

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

CORRELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE ANTÍGENOS DE
***LEISHMANIA* sp, LINFÓCITOS T CD3+ E B CD79+ E**
ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NO TECIDO RENAL
DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

João Henrique Artero de Carvalho Leite

Médico Veterinário

JABOTICABAL- SÃO PAULO – BRASIL

2012

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

**CORRELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE ANTÍGENOS DE
LEISHMANIA sp, LINFÓCITOS T CD3+ E T CD79+ E
ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NO TECIDO RENAL
DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

João Henrique Artero de Carvalho Leite

Orientadora: Prof^a. Adjunto Mary Marcondes

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

JABOTICABAL- SÃO PAULO - BRASIL

Julho de 2012

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOÃO HENRIQUE ARTERO DE CARVALHO LEITE – Nascido na cidade de Presidente Prudente em 12 de agosto de 1985. Médico Veterinário formado pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- *campus* de Araçatuba, no ano de 2007. Nos anos de 2008 a 2010 fez Residência Médico-Veterinária em Clínica Médica de Animais de Companhia na Universidade Estadual de Londrina. Em março de 2010, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, *campus* de Jaboticabal.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

Á minha mãe, Tereza, sinônimo mais que perfeito do que é ser mãe. Carinhosa, sensível, atenciosa com absolutamente todos que a cercam, zelosa por seus entes e seus cãezinhos e gatinhos. Agradeço todos os dias à sorte de ter você como minha mãe e espero que um dia consiga ser tão bondoso como você é.

Ao meu pai, João, o meu maior incentivador. Por apoiar incondicionalmente meu aprimoramento profissional, pelos exemplos dados desde criança, por me ensinar fazer o que é certo e pelos conselhos diários que norteiam minhas decisões.

Á minha namorada, Juliana, meu amor. Fiel, amorosa e companheira. Imprescindível para realização deste projeto. Você é a razão que me faltava, e hoje tudo que faço é para você. Quero sempre estar contigo, para continuarmos construindo nossa história.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me acompanha.

À minha orientadora, Prof^a. Adjunto Mary Marcondes, por toda a dedicação, paciência e compreensão durante o desenvolvimento deste projeto. Muito obrigado por ter me aceito como orientado e por estar sempre disposta a atender minhas dúvidas em qualquer horário. Eu não poderia ter escolhido uma orientadora melhor!

À Pós-graduação da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV/UNESP, *campus* de Jaboticabal, pela oportunidade oferecida para realização do Curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo de pós-graduação, no período de 2010 2012.

Aos Prof. Titular Aparecido Antonio Camacho e a Prof^a. Adjunto Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV / UNESP, respectivamente, *campus* de Jaboticabal, pelas sugestões no Exame geral de Qualificação, que muito contribuíram para melhorar a apresentação final deste projeto.

À Prof^a. Dr^a. Sílvia Helena Venturoli Perri pela ajuda na elaboração da análise estatística.

Ao funcionário Lorinaldo do laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP - Araçatuba, pela amizade e suporte técnico durante o processamento do material para avaliação histopatológica e imuno-histoquímica.

À minha irmã Janaína, sempre incentivadora, amiga e presente, mesmo de tão longe, em todas as etapas da minha vida.

Aos Pós-Graduandos Eveline Tozzi Braga e Fernando Azadinho Rosa, pela amizade, união e convívio harmonioso durante todo o “infindável” período de coleta e processamento das amostras.

Ao amigo e ex-companheiro de casa, Caio, pelo apoio profissional e pessoal, pela amizade sincera e momentos de alegria durante esses anos.

Ao amigo Guto pela ajuda essencial na realização das reações de imunohistoquímica e pela paciência em ensinar todos os “truques” da técnica. Muito obrigado!

Aos amigos Gabriel, Diogo, Tati e Lívia, pela amizade e convivência agradável por todo esse período.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste projeto.

SUMÁRIO

Página

ÍNDICE DE TABELAS.....	ii
ÍNDICE DE QUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3. OBJETIVOS.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	
1. Animais utilizados.....	14
2. Delineamento experimental.....	15
3. Pesquisa de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. em linfonodos e/ou medula óssea.....	16
4. Pesquisa de anticorpos anti- <i>Ehrlichia canis</i> e de antígenos d <i>Dirofilaria</i>	16
5. Exame de urina tipo I.....	16
6. Determinação das concentrações séricas de creatinina.....	17
7. Relação proteína/creatinina urinária (P/C U).....	17
8. Exame histopatológico.....	17
9. Reação de imuno-histoquímica para pesquisa de <i>Leishmania</i> sp., linfócitos T CD3+ e B CD79+.....	18
10. Análise Estatística.....	20
V. RESULTADOS.....	21
VI. DISCUSSÃO.....	40
VII. CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
APÊNDICE.....	54

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Tabela 1. Distribuição quanto ao sexo, raça e faixa etária de 67 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, subdivididos em dois grupos de acordo com a presença (Grupo 1) e ausência (Grupo 2) de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. no tecido renal. Número absoluto e percentagem.....	22
Tabela 2. Número absoluto e percentagem de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, subdivididos em dois grupos de acordo com a presença (Grupo 1) e ausência (Grupo 2) de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp no tecido renal, baseado no estadiamento de doença renal crônica (DRC) proposto pela International renal interest society (IRIS), modificado por Cortadellas (2008).....	25
Tabela 3. Valores da média ($\bar{x}$), desvio padrão (S) e mediana (Md) da concentração sérica de creatinina (mg/dl) e da relação proteína/creatinina urinária (PC/U), de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) a presença de formas amastigotas do parasito no tecido renal.....	26

Tabela 4. Número absoluto e percentagem de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) formas amastigotas do parasita no tecido renal, de acordo com as alterações histopatológicas glomerulares e a intensidade da lesão. (GP = glomerulonefrite proliferativa; GM = glomerulonefrite membranosa; GMP = glomerulonefrite membranoproliferativa; GSF= glomeruloesclerose segmentar focal).....

27

Tabela 5. Número absoluto e percentagem de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) formas amastigotas do parasita no tecido renal, de acordo com a intensidade (escore) da nefrite intersticial.....

33

Tabela 6. Valores da média ($\bar{x}$), desvio padrão (s) e mediana (Md) da percentagem de área com imunomarcção de linfócitos T CD3+ e de linfócitos B CD79+ no tecido renal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) a presença do parasita nos rins.....

39

ÍNDICE DE QUADROS

Página

Quadro 1. Estadiamento da doença renal crônica de acordo com o protocolo proposto pelo “International Renal Interest Society” (IRIS), modificado por Cortadellas (2008).....	15
---	-----------

ÍNDICES DE FIGURAS

Página

Figura 1. Fotomicrografia de corte histológico de rim de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral, evidenciando a imagem por análise de captura, onde a coloração vermelha indica as áreas coradas em marrom, e a coloração amarela indica as demais áreas contra-coradas. (Barra = 50µm).....	20
Figura 2. Distribuição em percentagem, segundo as alterações de exame físico de 67 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.....	23
Figura 3. Lesões dermatológicas observadas em cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral. Notar a presença de ulceração e deposição de crostas hemorrágicas na face (a) e no membro pélvico (b).....	23
Figura 4. Distribuição, em porcentagem, segundo o estadiamento de doença renal crônica proposto pela International renal interest society (IRIS), modificado por Cortadellas e colaboradores (2008), de 45 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.....	24
Figura 5. Percentagem de distribuição de lesões glomerulares, segundo critérios estabelecidos pela Organização Mundial	28

da Saúde, de 62 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.....

Página

Figura 6. Percentagem de distribuição dos padrões histopatológicos evidenciados nas lesões glomerulares de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) a presença de formas amastigotas do parasito no tecido renal.....	28
Figura 7. Fotomicrografia de rim de cão (G1) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, evidenciando a presença de glomerulonefrite membranoproliferativa. Hematoxilina e eosina. (Barra = 50µm).....	29
Figura 8. Fotomicrografia de rim de cão (G1) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, evidenciando a presença de glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite intersticial (setas. Hematoxilina e eosina (Barra = 50µm).....	30
Figura 9. Fotomicrografia de cão (G1) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, evidenciando a presença de glomerulonefrite membranosa. Hematoxilina e eosina. (Barra = 50µm).....	30
Figura 10. Fotomicrografia de rim de cão (G1) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, evidenciando a presença de glomerulonefrite proliferativa. Hematoxilina e eosina (Barra = 50µm).....	31

Figura 11. Fotomicrografia de rim de cão (G1) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, evidenciando a presença de nefrite intersticial com infiltrado inflamatório mononuclear (setas). Hematoxilina e eosina. (Barra = 50µm)..... **32**

Figura 12. Percentagem da presença de nefrite intersticial em cortes histológicos de cães, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) formas amastigotas de *Leishmania* sp. nos rins..... **33**

Figura 13. Fotomicrografia de rim de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral, evidenciando a presença de imunomarcacão para *Leishmania* sp. (setas) no infiltrado inflamatório intersticial. Complexo Estreptavidina-Peroxidase) (Barra = 50µm)..... **34**

Figura 14. Fotomicrografia de rim de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral, evidenciando a presença de imunomarcacão para linfócitos T (setas) no infiltrado inflamatório intersticial. Complexo Estreptavidina-Peroxidase) (Barra = 50µm)..... **35**

Figura 15. Percentagem de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) formas amastigotas de *Leishmania* sp. nos rins, em que **36**

foi observada imunomarcção para linfócitos T CD3+ no tecido renal.....

Página

- Figura 16.** Percentagem da área marcada para linfócitos T CD3+ em tecidos renais de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) formas amastigotas de *Leishmania* sp. nos rins..... **36**
- Figura 17.** Fotomicrografia de corte histológico de rim de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral, evidenciando a presença de imunomarcção para linfócitos B CD79+ (setas) por meio de reação de imunohistoquímica, objetiva 40x..... **37**
- Figura 18.** Percentagem de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) formas amastigotas de *Leishmania* sp. nos rins, em que foi observada imunomarcção para linfócitos B CD79+ no tecido renal..... **38**
- Figura 19.** Percentagem da área marcada para linfócitos B CD79+ em tecidos renais de cães, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) formas amastigotas de *Leishmania* sp. nos rins..... **38**

CORRELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA* sp, LINFÓCITOS T CD3+ E B CD79+ E ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NO TECIDO RENAL DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO – O presente estudo teve por objetivo correlacionar as alterações laboratoriais, histopatológicas e a presença de linfócitos T CD3+ e linfócitos B CD79+, com a presença de *Leishmania* sp no tecido renal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. Para tanto foi utilizado um grupo (G1) constituído por 24 animais com formas amastigotas de *Leishmania* sp. no tecido renal, e outro (G2) composto por 43 cães sem evidências imuno-histoquímicas da presença do parasito nos rins. A prevalência de doença renal na população estudada foi de 100% nos animais de G1 e 56,09% de G2. Todos os cães de G1 e 53,6% dos cães de G2 possuíam relação proteína/creatinina urinária (P/C U) maior que 0,5, evidenciando-se uma correlação positiva entre a ocorrência de proteinúria intensa e a presença de *Leishmania* sp. no tecido renal ($p < 0,001$). Todos os cães de G1 e 88,4% dos cães de G2 apresentavam alterações glomerulares, sendo que a presença do parasito nos rins esteve correlacionada com uma maior prevalência e intensidade das lesões ($p < 0,001$). Imunomarcações para linfócitos T CD3+ foram observadas em 100% dos cães do grupo 1 e 97,7% do grupo 2, havendo uma correlação entre a presença de formas amastigotas no tecido renal e a intensidade do infiltrado inflamatório ($p < 0,0005$). Imunomarcações para linfócitos B CD79+ foram observadas em todos os cães do grupo 1 e em 55,8% do grupo 2 ($p < 0,0001$). Nos cães com parasitos no tecido renal observou-se uma maior intensidade do infiltrado de linfócitos B ($p < 0,0001$). A presença de *Leishmania* sp, linfócitos T CD3+ e de linfócitos B CD79+ nos rins de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral confirmam a participação do parasita, da imunidade celular e da imunidade humoral na patogênese da lesão renal.

