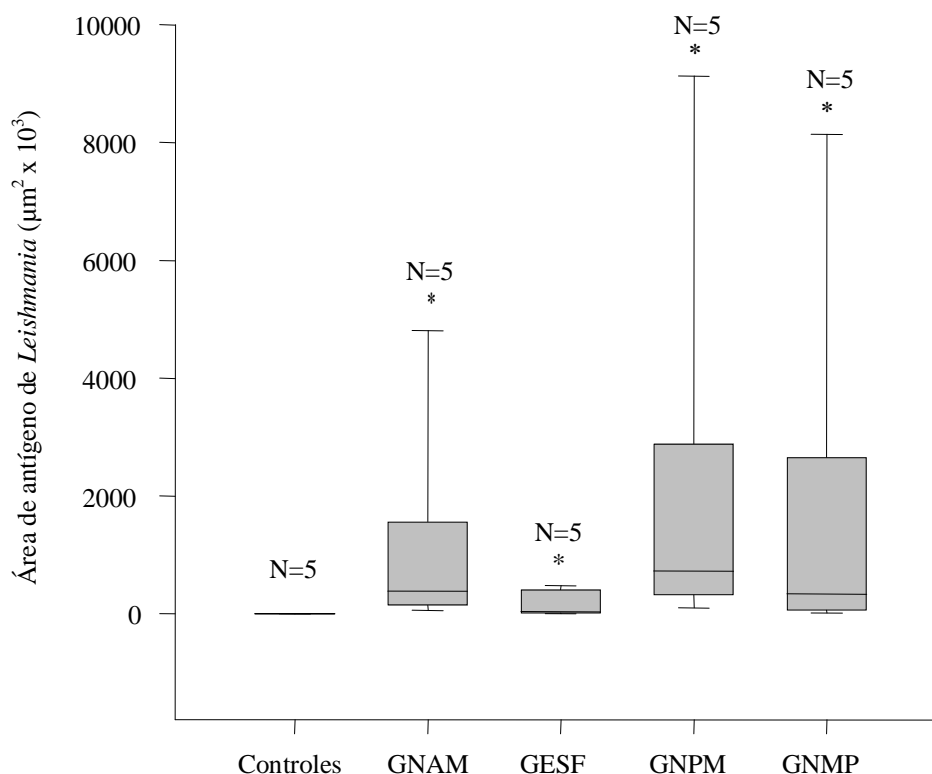


Figura 3. Análise morfométrica da área de antígeno de *Leishmania* no infiltrado inflamatório intersticial de rim, em cães controles não infectados e infectados naturalmente por *Leishmania* (*L.*) *chagasi*, com diferentes padrões de glomerulonefrite (GN). N= nº de casos por grupo. * p = 0,0077 (teste de Kruskal-Wallis e Dunn).

Células T CD4⁺ (Fig.4) estavam presentes no interstício renal da região cortical de 17 (85%) cães naturalmente infectados e em 15 (75%) animais, na região medular, revelando que células T CD4⁺ estavam presentes na cortical e medular sem diferença significativa. Células T CD8⁺ (Fig.5) foram detectadas no interstício renal da cortical em 12 (60%) animais e em nove (45%) animais na região medular. As células T distribuíam-se no infiltrado inflamatório, onde havia presença de outras células não marcadas (Fig.4). No grupo de animais controles, células T não foram observadas. Constatou-se que células T CD4⁺ (p = 0,0073; teste de Mann Whitney) e CD8⁺ (p = 0,0445; teste de Mann Whitney) estavam presentes em maior número nos animais infectados do que nos animais controles, demonstrando que tais células, têm participação no mecanismo de lesão renal na LVC, visto que linfócitos T podem causar injúria celular e regular a resposta imune (Neilson et al., 1980).

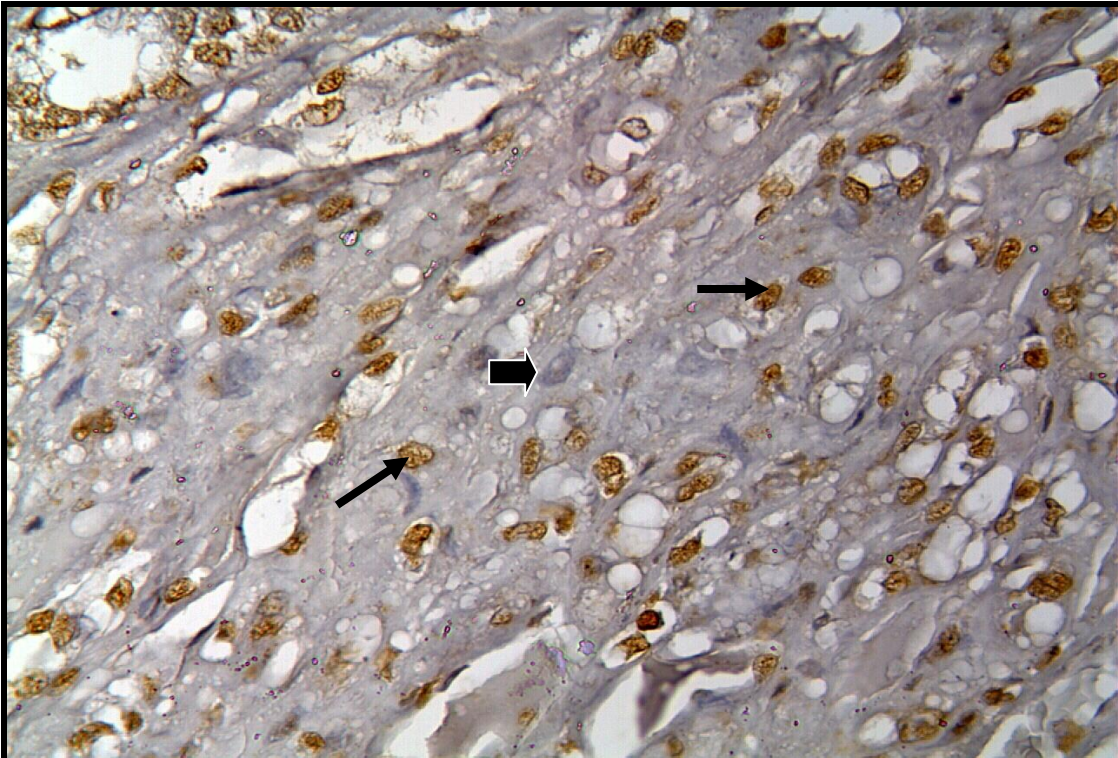


Figura 4. Rim. Cão infectado naturalmente por *Leishmania (L.) chagasi*. Células T CD4⁺ no interstício renal (setas finas). Célula não marcada (seta larga). Imunoperoxidase. 140x.