Palavras- Chave: imuno-histoquímica, *Leishmania infantum chagasi*, rim

CORRELATION BETWEEN THE PRESENCE OF ANTIGENS OF *LEISHMANIA* sp, CD3+T CELLS AND CD79+B CELLS AND HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN RENAL TISSUE OF DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

ABSTRACT - The aim of this study was to correlate the laboratory and histopathological changes and the presence of CD3+T and CD79+ B cells with the presence of *Leishmania* sp in the renal tissue of dogs naturally affected by visceral leishmaniasis. For this purpose two groups were used: G1 with 24 dogs with amastigotes of *Leishmania* sp. in the renal tissue, and G2 consisting of 43 dogs with no immunohistochemical evidence of the presence of the parasite in the kidneys. The prevalence of renal disease in the population studied was 100% in G1 and 56.1% in G2. All dogs from G1 and 53.6% of the dogs from G2 had urine protein/creatinine ratio (U/PC) > 0.5, demonstrating a positive correlation between the occurrence of severe proteinuria and the presence of *Leishmania* sp. in renal tissue ($p < 0.001$). All dogs from G1 and 88.4% of the dogs from G2 had glomerular lesions, and the presence of the parasite in the kidney was correlated with a higher prevalence and intensity of the lesions ($p < 0.001$). Immunostaining for CD3+ T cells were observed in 100% of the dogs from G1 and in 97.7% of G2. There was a correlation between the presence of amastigotes in renal tissue and the intensity of the inflammatory infiltrate ($p < 0.0005$). Immunostaining for CD79+ B cells were observed in all dogs from G1 and in 55.8% of the dogs from G2 ($p < 0.0001$). Dogs with parasites in the renal tissue presented a greater intensity of B cells infiltrate ($p < 0.0001$). The presence of *Leishmania* sp, CD3+ T cells and CD79+ B cells in the kidney of dogs naturally affected by visceral leishmaniasis confirmed the participation of the parasite, cellular immunity and humoral immunity in the pathogenesis of renal injury.

Keywords: immunohistochemistry, *Leishmania infantum chagasi*, kidney

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral, zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, pode acometer diversas espécies animais. No entanto, o cão apresenta singular importância epidemiológica, por se tratar do principal reservatório da doença no ambiente doméstico.

Em animais que desenvolvem sinais clínicos é comum a ocorrência de lesões renais. Mais ainda, o desenvolvimento de doença renal crônica em cães infectados está associado a elevadas taxas de mortalidade. O estudo mais aprofundado do comprometimento renal na leishmaniose visceral canina torna-se relevante devido a similaridade entre as lesões que ocorrem no cão e no homem. Deste modo, os cães servem como modelo experimental para o estudo dos mecanismos patogênicos envolvidos na nefropatia associada ao calazar humano.

Ainda existem dúvidas com relação à etiopatogenia das lesões renais na leishmaniose visceral. Apesar de muitos autores indicarem a deposição de imunocomplexos como o principal mecanismo de desenvolvimento das lesões, há indícios de que a fisiopatogenia do dano renal possa ser mais complexa, com possível ativação de mecanismos imunes no parênquima, bem com a participação direta do protozoário na lesão.

Com o objetivo de verificar se a presença de *Leishmania* sp. nos rins apresenta correlação com a ocorrência e intensidade das lesões renais, o presente estudo avaliou as alterações histopatológicas e a imunomarcagem de linfócitos T e B no tecido renal com e sem parasitas, em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A leishmaniose visceral é uma doença de grande impacto em saúde pública, uma vez que, ocorre de forma endêmica em 70 países do mundo, sendo que 90% dos casos notificados ocorrem na Índia, Sudão, Bangladesh e Brasil. A enfermidade apresenta-se em expansão e estima-se uma incidência de 500 mil casos por ano (WHO, 2012). Esta afecção é causada por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Na América Latina a enfermidade, causada pela *Leishmania infantum chagasi*, é conhecida como leishmaniose visceral americana ou calazar neotropical (GENARO, 1993; MAURÍCIO et al., 2000; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012).

A transmissão da doença se dá durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* ou *Lutzomyia cruzi* em um hospedeiro suscetível. Apesar de haver descrição de outras espécies infectadas pelo protozoário, tais como felinos, equinos, bovinos e roedores, os cães ainda representam o principal reservatório da doença (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012; MULLER et al., 2009; LOBSIGER et al., 2010, VIDES et al., 2011). Por esta razão, e pela semelhança das alterações clínicas entre cães e seres humanos, esta é a espécie mais estudada servindo, inclusive, como modelo experimental para o homem.

Durante o repasto sanguíneo formas promastigotas do parasito são inoculadas na epiderme do hospedeiro. Elas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário e, no interior dos macrófagos, perdem o flagelo dando origem as formas amastigotas. As sucessivas divisões binárias do parasito promovem a lise dos macrófagos, com posterior disseminação linfática e hematogênica de leishmanias para vários órgãos (NOLI, 1999; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012).

A capacidade do hospedeiro em controlar a infecção está associada com o tipo de resposta imune. Esta, por sua vez, é dependente de fatores, tais como o mecanismo de apresentação do antígeno, a dose infectante, a via de inoculação e o padrão genético do hospedeiro (FERRER, 2002; CIARAMELLA; CORONA, 2003;

BARBIÉRI, 2006; KRAMER et al., 2006). Os macrófagos, as células dendríticas e as células de Langerhans infectadas por parasitos atuam como apresentadoras de antígenos aos linfócitos T auxiliares CD4+. Os macrófagos realizam a fagocitose e secretam citocinas (IL-1, IL6 e IL-12 e fator de necrose tumoral) que favorecem a atividade das células fagocitárias e dos linfócitos citotóxicos (ROITT et al., 1993; ENGWERDA et al., 2004; BARBIÉRI, 2006). Em resposta aos antígenos protéicos dos parasitos, o linfócito T auxiliar CD4+ produz interleucinas que permitem sua diferenciação em células efetoras Ta1 ou Ta2 (FEITOSA et al., 2000; MACHADO et al., 2007).

As células efetoras Ta1, ativadas pela secreção de interleucina 12 (IL-12), produzem citocinas pró-inflamatórias tais como o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina 2 (IL-2) e o interferon gama (IFN- γ), que aumentam a eficiência das células fagocíticas e de linfócitos citotóxicos. O IFN- γ , por sua vez, induz a formação de superóxido e óxido nítrico pelos macrófagos, o que favorece o controle da infecção e a eliminação do parasito (PINELLI et al., 1994; FERRER, 2002; BARBIÉRI, 2006; MACHADO et al., 2007).

As células efetoras Ta2 produzem interleucinas tais como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que levam à proliferação de linfócitos B e produção de imunoglobulinas. A resposta humoral está associada a formação de imunocomplexos que, quando circulantes, são passíveis de ocasionar danos em diversos órgãos. A partir dessas observações, considera-se que a progressão da doença está relacionada com a resposta imune do tipo Ta2 e seu controle está correlacionado com a resposta Ta1 (CIARAMELLA; CORONA, 2003; BARBIÉRI, 2006).

A leishmaniose visceral canina é uma doença de evolução crônica e progressiva. A ausência de sinais patognomônicos durante o curso da infecção dificulta o estabelecimento dos principais sinais clínicos relacionados com a enfermidade. No entanto, estudos conduzidos em áreas endêmicas demonstram que uma linfadenopatia periférica, perda progressiva de peso, hipertermia, hepatoesplenomegalia, lesões oftálmicas, dermatológicas, onicogrifose e problemas renais são as alterações mais comumente observadas nos animais que desenvolvem sinais clínicos da doença (GENARO, 1993; FERRER, 1999; NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012). Dependendo

dos sistemas acometidos, pode-se observar também alterações digestórias, cardiorrespiratórias, locomotoras e neurológicas (BLAVIER et al., 2001; FERRER, 2002; ALVAR et al., 2004; SILVA et al., 2007; MARCONDES, 2009).

O envolvimento renal na leishmaniose visceral é um achado clínico comumente observado nas infecções naturais em seres humanos e em cães (DUARTE et al., 1983; POLI et al., 1991; PRIANTI et al., 2007). Estudos pretéritos demonstraram que a prevalência da doença renal crônica em cães varia de 30% a 54% (COSTA et al., 2003; PLANELLAS et al., 2004; CORTADELLAS et al., 2006; FRANCESHI et al., 2007).

A maior prevalência de doença renal crônica em cães naturalmente acometidos por leishmaniose é descrita por COSTA e colaboradores (2003) ao diagnosticarem a mesma em 6/11 (54%) cães. PLANELLAS e colaboradores (2004), avaliando 116 cães com leishmaniose visceral, obtiveram evidências laboratoriais de doença renal crônica em 30% dos animais. Em uma população de 105 cães, CORTADELLAS e colaboradores (2006) observaram que 52 (49,5%) apresentavam diagnóstico laboratorial de doença renal crônica, e enquanto 17 (32,7%) deles demonstravam somente proteinúria, 35 (67,3%) apresentavam azotemia. FRANCESHI e colaboradores (2007), por sua vez, encontraram uma prevalência de 52,5% em uma população de 40 cães naturalmente infectados.

A doença renal crônica é caracterizada pela perda progressiva dos néfrons com declínio da taxa de filtração glomerular, sendo causa importante de morbidade e mortalidade em cães (LESS, 2004; GRAUER, 2005; SMETS et al., 2010). Mecanismos compensatórios são ativados na tentativa de manter a taxa de filtração glomerular adequada, a despeito da presença de lesões no parênquima renal. A ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona promove mudanças hemodinâmicas nos capilares glomerulares, permitindo que estes aumentem a taxa de filtração individual dos néfrons remanescentes. Este mecanismo baseia-se na ativação da angiotensina 2, que promove vasoconstrição da arteríola renal eferente com consequente aumento da pressão hidrostática intraglomerular, responsável pela manutenção da taxa de filtração glomerular global (HILGERS; MANN, 1996; GUYTON, 2002; POLZIN et al., 2005; MAXIE; PRESCOTT, 2007).

Entretanto, a estimulação crônica deste mecanismo resulta em sobrecarga funcional dos néfrons. A angiotensina e a aldosterona atuam como mediadores pró-inflamatórios, estimulando a proliferação das células glomerulares, com consequente aumento do consumo de oxigênio e liberação de radicais livres, que, por sua vez, promovem a morte celular precoce e a fibrose glomerular. Ainda, a hipertensão glomerular crônica promove lesões nos capilares favorecendo a passagem de proteínas para o ultrafiltrado glomerular (EDDY, 2001; GRAUER, 2005a).

A proteinúria persistente causa lesão glomerular e túbulo-intersticial resultando em perda progressiva dos néfrons. As proteínas plasmáticas que atravessam a parede dos capilares glomerulares podem acumular-se no tufo glomerular e estimular tanto a proliferação das células mesangiais, como o aumento da produção de matriz mesangial (JERUMS et al., 1997; TANG et al., 1999; GRAUER, 2005). Sabe-se que as células epiteliais do túbulo contorcido proximal normalmente reabsorvem a pequena fração protéica presente no ultrafiltrado glomerular por meio de endocitose. As proteínas reabsorvidas acumulam-se nos lisossomos e são degradadas em aminoácidos. O excesso de proteína na luz tubular leva a uma sobrecarga no processamento lisossomal com ruptura de vacúolos repletos de enzimas proteolíticas, o que pode culminar em morte celular (OLBRICHT et al., 1986; GRAUER, 2011).

A quantificação da proteinúria é fundamental, uma vez que permite avaliar a severidade das lesões renais e a progressão da doença. A mensuração da proteína excretada ao longo de 24 horas é o teste padrão ouro para avaliação da proteinúria, no entanto, sua realização torna-se limitada devido à metodologia empregada no procedimento (LESS, 2004; GRAUER, 2005). Na tentativa de facilitar a mensuração da proteína eliminada na urina pode-se utilizar a determinação da relação proteína/creatinina urinária (P/C U). O uso desta relação baseia-se na premissa de que a excreção de creatinina urinária se dá de forma constante ao longo do dia. Portanto, ao relacioná-la com o valor de proteína presente na urina, em uma única amostra, há uma correlação com a quantidade de proteína excretada em um período de vinte e quatro horas. Cabe ressaltar, que as variações no volume e na densidade específica da urina não interferem neste exame (CENTER et al., 1985).

Estudos apontam para a importância da determinação da relação proteína-creatinina urinária na doença renal crônica. JACOBS e colaboradores (2005) observaram uma correlação positiva entre a intensidade da proteinúria e a taxa de mortalidade de cães com doença renal crônica e, ainda, em seu estudo animais com valores de P/C U > 1,0 apresentaram riscos de crises urêmicas, ou de mortalidade, três vezes maior do que cães com valores de P/C U < que 1,0.

SYME & ELLIOTT (2003) observaram que a sobrevivência de gatos com doença renal crônica estava relacionada com a severidade da proteinúria. A elevação da proteinúria associou-se com aumento nas concentrações séricas de creatinina e da pressão arterial sistêmica. Gatos com valores de P/C U > 0,4 apresentaram pior prognóstico, independente de outros fatores agravantes.

Atualmente a Sociedade Internacional de Interesse Renal ("International Renal Interest Society") preconiza a realização do estadiamento da doença renal crônica em cães e gatos, com a finalidade de auxiliar no diagnóstico precoce e propor diretrizes para o monitoramento da doença. A determinação da concentração sérica de creatinina e dos valores de P/C U são os principais critérios para o estadiamento dos animais. No estágio 1 os cães apresentam valores de creatinina dentro dos limites de normalidade, no entanto, apresentam indícios de lesão renal, como por exemplo, proteinúria. No estágio 2 estão inclusos os animais azotêmicos, com valores de creatinina sérica inferiores a 2,0 mg/dl. No estágio 3 os valores de creatinina variam de 2,1 a 5,0 mg/dl e, no estágio 4, esses valores são superiores a 5,0 mg/dl (IRIS, 2011).

A partir do estadiamento inicial, a determinação da intensidade da proteinúria, por meio da relação proteína-creatinina urinária, é recomendada para todos cães, independente do estágio da doença. Valores de P/C U superiores 0,5 são indicativos de proteinúria. A magnitude dos valores de P/C U está relacionada com o tipo de lesão renal e com a evolução da doença. A identificação de valores de P/C U > 2,0 é extremamente sugestiva de lesão glomerular, enquanto nas lesões túbulo-intersticiais são observados valores menos intensos (LESS et al., 2005; GRAUER, 2011; VADEN, 2011).

BOYD e colaboradores (2008), em um estudo retrospectivo, determinaram a sobrevida de 208 gatos de acordo com o estágio da doença renal. Enquanto os

gatos com doença renal crônica no estágio 2 apresentaram uma sobrevida média de 1151 dias, os animais no estágio 4 apresentaram uma sobrevida média de 35 dias, a despeito das medidas terapêuticas empregadas. POLZIN e colaboradores (2010) utilizaram o estadiamento da doença renal crônica inclusive para propor condutas terapêuticas destinadas a cada estágio da doença.

A leishmaniose visceral canina também apresenta um sistema de estadiamento clínico da doença. SOLANO-GALLEGO e colaboradores (2009) propuseram novos critérios em detrimento ao antigo sistema de classificação dos cães em assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos. Isto se deve ao fato de que, ao basear-se exclusivamente na apresentação clínica, o antigo sistema não considerava que disfunções orgânicas graves pudessem ocorrer mesmo na ausência de sinais clínicos. A glomerulonefrite secundária a leishmaniose visceral ilustra esta situação, uma vez que os cães podem apresentar proteinúria discreta à moderada sem quaisquer manifestações clínicas (GRAUER, 2005; LESS e colaboradores, 2005; VADEN, 2011).

No esquema proposto por SOLANO-GALLEGO e colaboradores (2009), além da avaliação física dos animais infectados, os resultados de exames sorológicos e das alterações laboratoriais devem ser avaliadas. Desta forma, observa-se que a presença e a intensidade da doença renal são os principais indicadores de gravidade do quadro clínico. Sendo assim, definem-se quatro estágios da doença:

- 1) Estágio 1: cães apresentam sinais clínicos discretos, como por exemplo linfadenomegalia e dermatite papular. Os valores de creatinina são inferiores a 1,4 mg/dl e o P/C U < 0,5.
- 2) Estágio 2: cães apresentam diversos sinais clínicos, tais como lesões cutâneas alopecicas e descamativas, ulcerações em junções mucocutâneas, onicogribose, perda de peso, hipertermia e epistaxe. As alterações laboratoriais incluem anemia arregenerativa, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia. No sub-estágio A, apresentam valores de P/C U < 0,5 e, no sub-estágio B, apresentam valores de P/C U entre 0,5-1.
- 3) Estágio 3: cães com evidências laboratoriais de doença renal crônica, com valores de P/C U > 1 e/ou valores de creatinina entre 1,4 - 2 mg/dl.

- 4) Estágio 4: cães apresentam evidências laboratoriais de doença renal crônica avançada, com valores de creatinina > 2 mg/dl.

Quando da avaliação histopatológica, estudos demonstram que as alterações sugestivas de doença renal crônica podem estar presentes em 100% dos cães com leishmaniose visceral (COSTA et al., 2003; ZATELLI et al., 2003). No que diz respeito a estas alterações, trabalhos conduzidos na Espanha (NIETO et al., 1992) e na França (BENDERITTER et al., 1998) utilizando 11 e 10 animais, respectivamente, identificaram lesões glomerulares em todos os cães, sendo que a glomerulonefrite membranoproliferativa foi o único padrão histopatológico descrito.

POLI e colaboradores (1991), ao avaliarem as alterações histopatológicas nos rins de 34 cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* verificaram lesões glomerulares em todos os animais e alterações tubulares em 31 (91,2%) deles. As alterações glomerulares foram classificadas como glomerulonefrite mesângio-proliferativa (21/34 cães) e glomerulonefrite membranoproliferativa (12/34 cães).

ZATELLI e colaboradores (2003) avaliaram a presença de alterações histopatológicas nos rins de 41 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. Lesões glomerulares estavam presentes em todos os animais e foram histologicamente classificadas em glomerulonefrite membranoproliferativa (29,3%), glomerulonefrite membranosa (26,8%), glomerulonefrite proliferativa mesangial (21,9%) e glomeruloesclerose segmentar focal (19,5%). Lesões túbulo-intersticiais, evidenciadas em 23/41 (56%) animais, não foram consideradas lesões primárias, pois em todos os casos estavam associadas à presença de lesões glomerulares.

COSTA e colaboradores (2003) descreveram as alterações renais em um grupo de 55 cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. Lesões glomerulares foram observadas em todos os animais e classificadas segundo o critério da Organização Mundial da Saúde para as glomerulonefrites (CHURG et al., 1985). Assim, seis padrões distintos foram descritos; glomerulonefrite membranoproliferativa (32,7%), glomerulonefrite mesângio-proliferativa (30,9%), glomeruloesclerose segmentar focal (18,2%), glomerulopatia com alterações mínimas (14,5%), glomerulonefrite em crescente (1,8%) e glomerulonefrite crônica (1,8%). Nefrite intersticial foi observada em 53 (96,3%) cães e caracterizou-se pela presença de um infiltrado inflamatório linfoplasmocitário mais proeminente no córtex

renal. Alterações tubulares foram descritas em 43 (78,2%) animais, sendo a degeneração e a necrose tubulares as lesões mais observadas.

FERRARI e colaboradores (2010), ao pesquisarem antígenos de *Leishmania sp.* no tecido renal de 20 cães naturalmente infectados, identificaram o parasita no infiltrado inflamatório intersticial e na região mesangial de três deles (15%), os quais possuíam como padrão de lesão glomerular uma glomerulonefrite membranoproliferativa. Em virtude da baixa prevalência de imunomarcações, não foi possível estabelecer uma correlação com o tipo e intensidade das alterações renais.

Se, atualmente, as lesões renais que acompanham a leishmaniose visceral canina estão bem caracterizadas, a carência de informações quanto às correlações entre alterações histopatológicas e alterações laboratoriais indicativas de doença renal limita a compreensão dos mecanismos patogênicos envolvidos na lesão (COSTA et al., 2003; CORTADELLAS et al., 2008).