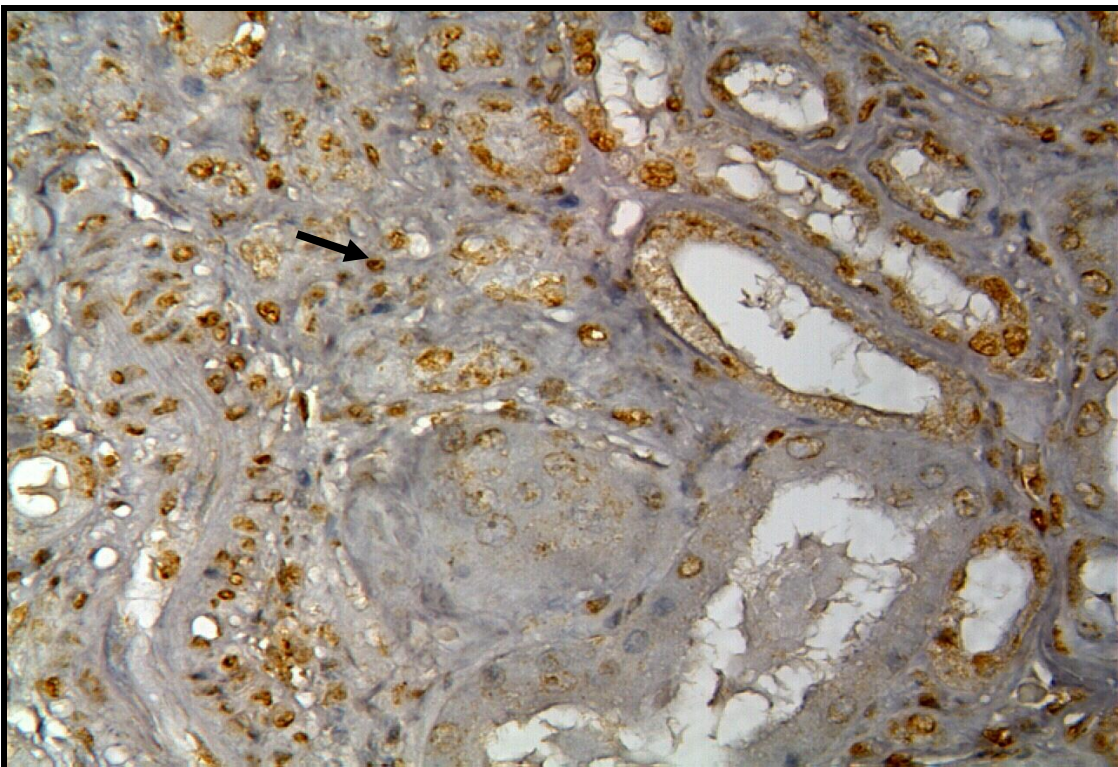


Figura 5. Rim. Cão infectado naturalmente por *Leishmania (L.) chagasi*. Marcação de células T CD8⁺ no interstício renal (seta). Imunoperoxidase. 140x.

Quando comparamos a área do interstício renal ocupada por células T, foi verificado que células T CD4⁺ ocupavam uma área maior do que células T CD8⁺ (p = 0,0222; teste de Mann Whitney), sugerindo maior participação de células T CD4⁺ no processo de lesão intersticial (Fig.6). Sabe-se que células T no interstício renal estão envolvidas no reconhecimento de antígeno e no recrutamento de leucócitos, especialmente macrófagos, com uma fase efetora que inclui células T CD8⁺; estas com capacidade de causar injúria celular direta (Main et al., 1992).

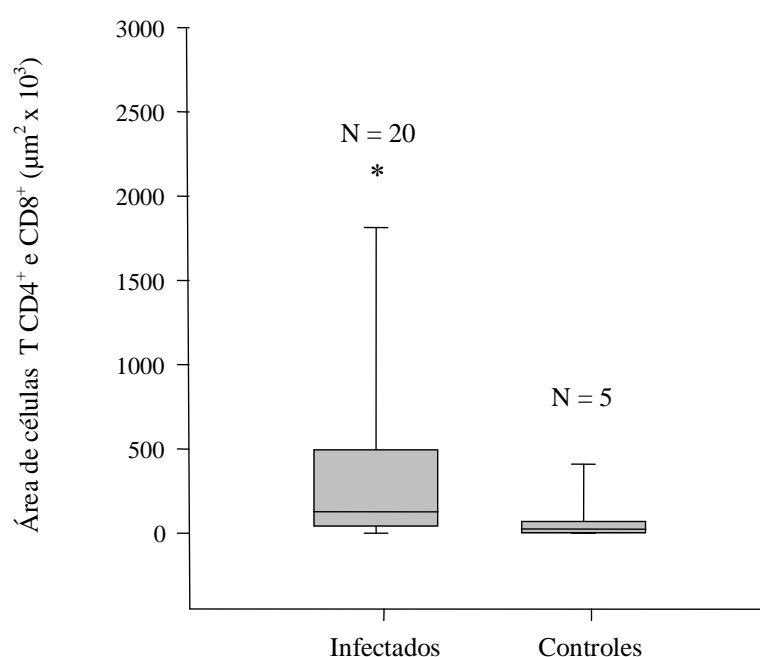


Figura 6. Análise morfométrica da área de células T CD4⁺ e CD8⁺ no infiltrado inflamatório intersticial renal, em cães infectados naturalmente por *Leishmania (L.) chagasi* e controles não infectados. N = número de casos por grupo. □ p = 0,0222 (teste de Mann Whitney e Dunn).

A área ocupada por células T CD4⁺ foi maior nos padrões de glomerulonefrite proliferativa mesangial e glomerulonefrite de alterações mínimas, quando comparados ao grupo de glomeruloesclerose segmentar focal e grupo controle (p = 0,0343; teste Kruskal-Wallis e Dunn) (Fig.7). Entretanto não existia diferença quando a comparação foi feita entre os diversos padrões de glomerulonefrite, evidenciado que a presença de células T CD4⁺ não está relacionada com o desenvolvimento do tipo de lesão glomerular.

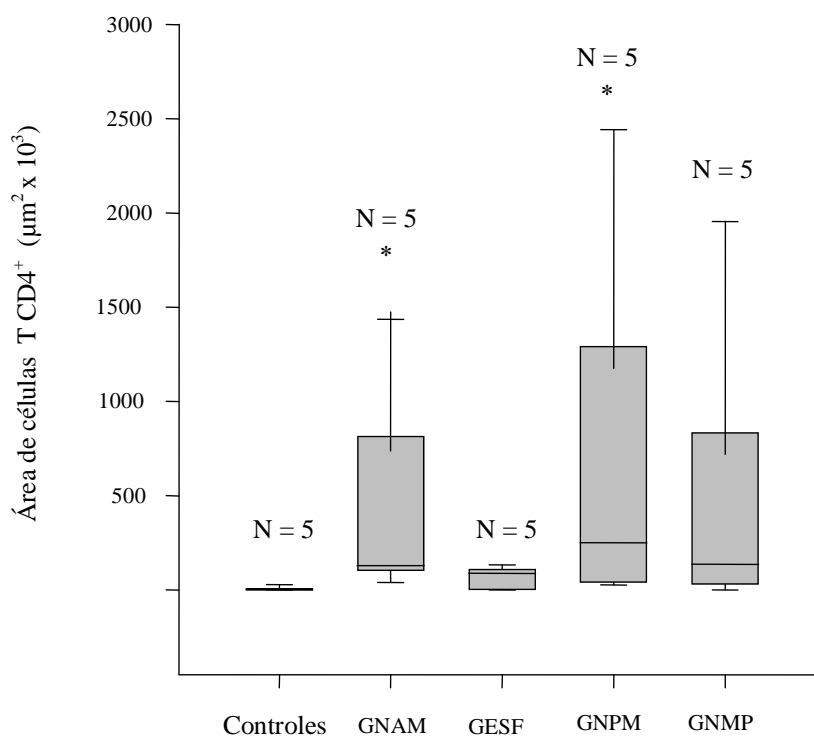


Figura 7. Análise morfométrica da área de células T CD4⁺ no infiltrado inflamatório intersticial em cães controles não infectados e infectados naturalmente por *Leishmania (L.) chagasi*, com padrões diversos de GN. N = número de casos por grupo. * p = 0,0343; teste Kruskal-Wallis e Dunn)

No presente estudo verificou-se, pela análise histopatológica, que havia macrófagos no infiltrado inflamatório intersticial e, por análise imunoistoquímica, presença de células T CD8⁺ em menor quantidade que células T CD4⁺, confirmando participação de células T no mecanismo de lesão na nefrite intersticial em cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*. Várias pesquisas mostram que muitas doenças renais resultam da deposição de complexo imune circulante ou de complexo imune “in situ”, decorrente da reação entre anticorpos e antígenos renais ou antígenos estranhos, inclusive na LV (Macianti et al., 1989). Contudo, cabe destacar que a patogênese da lesão renal túbulo-intersticial ainda não está totalmente esclarecida, mas o mecanismo imunológico mediado por células é considerado tanto para homem (Boucher et al., 1986) quanto para modelos experimentais (Neilson et al., 1984), o que deve ser considerado, também, para a nefrite intersticial na LVC, conforme resultados obtidos neste trabalho.

Apesar de não ter sido possível realizar imunomarcagem de outros tipos e subtipos celulares, presentes no infiltrado inflamatório do tecido renal analisado, especialmente por indisponibilidade de anticorpos específicos para cães, a análise imunoistoquímica associada à análise histopatológica, foram importantes para caracterizar o infiltrado inflamatório constituído, basicamente, por linfócitos T e macrófagos, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos, a presença de antígeno de *Leishmania* no interstício renal, sua interação com células T, mediada por macrófagos do infiltrado inflamatório e pelas células epiteliais tubulares, constitui-se o mecanismo básico de lesão renal túbulo-intersticial na LVC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Cellular and molecular immunology*. 3 ed. Philadelphia:W.B. Saunders, p.494, 1997.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic development in the last years. *Clin. Infect. Dis.*, v.24, p.684-703, 1997.

BOUCHER, A.; DROZ, D.; ADAFER, E. Characterization of mononuclear cells subsets in renal cellular interstitial infiltrates. *Kidney Intern.* v.29, p.1043-1049, 1986.

COLLINS, A. B. Immunofluorescence. In: COLVIN, R. B. ; BHAN, A. K.; McCLUSKEY, R. T. *Diagnostical immunopathology*, 2.ed. New York: Raven Press, 1995. p.699-710.

COSTA, F. A. L. ; GUERRA, J. L. ; SILVA, S. M. M. S. et al. CD4⁺ T cells participate in the nephropathy in canine visceral leishmaniasis. *Braz. J. Med. Bio. Res.*, v.33, p.1455-58, 2000.

COSTA, F. A. L. Patologia e Imunopatogenia da nefropatia da Leishmaniose visceral canina. 2001.129 f. *Tese* (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, SP.

COSTA, F. A. L.; GUERRA, J. L.; SILVA, S. M. M. S. et al. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet. Pathol.*, v.40, p.677-684, 2003.

DUARTE, M. I. S. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Leishmaniose visceral (calazar). In: BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo Patologia*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p.1215-75.

DUARTE, M. I.; SILVA, M. R.; GOTO, H. et al. Interstitial nephritis in human kala-azar. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.77, n.4, p.531-7, 1983.

EVANS, T. G.; SMITH, D.; PEARSON, R. D. Humoral factors and nonspecific immune suppression in Syrian hamsters infected with *Leishmania donovani*. *J. Parasitol.*, v.76, p.212-217, 1990.