O primeiro estudo correlacionando os valores séricos de creatinina e uréia com as alterações histopatológicas foi realizado por NIETO e colaboradores (1992), os quais utilizaram dez cães naturalmente infectados. Os autores observaram elevações nas concentrações séricas de creatinina e de uréia em 30% e 70% dos animais respectivamente, sendo que o aumento desta última enzima correlacionou-se com a intensidade da proliferação das células glomerulares.

COSTA e colaboradores (2003) determinaram os valores de P/C U e creatinina sérica de 11 cães com leishmaniose visceral e identificaram P/C U > 1,0 em seis deles (54,5%) e creatinina sérica > 1,0 mg/dl em três (27,3%). Valores de P/C U > 1,0 foram observados em cães com glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite crônica, glomeruloesclerose segmentar focal e glomerulonefrite mesângio-proliferativa. Por outro lado, a azotemia foi observada na glomerulonefrite segmentar focal, glomerulonefrite membranoproliferativa e na glomerulonefrite crônica.

Um importante estudo foi realizado por CORTADELLAS e colaboradores (2006), que avaliaram laboratorialmente a ocorrência de doença renal por meio das determinações da concentração sérica de creatinina e da intensidade da proteinúria em 105 cães com leishmaniose visceral. Dos animais avaliados, 52 apresentavam algum grau de doença renal. Proteinúria e azotemia foram observados em 34

(65,3%) e 35 (67,3%) cães, respectivamente. No entanto, por se tratarem de pacientes encaminhados a clínicas e hospitais veterinários, não foi realizada a avaliação histopatológica dos rins destes animais.

Apesar de existirem diversas pesquisas sobre as alterações histopatológicas dos rins de cães com leishmaniose visceral, a literatura ainda é escassa no que diz respeito à etiopatogenia da lesão. Até a década de 90, a grande maioria dos autores considerava que a patogênese da lesão renal, tanto na leishmaniose visceral canina quanto na humana, fosse decorrente da deposição de imunocomplexos, acarretando uma injúria glomerular (TAFURI et al., 1989; COSTA et al., 2000). Entretanto, o infiltrado celular observado nos rins desses pacientes não era compatível com esta hipótese. Além disso, existem evidências cada vez maiores da participação de imunidade celular em alguns tipos de glomerulonefrite imunomediada (VAN ALDERWEGEN et al., 1997; COSTA et al., 2000).

A pesquisa de antígenos de *Leishmania sp.* por meio da técnica de imuno-histoquímica em amostras de tecido renal tem sido realizada na tentativa de elucidar se ocorre uma participação direta do parasita na etiopatogenia das lesões. Enquanto alguns estudos encontraram imunomarcacão variando entre 90 e 98% dos cães infectados (COSTA et al., 2003; COSTA et al., 2010), outros referem-se a taxas da ordem de 15% (FERRARI et al., 2010).

O padrão de resposta imunológica do tecido renal tem sido pesquisado por meio da reação de imuno-histoquímica com o intuito de compreender a etiopatogenia das lesões (COSTA et al., 2000; LIM et al., 2001; IKEZUMI et al., 2004; TIPPING; TIMOSHANKO, 2005). Os linfócitos expressam um grande número de imunomarcadores em suas membranas, que podem ser utilizados para distinguir várias subpopulações celulares. O sistema CD (*cluster of differentiation*) refere-se a grupos de anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a um determinado marcador celular. O CD3+ é uma importante molécula do complexo receptor antigênico (TCR) presente na membrana de linfócitos T, responsável pela transmissão dos sinais à célula quando o receptor TCR se conjuga com o antígeno (ROITT et al., 1993).

Enquanto as moléculas CD3+ encontram-se presentes em todas as subespécies de linfócitos T, o CD4+ pode ser observado em receptores de células T

auxiliares, neutrófilos e macrófagos, e o CD8+ em receptores de linfócitos T citotóxicos (ROITT et al., 1993). O receptor de linfócitos B consiste de imunoglobulinas de superfície ligadas a moléculas, como o CD79+. No entanto, a expressão de superfície para receptores de IgG ou do complemento também podem auxiliar na identificação destas células (ROITT; DELVES, 2004). Desta forma, a detecção de algumas moléculas em tecidos de animais infectados permite determinar se a resposta imunológica desenvolvida pelo cão é do tipo celular ou humoral (TORRES-NETO et al., 2008).

Por meio da reação de imuno-histoquímica, COSTA e colaboradores (2000), avaliando rins de seis cães com leishmaniose visceral, verificaram a presença de linfócitos T CD4+ em 4/6 (66,6%), T CD8+ em 1/6 (16,6%) e IgG em 4/6 (66,6%). As imunomarcações para linfócitos T foram observadas em áreas com infiltrado inflamatório, na região glomerular e intersticial e, as de IgG encontravam-se ao redor de capilares. Três (50%) dos seis animais apresentavam marcação antigênica apenas para CD4+ e em um deles também foi observada imunomarcação para CD8+. Sendo assim, a participação de CD8+ na patogênese da glomerulonefrite por leishmaniose visceral canina ainda é incerta.

COSTA e colaboradores (2010) estabeleceram uma correlação positiva entre a presença de antígenos do parasito e a presença do infiltrado de células T do tipo CD4+ no tecido renal. Os autores sugeriram que os parasitos podem atuar de forma direta nas lesões glomerulares e, que a presença do protozoário nos rins pode favorecer a migração das células inflamatórias. Em vista dos resultados conflitantes, o papel das leishmanias no desenvolvimento das lesões renais continua incerto.

SOLANO-GALLEGO e colaboradores (2003) descreveram pela primeira vez a presença de imunoglobulina G na urina de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. Com o objetivo de investigar a origem desta imunoglobulina, os autores correlacionaram sua presença com as concentrações séricas de IgG e com a intensidade das lesões renais. Apesar da origem da imunoglobulina ter sido principalmente sistêmica em decorrência das lesões renais, os autores sugeriram que, ainda que em menor extensão, possa ocorrer produção local de imunoglobulinas. Em estudo semelhante envolvendo a detecção de imunoglobulina A na urina de cães com leishmaniose, TODOLÍ e colaboradores (2009) sugeriram

que a produção local de imunoglobulina possa refletir a ocorrência de uma resposta imunológica *in situ* devido a presença do parasita no tecido renal.

COSTA e colaboradores (2010) pesquisaram a ocorrência de depósitos de IgG, IgM e IgA, no tecido renal de 26 cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* e em cinco cães não infectados. Os autores verificaram imunomarcação das três imunoglobulinas em 21 animais infectados e em todos os cães do grupo controle, sem diferença significativa entre os grupos.

3. OBJETIVOS

Diante do que foi exposto, o presente estudo teve por objetivos correlacionar as alterações histopatológicas, o estadiamento clínico e a presença de linfócitos T e B, com a presença de *Leishmania* sp no tecido renal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais utilizados:

Para a realização do presente estudo foram utilizados dois grupos de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, encaminhados ao Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Câmpus de Araçatuba, durante o período compreendido entre janeiro e dezembro de 2010. O diagnóstico da doença foi confirmado por meio de exame parasitológico direto, pela punção biópsia aspirativa de linfonodo e/ou medula óssea. O critério para a divisão dos grupos foi a detecção do parasito no tecido renal, por meio da reação de imuno-histoquímica. Sendo assim, o primeiro grupo foi constituído por 24 cães que apresentavam formas amastigotas de *Leishmania* sp. nos rins e, o segundo, composto por 43 cães sem evidências do parasito no tecido renal.

Com o objetivo de melhor avaliar os resultados obtidos, os animais foram classificados em três estágios de doença renal, de acordo com o protocolo proposto pelo “International Renal Interest Society” (IRIS), modificado por Cortadellas e colaboradores (2008). Esta classificação baseia-se nos valores séricos de creatinina e na relação de proteína-creatinina urinária, de modo que no estágio 1 encontram-se os cães com valores de creatinina $< 1,4$ mg/dl e P/C U $> 0,5$; no estágio 2 os cães que possuam valores séricos de creatinina de 1,4 a 2,0 mg/dl e, no estágio 3 aqueles com valores de creatinina $> 2,1$ mg/dl (quadro 1).

Cães com anormalidades ao exame físico específico do sistema cardiovascular ou portadores de doenças que pudessem levar a um comprometimento da função renal, tais como erliquiose, dirofilariose, diabetes melito e hiperadrenocorticism, foram excluídos do presente estudo.

Quadro 1 – Estadiamento da doença renal crônica de acordo com o protocolo proposto pelo “International Renal Interest Society” (IRIS), modificado por Cortadellas (2008).

Estadiamento	Variáveis	
	Creatinina sérica (mg/dl)	P/C U
Estágio 1	<1,4	>0,5
Estágio 2	1,4 a 2,0	>0,5
Estágio 3	>2,1	>0,5

4.2 Delineamento experimental:

Após a confirmação do diagnóstico de leishmaniose visceral foram colhidas amostras de sangue e de urina de todos os cães. As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia jugular, e mantidas à temperatura ambiente até a retração visível do coágulo. Em seguida, foram centrifugadas a 1720 x g, durante 10 minutos, para obtenção do soro. Este, por sua vez, foi transferido em alíquotas de 1,5mL para microtubos e armazenado a -20°C até o momento de seu processamento, para determinação dos níveis de creatinina sérica e pesquisa de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* e antígenos para *Dirofilaria immitis*. A urina foi obtida por cistocentese e avaliada imediatamente após a colheita por exame de urina tipo I e para a determinação da relação proteína-creatinina urinária.

Após a colheita das amostras os animais foram submetidos à eutanásia, em cumprimento ao Decreto nº 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963. Inicialmente foi administrada acepromazina¹ na dose de 0,05 mg/kg, por via intravenosa, como medicação pré-anestésica e, após 15 minutos, os animais foram anestesiados com tiopental sódico² na dose de 12,5 mg/kg por via intravenosa. Com os cães em plano anestésico foi aplicada uma ampola de cloreto de potássio a 19,1%³ por via intravenosa. O método de eutanásia empregado seguiu as recomendações da Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

¹ Acepran 0,2%®, Univet

² Thiopentax 1g®, Cristália

³ Cloreto de potássio 19,1%®, Isofarma

Os cães foram, então, submetidos à necropsia e colheram-se amostras de tecido renal para posterior realização do exame histopatológico e da reação de imuno-histoquímica. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - protocolo 002856-2011, FCAV-UNESP).