FILLIT, H. M.; ZABRISKIE, J. B. Cellular immunity in glomerulonephritis. *Am. Assoc. of Pathol.*, v.109, n.2, p.227-243, 1982.

FUNDAÇÃO MUNICIPAL DE SAÚDE. *Centro de controle de Zoonoses*. Teresina-PI, 1998.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. IN: PETERS, W.; LILLICK-KENDRICK, R. *Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press, p.120, 1987.

LANZARO, G. C.; WARBURG, A. Genetic variability in phlebotomine sandflies : possible implications for leishmaniasis epidemiology. *Parasitol. Today*, v.11, n.4, p.151- 154, 1995.

MACIANTI, F.; POLI, A.; BIONDA, A. Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. *Parasitol.*, v.31, n.2-3, p.213-230, 1989

MAIN, I. W.; NIKOLIC-PATERSON, D. J.; ATKINS, R. C. T cells and macrophages and their role in renal injury. *Sem. in Nephrol.*, v.12, n.5, p.395-407, 1992.

MARTIN, M.; SCHWINZER, R.; SCHELLEKENS, H. et al. Glomerular mesangial cells in local inflammation. Induction of the expression of MHC class II antigens by IFN- γ . *J. Immunol.*, v.142, n.6, p.1887-94, 1989.

McCLUSKEY, R. T.; BHAN, A. K. Cell-mediated mechanism in renal diseases. *Kidney Intern.*, v.21, p. 2-6, 1982. Sup. 11.

NEILSON, E. G.; JIMENEZ, S. A.; PHILLIPS, S. M. Cell mediated immunity in interstitial nephritis. III. T lymphocyte-mediated fibroblast proliferation and collagen synthesis: An autoimmune mechanism of renal fibrogenesis in interstitial nephritis. *J. Immunol.*, v.125, p.1708-1714, 1980.

NEILSON, E. G; MCCAFFERTY, E.; FELDMAN, A. Spontaneous interstitial nephritis in kdkd mice. An experimental model of autoimmune renal disease. *J. Immun.*, v.133, p.2560-2565, 1984.

NICKOL, A. D.; BONVENTRE, P. F. Immunossupression associated with visceral leishmaniasis of hamsters. *Parasitol. Immun.*, v.7, p.439-449, 1985.

Van ALDERWEGEN, I. A; BARRETO, A. C.; ROSA, A. C. et al. Natural infection of *Equus asinus* by *Leishmania braziliensis brasiliensis*-Bahia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.81, p.237-238, 1986.

WEISINGER, J. R.; PINTO, A.; VELAZQUEZ, G. A. et al. Clinical and histological kidney involvement in human kala-azar. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.27, n.2, p.357-359, 1978.

CONCLUSÕES GERAIS

- As lesões renais túbulo-intersticiais são próprias da leishmaniose visceral;
- Células epiteliais dos túbulos renais fagocitam antígeno de leishmânia e participam do processo de lesão renal;
- A presença de antígeno de leishmânia no tecido renal, provoca lesão renal túbulo-intersticial;
- O mecanismo imune celular está presente na nefrite intersticial da leishmaniose visceral, com maior participação de células T CD4+ do que células T CD8+;
- As lesões renais túbulo-intersticiais, na leishmaniose visceral, progridem com o tempo de infecção e provocam perda de função renal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 3 ed. Philadelphia:W.B. Saunders, p.494, 1997.

- ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. G. **Leishmaniose Visceral Canina. Schering – Plough.** Departamento de Medicina veterinária, UFRP. Recife, p. 3-8, 2004.
- ANDRADE, Z. A.; IABUKI, K. A nefropatia do calazar. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 14, n. 1, p. 51-4, 1972.
- BADARÓ, R.; JONES, T. C.; LOURENÇO, R. et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, p. 639-649, 1986.
- BAKER, A. J.; MOONEY, A.; HUGHES, J. et al. Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. **Journal Clinical Investigation**, v. 94, n. 5, p. 2105-2116, 1994.
- BENDERITTER, T. H.; CASANOVA, P.; NASHKIDACHVILLI, L. et al. Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. **Annual Tropical Medical Parasitology**, v. 82, n. 4, p. 335-341, 1988.
- BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic development in the last years. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 24, p. 684-703, 1997.
- BOHLE, A.; MACKENSEN-HAEN, S.; GISE, H. V. Significance of tubulointerstitial changes in the renal cortex for the excretory function and concentration ability of the kidney: a morphometric contribution. **American Journal of Nephrology**, v.7, p. 421-33, 1987.
- BOUCHER, A.; DROZ, D.; ADAFER, E. Characterization of mononuclear cells subsets in renal cellular interstitial infiltrates. **Kidney International**. v.29, p.1043-1049, 1986.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 7, n. 72, p. 248-54, 1976.
- BRANDÃO-FILHO, S.; SHAW, J. Leishmaniasis in Brasil. **Parasitology Today**, v. 10, n. 9, p. 329-330, 1994.

BRASIL, 2004. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Ministério da Saúde (MS) Secretaria de vigilância em Saúde (SVS). Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília. DF. 2004.

BRITO, T.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; AMATO NETO, V. et al. Glomerular involvement in human kala azar: A light, immunofluorescent and electron microscopic study based on kidney biopsies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.24, n.1, p.9-18, 1975.

CAMARGO, B. M. H.; MORAES, J. R. E.; CARVALHO, M. B. et al. Alterações morfológicas e funcionais dos rins de cães com insuficiência renal crônica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.781-787, 2006.

CARAVACA, F.; MUNHOZ, A.; PIZARRO, J. L. et al. Acute renal failure in visceral leishmaniasis. **American Journal of Nephrology**, v.11, p.350, 1991.

CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, p.343, 1998.

CARLYLE, T. J.; DUNCAN, R. H; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6.ed. Manole, cap.24, p.599-1149, 2000.

COLLINS, A. B. Immunofluorescence. In: COLVIN, R. B.; BHAN, A. K.; McCLUSKEY, R. T. **Diagnostical immunopathology**, 2.ed. New York: Raven Press, 1995, p.699-710.

COSTA, F. A. L. ; GUERRA, J. L. ; SILVA, S. M. M. S. et al. CD4⁺ T cells participate in the nephropathy in canine visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v.33, p.1455-58, 2000.

COSTA, F. A. L. Patologia e Imunopatogenia da nefropatia da Leishmaniose visceral canina. 2001.129 f. **Tese** (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São paulo, São Paulo.

COSTA, F. A. L.; GUERRA, J. L.; SILVA, S. M. M. S. et al. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, v.40, p.677-684, 2003.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa *Lycalopex vetulus* como reservatórios da *L. donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. **Hospital**, v.48, p.61-70, 1955.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.27, p.307, 2004.

DONNELLY, K. B.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Histologic Characterization of Experimental Cutaneous Leishmaniasis in Mice Infected with *Leishmania braziliensis* in the Presence or Absence of Sand Fly Vector Salivary Gland Lysate. **The Journal of Parasitology**, v.84, n.1, p.97-103, 1998.

DUARTE, M. I.; SILVA, M. R.; GOTO, H. et al. Interstitial nephritis in human kala-azar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.77, n.4, p.531-7, 1983.

DUARTE, M. I. S. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Leishmaniose visceral (Calazar). In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 1215-1275.

DUARTE, M. I. S.; SESSO, A.; BRITO, T. Relationship between glomerular mesangial cell proliferation and amyloid deposition as seen by ultrastructural and morphometric analysis in experimental Kala-azar of the hamster. **American Journal of Pathology**, v.92, n.1, p.85-98, 1978.

DUTRA, M.; MARTINELLI, R.; CARVALHO, E. M.; RODRIGUES, L. E.; BRITO, E.; ROCHA, H. Renal involvement in visceral leishmaniasis. **American Journal Kidney Disease**, v.6, n.1, p.22-7, 1985.

ETTINGER, S. J., FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: moléstia de cão e do gato**. 4ª ed. São Paulo: Manole, v.2, p.3020, 1997.

EVANS, D. A.; REBÊLO, M. E. Leishmaniose viscero-cutânea no cão doméstico: estudo laboratorial e clínico. Lisboa: **Instituto de Proteção da Produção Agro-Alimentar/Centro Nacional de Proteção e Controle Zôo-Sanitário**, p.67, 1996.

EVANS, T. G.; SMITH, D.; PEARSON, R. D. Humoral factors and nonspecific immune suppression in Syrian hamsters infected with *Leishmania donovani*. **Journal Parasitology**, v.76, p.212-217, 1990.

- FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. **Proceedings of the International canine Leishmaniasis Forum**. Barcelona, Spain, p.6-10, 1999.
- FILHO, N. S.; TELMA, M. A. F. F.; COSTA, J. M. L. Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36, n.2, p.1-9, 2003.
- FILLIT, H. M.; ZABRISKIE, J. B. Cellular immunity in glomerulonephritis. **American Association of Pathologists**, v.109, n.2, p.227-243, 1982.
- FUNDAÇÃO MUNICIPAL DE SAÚDE. **Centro de controle de Zoonoses**. Teresina-PI, 1998.
- FUNDAÇÃO MUNICIPAL DE SAÚDE. **Centro de Controle de Zoonoses**. Teresina-PI, 2006.
- GRAUER, G. F. Glomerulonephritis. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery**, v.7, n.3, p.187-197, 1992.
- JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. IN: MAXIE, M. G. The urinary system. New York: Academic Press, cap.5, v.2, p.447-538, 1985.
- KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; LIGHTNER, L. et al. Visceral leishmaniasis in the german shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Veterinary Pathology**, v.21, p.74, 1984.
- KELLY, C. J. Development and Expression of nephritogenic T cells. IN: NEILSON, E. G.; COUSER, W. G. **Immunologic renal diseases**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p.251-263, 1997.
- KOOTSTRA, C. J.; SUTMULLER, M.; BAELDE, H. J. et al. Association between leukocyte infiltration and development of glomeruloesclerosis in experimental lupus nephritis. **Journal of Pathology**, v.184, p.219-25, 1998.

LAINSON, R e SHAW, J. J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brasil. **Ciência e Cultura**, v.44, n.2-3, 1992.

LAINSON, R. & SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; LILLICK-KENDRICK, R. (Ed). **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press, p.120, 1987.

LANZARO, G. C.; WARBURG, A Genetic variability in phlebotomine sandflies : possible implications for leishmaniasis epidemiology. **Parasitology Today**, v.11, n.4, p.151- 154, 1995.

LINTON, A. L.; CLARK, W. F.; DRIEDGER, A. A. et al. M. Acute interstitial nephritis due to drugs. Review of the literature with a report of nine cases. **Annals of Internal Medicine**, v.93, p.735-41, 1980.

MACIANTI, F.; POLI, A.; BIONDA, A. Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. **Parasitology**, v.31, n.2-3, p.213-230, 1989

MAGIL, A. B. Tubulointerstitial lesions in human membranous glomerulonephritis: relationship to proteinuria. **American Journal Kidney Disease**, v.25, n.3, p.9-375, 1995.

MAIN, I. W.; NIKOLIC-PATERSON, D. J.; ATKINS, R. C. T cells and macrophages and their role in renal injury. **Seminars in Nephrology**, v.12, n.5, p.395-407, 1992.

MARTIN, M.; SCHWINZER, R.; SCHELLEKENS, H. et al. Glomerular mesangial cells in local inflammation. Induction of the expression of MHC class II antigens by IFN- γ . **The Journal of Immunology**, v.142, n.6, p.1887-94, 1989.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S. et al. Leishmaniose visceral – Calazar. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.41, n.5, p.69-70, 1981.

MATHIAS, R.; COSTA, F. A. L.; GOTO, H. Detection of immunoglobulin in the lung and in the liver during visceral leishmaniasis in hamsters. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, n.4, p.539-43, 2001.