4.3 Pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em linfonodo e/ou medula óssea

Os exames citológicos de linfonodo e de medula óssea foram realizados por meio de punção aspirativa com agulha fina. Para a colheita de amostras de linfonodos foram utilizadas agulhas hipodérmicas 25x7, acopladas em seringas de 10 mL. Na colheita das amostras de medula óssea, mediante punção na crista ilíaca, foram utilizadas agulhas hipodérmicas 40x12, acopladas a seringas de 20 mL. Imediatamente após as colheitas foram confeccionados esfregaços, corados com corante hematológico⁴. A pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp. foi realizada por meio da observação em microscopia de luz, com objetiva de 100x. Os animais negativos na pesquisa do parasito em órgãos linfóides foram excluídos do presente estudo.

4.4 Pesquisa de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* e anti-*Dirofilaria immitis*

A pesquisa de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* e antígenos para *Dirofilaria immitis* e foi realizada por meio do kit comercial SNAP 4DX[®]test⁵, segundo as recomendações do fabricante.

4.5 Exame de urina tipo I

O exame físico da urina foi realizado por meio da observação macroscópica, estabelecendo-se resultados para aspecto e cor. A densidade urinária foi mensurada por refratômetro de ABBE⁶. A análise química de urina foi realizada por meio de fita reagente comercial⁷, de acordo com as recomendações do fabricante. Para a sedimentoscopia, as amostras foram centrifugadas a 500 x g, durante cinco minutos, desprezando-se o sobrenadante com posterior análise do sedimento em microscopia óptica. O exame de urina tipo I foi utilizado para selecionar os animais com

⁴ Corante Panótico Rápido[®], Laborclin, Pinhais, Brasil

⁵ IDEXX[®] Laboratories, Maine, EUA

⁶ ATAGO[®] Co. LTDA, Tokyo, Japão

⁷ Combur 10 Test[®], UX, Roche, São Paulo, Brasil

evidências laboratoriais de infecção do trato urinário a fim de excluí-los do estudo, devido a sua interferência com os valores de P/C U.

4.6 Determinação das concentrações séricas de creatinina

A concentração sérica de creatinina foi determinada pelo método cinético - Picrato em meio alcalino⁸, utilizando-se um analisador bioquímico automatizado⁹. Os valores de referência foram considerados segundo KANEKO e colaboradores (2008).

4.7 Relação proteína/creatinina urinária (P/C U)

Para a obtenção da relação proteína/creatinina urinária (P/C U) foram determinadas as concentrações de proteína urinária pelo método colorimétrico de vermelho de pirogalol¹⁰ e de creatinina pelo método cinético de picrato em meio alcalino¹¹. A análise das amostras foi realizada por meio de um analisador bioquímico automatizado⁹, previamente calibrado com calibrador comercial¹² e controles níveis I¹³ e II¹⁴.

4.8 Exame histopatológico

Os cães foram necropsiados pela técnica empregada rotineiramente no Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Câmpus de Araçatuba. Para o presente estudo foram colhidos dois fragmentos de cada rim, abrangendo a região cortical e a medular, segundo VALENTINE; MCGAVIN (2007). Logo após a colheita os fragmentos foram fixados em formol tamponado com fosfatos a 10% por 24 horas, transferidos para álcool 70% e processados pelas técnicas habituais para inclusão do tecido em parafina e posterior obtenção de cortes histológicos.

Os cortes histológicos foram corados por hematoxilina e eosina (HE) para avaliação dos aspectos morfológicos do tecido renal. As alterações observadas no exame histopatológico foram classificadas, de acordo com sua intensidade, em discreta (+), moderada (++) e acentuada (+++), atribuindo-se escores variando de

⁸ kit Creatinina® Biosystems, Barcelona, Espanha

⁹ Analisador automático BTS, mod. 370 plus, BioSystems, Barcelona, Spain

¹⁰ kit Microprote Pirogalol 50® Doles, Goiânia, Brasil

¹¹ kit Creatinina® Biosystem, Barcelona, Espanha

¹² Calibrator serum, Cód.18011, BioSystems, Barcelona, Spain.

¹³ Assayed control serum level I, Cód. 18005, BioSystems, Barcelona, Spain.

¹⁴ Assayed control serum level II, Cód. 18007, BioSystems, Barcelona, Spain.

uma a três cruzeiras, que foram substituídas por números de 1 a 3 para a realização da análise estatística. As lesões foram classificadas segundo a padronização estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para doenças glomerulares (CHURG e colaboradores, 1985).

4.9 Reação de imuno-histoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos T e B.

A reação de imuno-histoquímica para detecção de formas amastigotas de *Leishmania* sp. e de linfócitos T CD3+ e B CD79+ foi realizada em cortes incluídos em parafinas que foram desparafinizados e hidratados em banhos de xilol e de álcool em concentrações decrescentes (100°, 95°, 70° e 50°), com posterior imersão em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio (30 volumes) a 3% diluída em metanol¹⁵ por 45 minutos, seguido de lavagem em solução tampão fosfato (PBS) em pH 7,2 a 7,4, por três vezes de cinco minutos cada. A recuperação antigênica foi feita com tratamento dos cortes em solução tampão de citrato de sódio (pH 6,0), aquecido em banho-maria entre 95° a 99°C, durante 30 minutos. Após o resfriamento, determinado por um período de 20 minutos, foi realizada uma lavagem com PBS. Posteriormente, realizou-se o bloqueio de ligações inespecíficas utilizando-se leite em pó desnatado 3%¹⁶, durante 30 minutos, em temperatura ambiente.

Em seguida, foi realizada a incubação por 12 a 15 horas em temperatura de 4°C, em câmara úmida, com anticorpo primário diluído em PBS. Para pesquisa de formas amastigotas utilizou-se soro hiperimune de cão acometido por *Leishmania chagasi*, na diluição de 1:100 (TAFURI et al., 2004). Para a detecção de linfócitos T CD3+ utilizou-se um anticorpo policlonal anti-CD3+ humano produzido em coelho¹⁷, na concentração de 1:150 e, para B CD79+ um anticorpo monoclonal anti-CD79 α cy humano produzido em camundongo¹⁸, na diluição de 1:100.

Após incubação com o anticorpo primário os cortes foram lavados com solução tampão PBS, três vezes de cinco minutos cada, e submetidos à nova incubação com anticorpo secundário biotilado¹⁹, em temperatura ambiente, por 45 minutos. Foram então submetidos à lavagem com tampão PBS por três vezes e

~~incubados com o complexo streptavidina-peroxidase¹⁹ em temperatura ambiente~~

¹⁵ Vetec Química Fina – cod 102

¹⁶ Molico – Nestlé Brasil

¹⁷ A0452 - Dako North America, Inc. – Via Real, CA

¹⁸ M7051 - Dako North America, Inc. – Via Real, CA

¹⁹ Kit LSAB - Dako North America, Inc – ref K0690

por mais 45 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS por três vezes e a reação final foi revelada com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença de 3,3'-diaminobenzidina (DAB)²⁰. O tecido foi contra-corado com hematoxilina de Harris durante 30 segundos. Após a desidratação dos cortes, as lâminas foram montadas com lamínulas, utilizando-se bálsamo do Canadá²¹, e observadas em microscopia de luz para avaliação da presença e localização dos parasitos e das células marcadas. Para confirmar a ausência de reação inespecífica, para cada anticorpo foram utilizados controles negativos, onde foi omitida a utilização do anticorpo primário.

Os resultados da marcação da reação de imuno-histoquímica foram avaliados com auxílio de um sistema de análise de imagem computadorizada utilizando-se o *software* de análise de imagens Image-Pro Plus 6.1²². Uma vez calibrado o sistema, realizou-se a captura de imagens, em objetiva de 40x, com microscópio óptico²³. Foram avaliadas seis áreas distintas, totalizando 407.277,15 μm^2 . Para avaliar a percentagem total das áreas imunomarcadas atribuiu-se a coloração vermelha para as áreas coradas em marrom e a coloração amarela para as demais áreas contra-coradas com hematoxilina (figura 1).

¹⁹ Kit LSAB - Dako North America, Inc – ref K0690

²⁰ DAB – Biosystem ref. K047B

²¹ Vetec Química Fina – cód 498

²² Media Cybernetics, Maryland, EUA

²³ OLYMPUS BX50

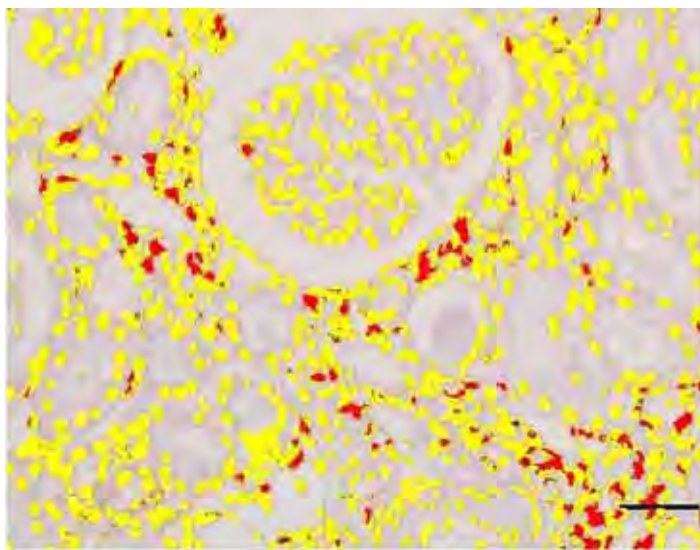


Figura 1 – Fotomicrografia de rim de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral, evidenciando a imagem por análise de captura, onde a coloração vermelha indica as áreas coradas em marrom e a coloração amarela indica as demais áreas contra-coradas, em objetiva de 40x (Barra = 50 μ m).

4.10 Análise Estatística

As comparações entre os grupos foram efetuadas por meio do teste não paramétrico de Mann Whitney, usado para variáveis numéricas cuja tendência central foi mais adequadamente representada pela mediana. O teste exato de Fisher foi utilizado para analisar as variáveis categóricas nominais (dicotômicas 0-1), e as variáveis categóricas ordinais (escore) foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. A associação entre as variáveis foi avaliada por meio do teste exato de Fisher. As estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System).

5. RESULTADOS

5.1 Animais

Foram incluídos no presente estudo um total de 67 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com diagnóstico confirmado por meio de exame parasitológico direto de linfonodo e/ou medula óssea. O primeiro grupo foi constituído por 24 cães com formas amastigotas de *Leishmania* sp nos rins e o grupo 2 foi composto por 43 cães com ausência de imunomarcagem renal para o parasito. Os cães do presente estudo possuíam idade variando entre seis meses e nove anos, com média de três anos, e peso entre três e 30 quilos. As principais características da população avaliada, subdividida de acordo com os grupos estudados, encontram-se apresentadas na Tabela 1.

Todos os animais apresentavam sinais clínicos da doença. Os achados de exame físico mais frequentemente observados foram a presença de linfadenopatia em 50/67 (74,6%) cães, lesões dermatológicas em 49/67 (73,1%), perda de peso em 48/67 (71,7%), lesões oftálmicas em 44/67 (65,7%), esplenomegalia em 13/67 (19,4%) e desidratação em 10/67 (14,9%) (figura 2). As lesões dermatológicas mais visualizadas foram uma descamação generalizada; áreas de ulceração localizadas nas superfícies das extremidades de pavilhão auricular, nas junções mucocutâneas e sobre protuberâncias ósseas (figura 3), alopecia e hiperpigmentação. Em relação às alterações oftálmicas verificou-se ceratoconjuntivite seca, ceratite, conjuntivite, ceratite ulcerativa e uveíte.

Tabela 1 - Distribuição quanto ao sexo, raça e faixa etária de 67 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, subdivididos em dois grupos de acordo com a presença (Grupo 1) e ausência (Grupo 2) de formas amastigotas de *Leishmania* sp. no tecido renal. Número absoluto e percentagem.

Variável	Grupo	Categoria	Número	Percentagem
SEXO	G1	Fêmea	14	58,3%
		Macho	10	41,7%
	G2	Fêmea	26	60,5%
		Macho	17	39,5%
FAIXA ETÁRIA	G1	6 meses – 1 ano	4	16,6%
		1 ano – 4 anos	13	54,2%
		4 anos – 9 anos	7	29,2%
	G2	6 meses – 1 ano	7	16,3%
		1 ano – 4 anos	23	53,5%
		4 anos – 9 anos	13	30,2%
RAÇA	G1	Sem raça definida	20	83,3%
		Poodle	3	12,5%
		Pit Bull	1	4,2%
	G2	Sem raça definida	35	81,4%
		Poodle	4	9,4%
		Cocker	1	2,3%
		Dálmata	1	2,3%
		Pinscher	1	2,3%
		Teckel	1	2,3%

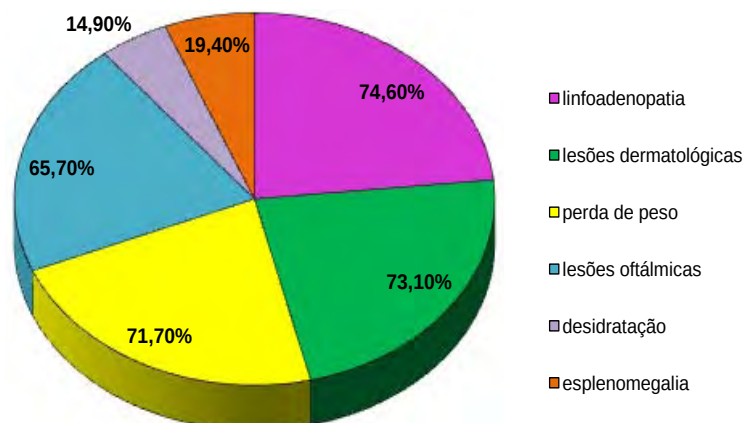


Figura 2 - Distribuição, em percentagem, segundo as alterações de exame físico, de 67 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

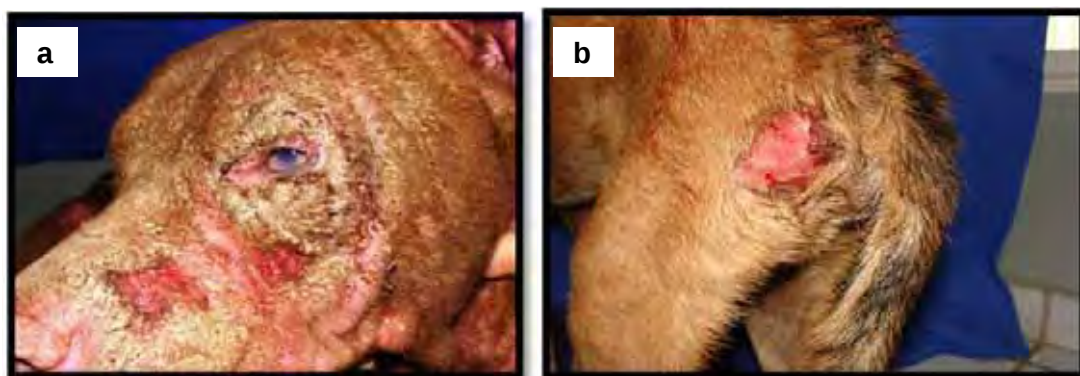


Figura 3 – Lesões dermatológicas observadas em cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral. Notar a presença de ulceração e deposição de crostas hemorrágicas na face (a) e no membro pélvico (b).

A prevalência de doença renal, determinada por meio de análise dos valores séricos de creatinina e dos valores de P/C U, foi de 46/64 (71,9%). De acordo com o sistema de classificação da doença renal crônica proposto pela “International renal interest society”, modificado por Cortadellas e colaboradores (2008), observou-se que o estágio 1 foi o mais representativo, com 34/46 (73,9%) dos animais. No

estágio 2 e no estágio 3 foram inclusos 4/46 (8,7%) e 8/46 (17,4%) animais, respectivamente (figura 4).

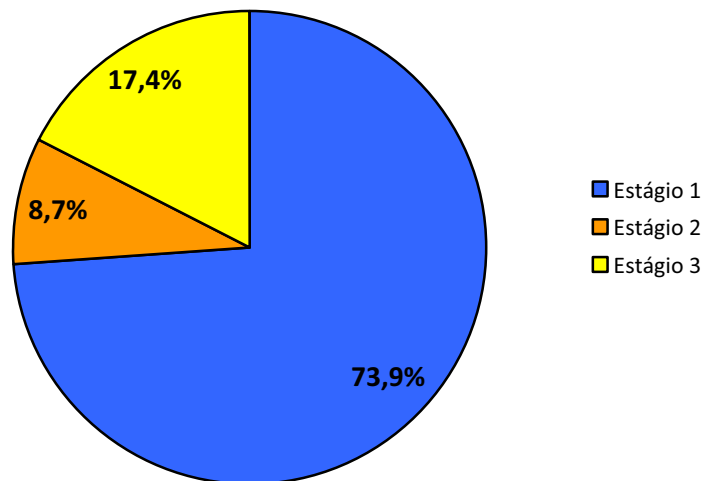


Figura 4 - Distribuição, em percentagem, segundo o estadiamento de doença renal crônica proposto pela International renal interest society (IRIS), modificado por Cortadellas e colaboradores (2008), de 45 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

Com relação a doença renal crônica, observou-se que a mesma foi mais prevalente nos animais com imunomarcacão para o parasito no tecido renal ($p < 0,0001$). Enquanto no G1 100% (23/23) dos animais apresentavam diferentes graus de doença renal crônica, no G2 verificou-se uma prevalência de doença renal da ordem de 56,09% (23/41). O número e a percentagem de animais de acordo com o estadiamento de doença renal crônica nos dois grupos avaliados encontram-se apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Número absoluto e percentagem de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, subdivididos em dois grupos, de acordo com a presença (Grupo 1) e ausência (Grupo 2) de formas amastigotas de *Leishmania* sp no tecido renal, baseado no estadiamento de doença renal crônica (DRC) proposto pela International renal interest society (IRIS), modificado por Cortadellas (2008).

Variável	Escore	Grupo 1		Grupo 2	
		N	%	N	%
	Ausente	-	-	18	43,9
Estágio	1	14	60,9	20	48,8
DRC	2	3	13,0	1	2,4
	3	6	26,1	2	4,9

Teste Mann-Whitney (P<0,0001)

5.2 Determinação das concentrações séricas de creatinina

No grupo 1 os valores de creatinina sérica variaram de 0,38 a 4,31 mg/dl e a azotemia foi observada em 9/24 (37,5%) animais. No grupo 2, as concentrações séricas de creatinina variaram de 0,19 a 4,73 mg/dl e 3/43 (7%) estavam azotêmicos. Observou-se diferença significativa entre os grupos, sendo que animais com evidências do parasita nos rins apresentaram concentrações séricas de creatinina mais elevadas ($p=0,0189$). Os valores médios, as medianas e os desvios-padrões da concentração sérica de creatinina nos cães dos grupos 1 e 2 estão dispostos na tabela 3. Os valores individuais das concentrações séricas de creatinina dos cães dos dois grupos encontram-se apresentados nos anexos A e B

5.3 Relação proteína/creatinina urinária (P/C U)

A determinação da relação proteína-creatinina urinária foi realizada em 63 animais. Os outros quatro cães do estudo apresentavam sinais clínicos e

laboratoriais de infecção do trato urinário e, portanto, a determinação de P/C U nestes cães não seria fidedigna para a avaliação da proteinúria. Sendo assim, para a determinação desta variável, o grupo 1 foi constituído por 22 cães e o grupo 2 por 41.

Todos os animais do grupo 1 apresentaram valores de P/C U > 0,5, com índices que variaram de 0,76 a 5,6. Além disso, 17/22 (77,2%) cães possuíam P/C U > 2. Por outro lado, no grupo 2, 22/41 (53,6%) cães tinham P/C U > 0,5, com índices que variaram de 0,16 a 2,79. Entretanto, apenas 1/41 (2,4%) animal apresentou valor superior a 2. A presença de formas amastigotas nos rins apresentou uma associação positiva com a ocorrência de proteinúria intensa, detectada pela mensuração da P/C U ($p < 0,001$). Os valores médios, as medianas e os desvios-padrões da relação proteína/ creatinina urinária nos cães dos grupos 1 e 2 encontram-se dispostos na tabela 3. Os valores individuais da P/C U dos cães dos dois grupos encontram-se apresentados nos anexos A e B.

Tabela 3 – Valores da média ($\bar{x}$), desvio-padrão (S) e mediana (Md) da concentração sérica de creatinina (mg/dl) e da relação proteína/creatinina urinária (PC/U), de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) a presença de formas amastigotas do parasito no tecido renal.

Variável	G 1		G 2		P ⁽¹⁾
	$\bar{x} \pm S$	Md	$\bar{x} \pm S$	Md	
Creatinina	1,56 $\pm$ 1,21	1,03	0,84 $\pm$ 0,73	0,73	0,0189
P/C U	3,11 $\pm$ 1,31	3,18	0,80 $\pm$ 0,63	0,55	< 0,0001

⁽¹⁾ Teste Mann-Whitney

5.4 Exame histopatológico de tecidos renais

Por meio da avaliação histopatológica do tecido renal, foi possível identificar alterações glomerulares em 92,5% (62/67) dos cães, sendo 100% (24/24) dos animais do grupo 1 e 88,4% (38/43) dos cães do grupo 2. Segundo os critérios de classificação das lesões glomerulares da Organização Mundial da Saúde, foram

identificados padrões histopatológicos de glomerulonefrite membranoproliferativa em 30/67 (44,8%) cães, glomerulonefrite membranosa em 19/67 (28,4%), glomerulonefrite proliferativa em 11/67 (16,4%) e glomeruloesclerose segmentar focal em 2/67 (3%) (figura 5). O número absoluto e a percentagem de animais de acordo com o tipo e a intensidade das alterações histopatológicas glomerulares, nos grupos 1 e 2, encontram-se apresentados na tabela 4 e na figura 6.