- McCLUSKEY, R. T.; BHAN, A. K. Cell-mediated mechanism in renal diseases. **Kidney International**, v.21, p.2-6, 1982. Sup. 11.
- MENÉ, P.; AMORE, A. Apoptosis: potential role in renal disease. **Nephrology Dialysis Transplants**, v.13, p.1936-43, 1998.
- MONTEIRO, P. S.; LACERDA, M. M.; ARIAS, J. R. Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.27, p.67, 1994. Suplemento III.
- NEILSON, E. G.; JIMENEZ, S. A.; PHILLIPS, S. M. Cell mediated immunity in interstitial nephritis. III. T lymphocyte-mediated fibroblast proliferation and collagen synthesis: An autoimmune mechanism of renal fibrogenesis in interstitial nephritis. **Journal Immunology**, v.125, p.1708-1714, 1980.
- NEILSON, E. G.; MCCAFFERTY, E.; FELDMAN, A. Spontaneous interstitial nephritis in kdkd mice. An experimental model of autoimmune renal disease. **Journal Immunology**, v.133, p.2560-2565, 1984.
- NICKOL, A. D.; BONVENTRE, P. F. Immunossuppression associated with visceral leishmaniasis of hamsters. **Parasite Immunology**, v.7, p.439-449, 1985.
- NICOLLE, C.; COMTE, C. **Origine du Kala-azar**. CRL' Acad Sci; 146:789, 1908.
- NIETO, C. G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M. A.; SERRANO, F.; REDONDO, E. Pathological changes in Kidneys of dogs with natural leishmania infection. **Veterinary Parasitology**, v.45, n.1-2, p.33-47, 1992.
- OLIVEIRA, C. R.; FREITAS, J. C.; SILVA, F. G. et al. Diagnóstico laboratorial da leptospirose em um cão utilizando diferentes técnicas. **Arquive Institute Biology**, v.72, n.1, p.111-113, 2005.
- OLSEN, T. S.; WASSEF, N. F.; OLSEN, H. S. et a. Ultrastructure of the kidney in acute interstitial nephritis. **Ultrastructural Pathology**, v.10, p.1-16, 1986.
- ORTIZ, A.; LORZ, C.; MARINA, P. et al. Role and regulation of apoptotic cell death in the kidney. **Frontiers in Bioscience**, n.5, p.735-749, 2000.

PAPADOPOULOU, C.; KOSTOULA, A.; DIMITRIOU, D. et al. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern. **Journal of Infection**, v.50, p.53-60, 2005.

PEARSON, R. D. Pathology of leishmaniasis. In: WARREN, K. S. **Immunology and molecular biology of parasitic infections**. Massachusetts, Blackwell Scientific Publications, 1993, p.71-86.

PEARSON, R. D.; SOUSA, Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical of Infections Diseases**, v.22, p.1-13, 1996.

POLI, A.; ABRAMO, F.; MANCIANTI, et al. Renal involvement in canine leishmaniasis: a light- microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. **Nephron**, v.57, n.4, p.444-452, 1991.

POZIO, E.; GRANDONI, L.; GRAMICCIA, M. et al. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). **Acta Tropical**, v.38, p.383-393, 1981.

RAMOS, G. P.; FILHO, F. B. R.; BOTELHO, G. G. et al. Valores bioquímicos-séricos de cães portadores de leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.16, n.5, p.192-196, 1994.

REICHMANN, M. L. A. B. Leishmaniose visceral canina como zoonose reemergente. 1º Fórum sobre leishmaniose visceral canina. **Anais**. Jaboticabal-SP, 2006.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotas. **Experimental Parasitology**, v.69, p.100-103, 1989.

SANTA ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, v.2, n.11, p.24-28, 1997.

SARTORI, A.; OLIVEIRA, A. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C. et al. Immune complex glomerulonephritis in experimental Kala-azar. **Parasite Immunology**, v.9, n.1, p.93-103, 1987.

SHIMIZU, A.; MASUDA, Y; KITAMURA, H. et al. Apoptosis in progressive crescentic glomerulonephritis. **Laboratory Investigation**, v.74, n.5, p.941, 1996.

SILVA, A. V. M.; PAULA, A. A.; CABRERA, M. A. A. et al. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21, n.1, p.324-328, 2005.

THADEI, C. L. **Leishmaniose (Calazar)**. Disponível em: <http://www.vira-lata.org/doc2.shtml>. Acessado em: 14 set. 2007.

TISHER, C. C.; BRENNER, B. M. **Renal pathology with clinical and functional correlations**, 2.ed. v.1., J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1994, 978p.

Van ALDERWEGEN, I. A; BARRETO, A. C.; ROSA, A. C. et al. Natural infection of *Equus asinus* by *Leishmania braziliensis brasiliensis*-Bahia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, p.237-238, 1986.

VILAFRANCA, M.; FERRER, L.; WOHLSEIN, P. et al. Participation of monocytes and macrophages in canine glomerular disease, **Journal Veterinary Medicine**, v.41, p.770-779, 1994.

WALTERS, L. L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. **J. EUK. Microbiology**, v.40, p.196-206, 1993.

WEISINGER, J. R.; PINTO, A.; VELAZQUEZ, G. A. et al. Clinical and histological kidney involvement in human kala-azar. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.27, n.2, p.357-359, 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Disión of control of tropical disease. Leishmaniasis control**. WHO/CTD, 1998. Disponível em : <<http://www.who.int/ctd/html/leisgeo.html>> Em : 03, nov. 2005.

WONG, V. Y.; KELLER, P. M.; NUTTALL, M. E. et al. Role of caspases in human renal proximal tubular epithelial cell apoptosis. **Europe Journal Pharmacology**, v.433, p.135-0, 2001.

YIN, H.; NORRIS, D. E.; LANZARO, G. C. Sibling species in the *Lutzomyia longipalpis* complex differ in levels of mRNA expression for the salivary peptide, maxadilan. **Insect Molecular Biology**, v.9, n.3, p.309-314, 2000.

ZEISS, C. J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. **Veterinary Pathology**, n.40, p.481-495, 2003.

A N E X O

Anexo 1A. Análise semi-quantitativa (escores) das alterações renais de 60 amostras de rins de cães infectados naturalmente com *Leishmania (L.)chagasi* e controles não infectados

Região cortical																
Túbulo										Interstício						
AN. Nº	Padrões GN	Calcif.	Deg. Hial.	Cil. Hial.	Necrose	Deg. Hidr.	Atrofia	Dilat.	Hipert.	Nefrite	Fibrose	Edema	Hemorr.	F. cells	Deg. Pigm.	Congest.
64	CN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
65	CN	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
66	CN	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67	CN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68	CN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MEDIANA		0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	GNAM	0	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	3	0
6	GNAM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	GNAM	0	1	1	0	0	2	0	0	3	3	0	0	0	0	3
15	GNAM	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	3
16	GNAM	0	4	1	0	3	0	0	0	5	3	0	0	0	0	3
1/125	GNAM	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	1	0
5/129	GNAM	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0
15A	GNAM	0	3	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	1
48	GNAM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MEDIANA		0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
4	GESF	0	0	1	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	2	0
13	GESF	0	0	3	0	0	2	0	0	2	3	0	0	0	0	0
26	GESF	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	3
27	GESF	0	2	1	0	3	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
28	GESF	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	4
29	GESF	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0
3/127	GESF	0	2	1	0	3	1	0	0	1	0	0	0	0	3	2
4/128	GESF	0	0	2	0	3	2	0	0	0	1	0	0	0	0	2
17A	GESF	0	0	1	0	0	1	0	0	2	1	0	0	0	1	0
MEDIANA		0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
3	GNPM	0	1	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
10	GNPM	4	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	5	3

11A	GNPM	0	3	4	0	2	4	3	0	3	4	0	0	0	0	0
14	GNPM	0	3	0	0	0	1	0	0	1	2	0	0	0	0	4
17	GNPM	0	1	1	0	0	1	0	0	1	2	0	0	0	1	3
18	GNPM	0	3	2	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	0	2
18A	GNPM	0	2	1	0	3	2	0	0	2	3	0	0	0	2	0
22	GNPM	0	2	1	0	3	0	0	0	3	1	0	0	0	0	2
23	GNPM	0	0	0	0	0	2	0	0	2	3	0	0	0	0	2
31	GNPM	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
32	GNPM	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
43	GNPM	3	0	0	0	2	1	0	1	1	0	0	0	0	2	0
44	GNPM	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2
45	GNPM	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0
47	GNPM	0	0	0	0	1	3	0	0	3	1	0	0	0	1	0
55	GNPM	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	GNPM	0	0	0	0	3	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
MEDIANA		0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
2	GNMP	0	0	3	0	0	0	0	0	4	2	0	0	0	0	0
8	GNMP	0	5	3	0	0	4	0	0	2	4	0	0	0	0	0
8A	GNMP	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	4	0
12A	GNMP	0	4	2	0	0	1	0	0	3	2	0	0	0	0	0
20	GNMP	0	3	1	0	2	1	0	0	3	2	0	0	0	0	3
33	GNMP	0	3	0	0	3	1	0	0	1	1	0	0	0	2	0
35	GNMP	0	1	2	0	0	2	2	0	3	4	0	0	0	0	0
36	GNMP	0	1	2	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
37	GNMP	0	0	1	0	1	0	2	0	3	3	0	0	0	0	0
39	GNMP	1	0	0	0	0	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0
40	GNMP	0	1	2	0	2	3	0	0	1	3	0	0	0	2	2
41	GNMP	0	1	2	0	1	1	1	0	2	1	0	0	0	0	3
42	GNMP	0	0	0	0	2	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0
50	GNMP	0	3	4	2	3	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
51	GNMP	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
52	GNMP	0	0	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	2	0

26	GESF	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	GESF	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
28	GESF	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
29	GESF	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3/127	GESF	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	2
4/128	GESF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17A	GESF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MEDIANA		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	GNPM	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
10	GNPM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11A	GNPM	0	0	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	GNPM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	GNPM	0	2	0	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0
18	GNPM	0	0	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
18A	GNPM	0	0	2	0	2	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0
22	GNPM	0	0	2	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0	0	2
23	GNPM	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2	0	0	0	0	0
31	GNPM	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
32	GNPM	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3
43	GNPM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	GNPM	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
45	GNPM	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	GNPM	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
55	GNPM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	GNPM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MEDIANA		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	GNPM	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0
8	GNMP	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8A	GNMP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12A	GNMP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	GNMP	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
33	GNMP	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

35	GNMP	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
36	GNMP	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	GNMP	0	0	3	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0
39	GNMP	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
40	GNMP	3	2	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
41	GNMP	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
42	GNMP	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	GNMP	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
51	GNMP	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
52	GNMP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	GNMP	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
62	GNMP	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4
MEDIANA		0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Anexo 2 - Análise morfométrica das alterações renais de 47 cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* e controles não infectados. H-E.

Infiltrado inflamatório intersticial						
Animal	Padrões de GN	Área total ($\mu\text{m}^2 \times 10^3$)	Cortical		Campos	
			Área ($\mu\text{m}^2 \times 10^3$)	Área ($\mu\text{m}^2 \times 10^3$)	Cortical	Medular
64	CN	1980,8 x 50c = 99040	0	0	50	30
65	CN	1980887.75	3,3	0	35	30
66	CN	1980887.75	2,6	0	50	30
67	CN	1980887.75	0	0	50	30
68	CN	1980887.75	6	0	50	45

MEDIANA		1980887.75	2,6	0	50	30
1	GNAM	1980887.75	475,1	141,2	50	30
11	GNAM	1980887.75	4828,3	1297,8	50	50
15	GNAM	1980887.75	1820,4	411,7	50	27
16	GNAM	1980887.75	8289,8	855,3	50	50
15A	GNAM	1980887.75	2666,9	332,3	50	50
48	GNAM	1980887.75	136,9	12,5	30	20
MEDIANA		1980887.75	2243,6	372	50	40
13	GESF	1980887.75	2894,4	147,6	50	38
26	GESF	1980887.75	537,1	762,8	50	30
28	GESF	1980887.75	1427,1	945,6	50	37
29	GESF	1980887.75	613,5	0	50	30
3/127	GESF	1980887.75	590,6	106,3	50	50
4/128	GESF	1980887.75	851,6	450,3	50	50
17A	GESF	1980887.75	929,5	1583,6	50	34
MEDIANA		1980887.75	851,6	450,3	50	37
10	GNPM	1980887.75	65,7	0	50	50
11A	GNPM	1980887.75	4988,1	2697,1	50	20
14	GNPM	1980887.75	844,2	229,7	50	50
17	GNPM	1980887.75	1978,3	0	50	21
18	GNPM	1980887.75	10729,9	14778	50	40
18A	GNPM	1980887.75	507,6	140,4	50	50
22	GNPM	1980887.75	4946	3131,3	50	50
23	GNPM	1980887.75	843,8	117,5	50	30
31	GNPM	1980887.75	1706,9	656,7	50	20
32	GNPM	1980887.75	1544,3	3149,9	50	50
43	GNPM	1980887.75	237	332,5	50	50