Tabela 4 - Número absoluto e percentagem de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) formas amastigotas do parasita no tecido renal, de acordo com as alterações histopatológicas glomerulares e a intensidade da lesão. (GP = glomerulonefrite proliferativa; GM = glomerulonefrite membranosa; GMP = glomerulonefrite membranoproliferativa; GSF= glomeruloesclerose segmentar focal).

Variável	Escore	Grupo 1		Grupo 2		P
		N	%	N	%	
GP	Ausente	24	100	32	74,4	<0,0076 ⁽¹⁾
	1	-	-	8	18,6	
	2	-	-	3	7,0	
GM	Ausente	15	62,6	33	76,7	0,0743 ⁽¹⁾
	1	2	8,3	10	23,3	
	2	2	8,3	-	-	
	3	5	20,8	-	-	
GMP	Ausente	10	42,7	27	62,8	0,0070 ⁽¹⁾
	1	-	-	7	16,3	
	2	6	25	8	18,6	
	3	8	33,3	1	2,3	
GSF	Ausente	23	95,8	42	97,7	1,0000 ⁽²⁾
	1	1	4,2	1	2,3	

⁽¹⁾Teste Mann-Whitney ⁽²⁾ teste exato de Fisher

1= discreto; 2 = moderado; 3 =acentuado

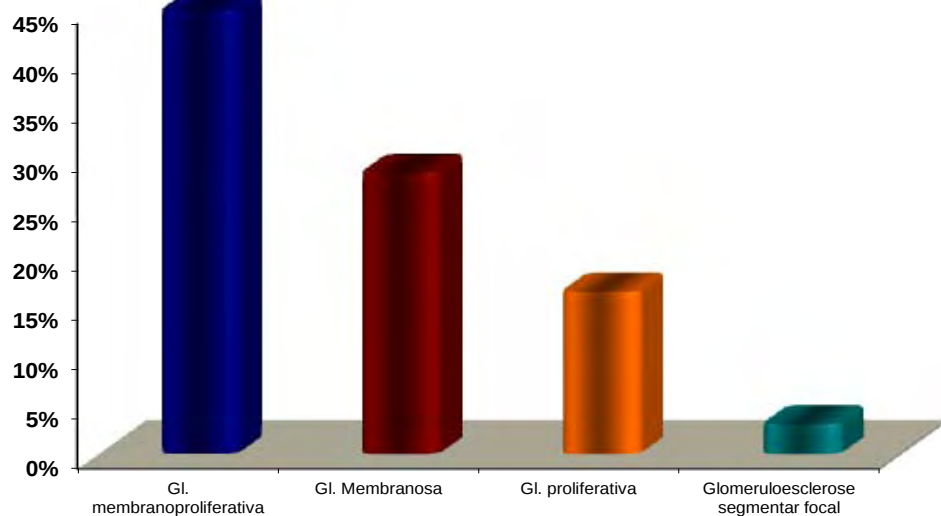


Figura 5 – Percentagem de distribuição de lesões glomerulares, segundo critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde, de 62 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

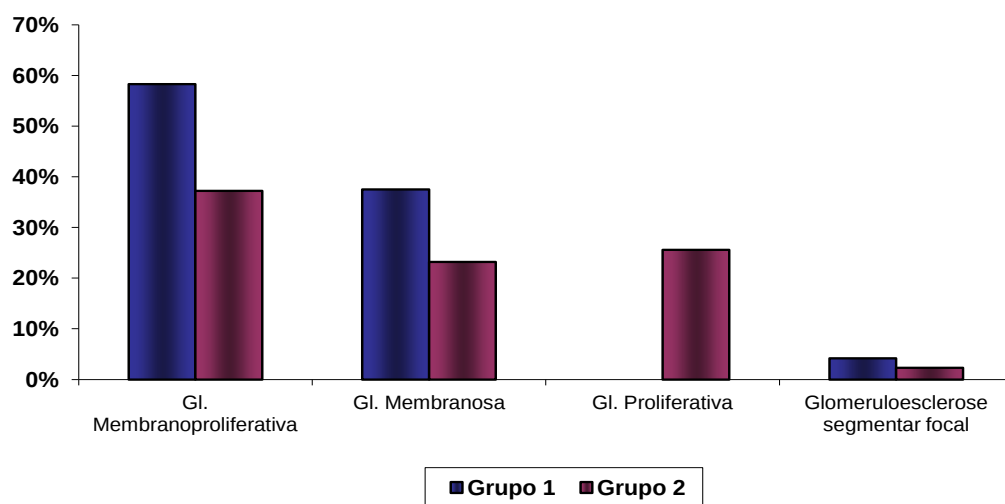


Figura 6 - Porcentagem de distribuição dos padrões histopatológicos evidenciados nas lesões glomerulares de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) a presença de formas amastigotas do parasito no tecido renal.

A glomerulonefrite membranoproliferativa, caracterizada por proliferação de células do mesângio associada ao espessamento da membrana basal e cápsula de Bowman (figuras 7 e 8) foi a lesão glomerular predominante nos dois grupos de cães, tendo sido observada em 14/24 (58,3%) cães do grupo 1 e em 16/43 (37,2%) animais do grupo 2. Já a glomerulonefrite membranosa (Figura 9), com espessamento difuso da membrana basal glomerular sem evidências de proliferação celular, foi evidente em 9/24 (37,5%) animais do grupo 1, e em 10/43 (23,2%) do grupo 2.

Nenhum cão do grupo 1 possuía glomerulonefrite proliferativa (figura 10), contrapondo-se aos resultados da avaliação histopatológica dos animais do grupo 2, onde esta alteração foi observada em 11/43 (25,6%) animais. Ainda em relação às alterações glomerulares, uma glomeruloesclerose segmentar focal foi o padrão menos observado, uma vez que apenas um cão de cada grupo, 4,2% dos cães do grupo 1 e 2,3% do grupo 2, apresentava esta alteração.

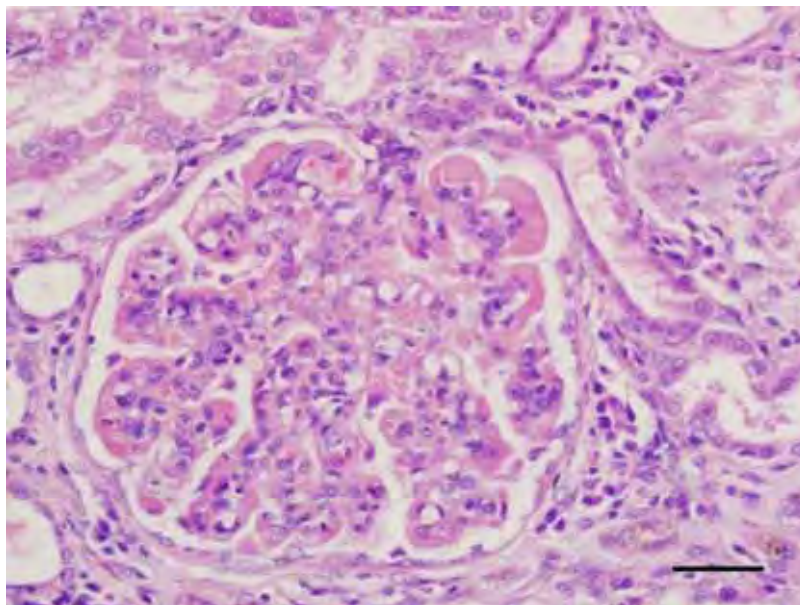


Figura 7 - Fotomicrografia de rim de cão (G1) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, evidenciando a presença de glomerulonefrite membranoproliferativa. Hematoxilina e eosina. (Barra = 50µm)

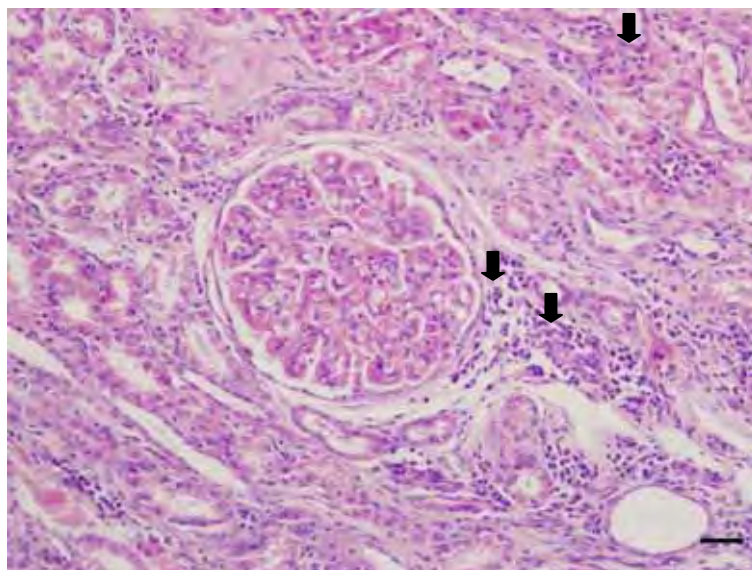


Figura 8 - Fotomicrografia de rim de cão (G1) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, evidenciando a presença de glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite intersticial (setas). Hematoxilina e eosina. (Barra = 50µm)

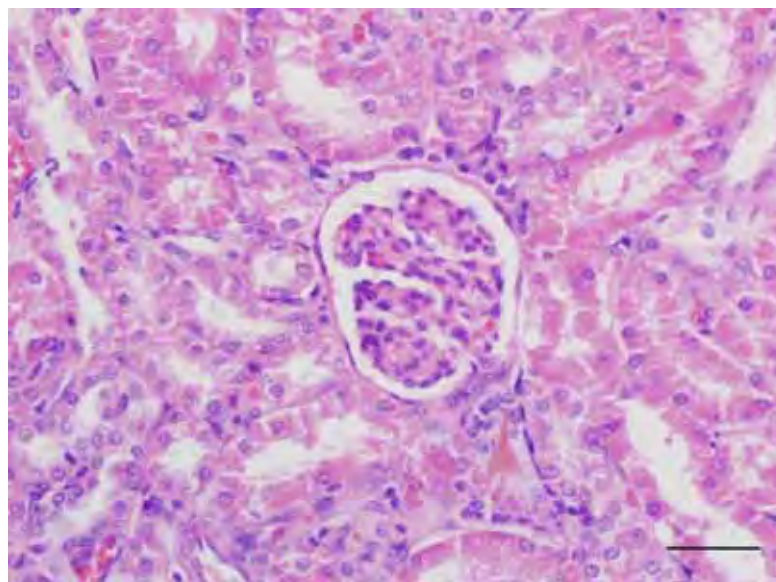


Figura 9 - Fotomicrografia de cão (G1) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, evidenciando a presença de glomerulonefrite membranosa. Hematoxilina e eosina. (Barra = 50µm)