44	GNPM	1980887.75	1324,5	2120,6	50	50
45	GNPM	1980887.75	1893,6	271,5	50	50
47	GNPM	1980887.75	6600,5	11798,9	50	50
55	GNPM	1980887.75	684,4	1472,9	50	30
56	GNPM	1980887.75	286	399,5	50	50
MEDIANA		1980887.75	1434,4	528,1	50	50
8	GNMP	1980887.75	27201,5	715,3	50	50
8A	GNMP	1980887.75	1079,9	246,4	50	40
20	GNMP	1980887.75	6526,5	6534	50	50
33	GNMP	1980887.75	1930,9	465,1	50	50
35	GNMP	1980887.75	755,7	2978	50	50
36	GNMP	1980887.75	1290,3	1284,1	50	50
37	GNMP	1980887.75	5153	3469,2	50	50
39	GNMP	1980887.75	832	37,8	50	20
40	GNMP	1980887.75	2303,4	2220,6	50	30
41	GNMP	1980887.75	1459,7	851,4	50	15
42	GNMP	1980887.75	2346,1	2202,8	50	15
50	GNMP	1980887.75	3539	4916,2	50	50
62	GNMP	1980887.75	8761,3	1612,8	50	50
MEDIANA		1980887.75	2303,4	1612,8	50	50

CAPÍTULO 2

Anexo 1A. Análise morfométrica das alterações tubulares e intersticiais da região cortical do rim de 20 cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi* e em cinco cães não infectados, corados por imunoperoxidase.

--	--	--	--	--

Animais	Padrões de GN	Antígeno de <i>Leishmania</i>		Célula T CD4 ⁺		Célula T CD8 ⁺	
		Área (µm ² x10 ³)	Células (µm ² x10 ³)	Área (µm ² x10 ³)	Células (µm ² x10 ³)	Área (µm ² x10 ³)	Células (µm ² x10 ³)
9	CN	0	0	0	0	0	0
10	CN	0	0	0	0	0	0
64	CN	0	0	0	0	0	0
65	CN	0	0	0	0	0	0
66	CN	0	0	0	0	0	0
	Mediana	0	0	0	0	0	0
1	GNAM	174,5	54	123,5	52	0	0
1/125	GNAM	4808,6	1282	1554,1	302	45,5	29
5/129	GNAM	479,2	216	129,5	73	26,4	8
15	GNAM	61,1	20	39,3	17	11,7	15
16	GNAM	383,9	137	569,9	174	46,7	19
	Mediana	383,9	137	129,5	73	45,5	19
3.127	GESF	478,5	221	133,0	57	0	0
4	GESF	9,7	6	101,8	47	148,5	63
4.128	GESF	383,3	136	87,5	33	0	0
17 A	GESF	0	0	0	0	0	0
29	GESF	40,5	17	0	0	54,8	18
	Mediana	40,5	17	87,5	33	0	0
3	GNPM	103,4	39	43,8	29	65,9	34
11 A	GNPM	9130,1	1386	870,3	351	441,1	76
17	GNPM	392,1	113	25,8	14	0	0
18	GNPM	806,4	159	367,4	145	588,0	198
31	GNPM	724,6	237	2559,6	462	76,9	51
	Mediana	724,6	159	367,4	145	76,9	51
2	GNMP	827,7	230	421,8	111	0	0
8	GNMP	8142,1	1540	137,1	68	0	0
12 A	GNMP	339,8	108	2072,5	553	377,1	133
20	GNMP	68,7	9	39,4	11	24,3	14
50	GNMP	14,3	8	0	0	0	0
	Mediana	339,8	108	137,1	68	0	0

Anexo 1B. Análise morfométrica das alterações tubulares e intersticiais da região medular do rim de 20 cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi* e em cinco cães não infectados, corados por imunoperoxidase.

Animais	Padrões de GN	Antígeno de <i>Leishmania</i>		Célula T CD4 ⁺		Célula T CD8 ⁺	
		Área (µm ² x10 ³)	Células (µm ² x10 ³)	Área (µm ² x10 ³)	Células (µm ² x10 ³)	Áreas (µm ² x10 ³)	Células (µm ² x10 ³)
9	CN	0	0	0	0	0	0
10	CN	0	0	0	0	0	0
64	CN	0	0	0	0	0	0
65	CN	0	0	0	0	0	0
66	CN	0	0	0	0	0	0
	Mediana	0	0	0	0	0	0
1	GNAM	229,7	67	14,2	7	0	0
1/125	GNAM	3428,4	525	1054,0	195	0	0
5/129	GNAM	342,7	125	9,03	5	0	0
15	GNAM	0	0	0	0	0	0
16	GNAM	959,3	256	3054,8	182	731,1	24
	Mediana	342,7	125	14,2	7	0	0
3.127	GESF	104,1	59	121,8	32	0	0
4	GESF	0	0	19,2	12	23,5	14
4.128	GESF	738,7	216	44,7	23	0	0
17 A	GESF	112,4	35	23,0	9	0	0
29	GESF	10,6	7	0	0	0	0
	Mediana	104,1	35	23,0	12	0	0
3	GNPM	27,4	8	0	0	0	0
11 A	GNPM	1401,0	275	1654,6	379	20,6	11
17	GNPM	549,6	151	56,1	24	0	0
18	GNPM	4607,5	255	1269,3	271	1741,3	417
31	GNPM	22,0	12	1401,9	264	245,8	79
	Mediana	549,6	151	1269,3	264	20,6	11
2	GNMP	406,5	110	65,9	10	14,4	7

8	GNMP	246,1	82	0	0	0	0
12 A	GNMP	657,7	179	264,3	83	121,7	47
20	GNMP	0	0	151,9	49	49,8	21
50	GNMP	27,4	33	0	0	5,4	5
	Mediana	246,1	82	65,9	10	14,4	7