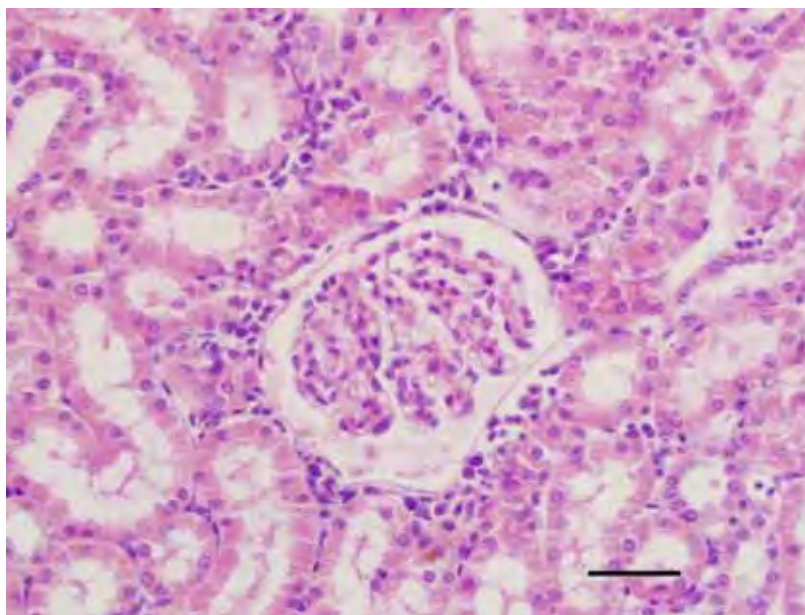


Figura 10 - Fotomicrografia de rim de cão (G1) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, evidenciando a presença de glomerulonefrite proliferativa. Hematoxilina e eosina. (Barra = 50µm)

Verificou-se uma diferença significativa entre a intensidade das lesões glomerulares observadas nos cães dos dois grupos experimentais. Enquanto 13/24 (54,2%) cães do grupo 1 apresentaram lesões de intensidade severa, apenas em 1/38 (2,6%) cão do grupo 2 possuía a mesma intensidade de lesão ($p < 0,001$). Desta forma, a presença do parasito no tecido renal associou-se com maior prevalência e intensidade das lesões glomerulares ($p < 0,001$).

Os doze animais com elevações nas concentrações séricas de creatinina apresentavam lesões glomerulares, caracterizadas por glomerulonefrite membranoproliferativa em 8/12 (66%), glomerulonefrite membranosa em 3/12 (25%) e glomerulosclerose segmentar focal em 1/12 (8,4%) cães. Ainda lesões glomerulares classificadas como severas foram observadas em 7/12 (58,3%) animais azotêmicos.

Dentre os animais com valores de P/C $U > 0,5$, 40/44 (91,8%) apresentaram lesões glomerulares. O padrão de lesão mais observado foi a glomerulonefrite membranoproliferativa, identificada em 22/40 (55%), seguido pela glomerulonefrite membranosa em 13/40 (32,%) animais. As alterações menos frequente nos animais proteinúricos foram a glomerulonefrite proliferativa e a glomerulosclerose

segmentar focal, visualizadas em 4/40 (10%) e 1/40 (2,5%) animais, respectivamente.

Uma nefrite intersticial (figura 11) foi identificada em 44/67 (65,7%) dos animais avaliados. As células inflamatórias apresentaram um perfil predominantemente composto por linfócitos, seguidos de plasmócitos e histiócitos. Esse infiltrado foi observado no interstício, com distribuição periglomerular, perivascular e peritubular. Verificou-se uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$), com 23/24 (95,8%) cães do grupo 1 e 21/43 (48,8%) do grupo 2 apresentando esse tipo de lesão (figura 12).

Ainda, os animais com presença do parasito no tecido renal possuíam lesões de maior intensidade quando comparados aos cães do grupo 2 ($p < 0,001$). Enquanto no grupo 1 20/24 (83,3%) animais apresentaram nefrite intersticial de grau moderado a severo, no grupo 2 apenas 10/43 (23,2%) cães possuíam lesões de intensidade moderada (tabela 5), evidenciando que a nefrite intersticial foi mais prevalente e de maior grau de intensidade nos animais que apresentavam formas amastigotas de *Leishmania* sp nos rins.

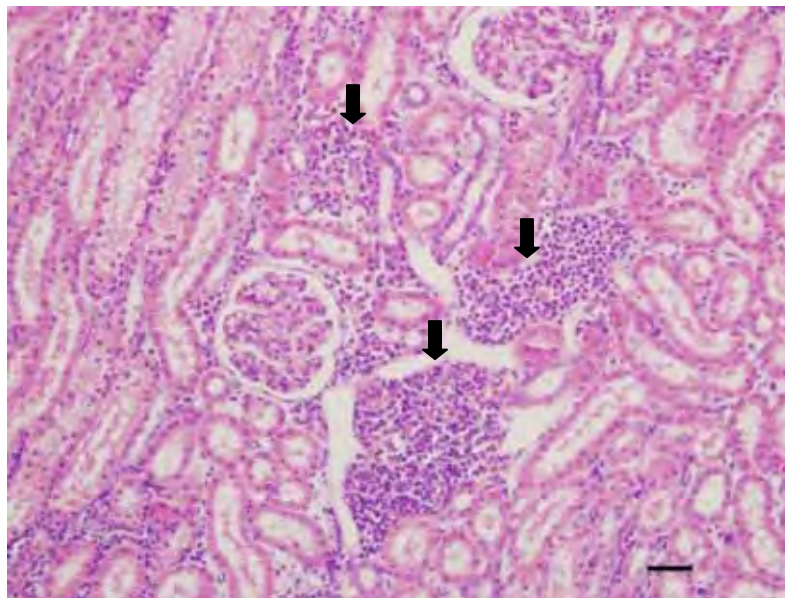


Figura 11 - Fotomicrografia de rim de cão (G1) naturalmente acometido por leishmaniose visceral, evidenciando a presença de nefrite intersticial com infiltrado inflamatório mononuclear (setas). Hematoxilina e eosina. (Barra = 50µm)

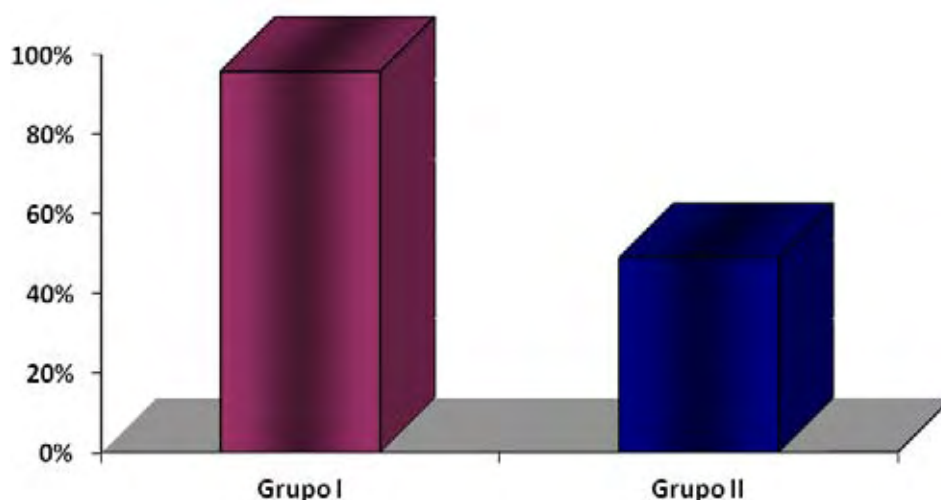


Figura 12 – Percentagem da presença de nefrite intersticial em cortes histológicos de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) formas amastigotas de *Leishmania* sp. nos rins.

Tabela 5 - Número absoluto e percentagem de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) formas amastigotas do parasita no tecido renal, de acordo com a intensidade (escore) da nefrite intersticial.

Variável	Escore	Grupo 1		Grupo 2	
		N	%	N	%
Nefrite intersticial	Ausente	1	4,2	22	51,1
	1	3	12,5	11	25,6
	2	15	62,5	10	23,3
	3	5	20,8	-	-

Teste Mann-Whitney (P<0,0001)

Lesões tubulares, caracterizados pela presença de nefrose, necrose e cilindros hialinos, foram observadas em 25/67 (37,3%) animais. Não foi verificada diferença significativa entre os grupos quanto à evidências de lesões tubulares, exceto no que diz respeito à presença de cilindros, encontrados em 13/24 (54,2%) animais do grupo 1 e 4/43 (9,3%) do grupo 2 ($p < 0,0001$).

5.5 Reação de imuno-histoquímica para formas amastigotas de *Leishmania* sp., linfócitos T CD3+ e linfócitos B CD79+

Imunomarcações para *Leishmania* sp. foram observadas em 24/67 (35,8%) cães do presente estudo (figura 13), que compuseram o grupo 1.

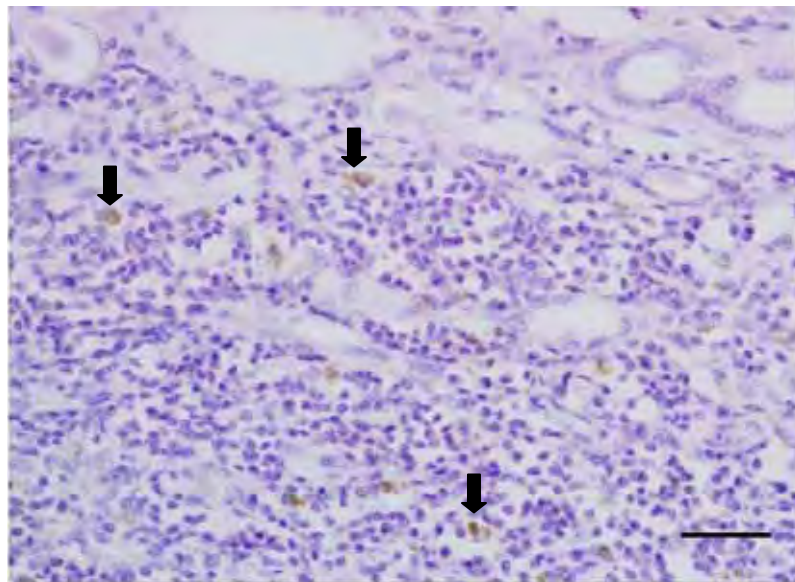


Figura 13 – Fotomicrografia de rim de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral evidenciando a presença de imunomarcação para *Leishmania* sp. (setas) no infiltrado inflamatório intersticial. Complexo Estreptavidina-Peroxidase) (Barra = 50µm)

Imunomarcações para linfócitos T CD3+ (figura 14) foram observadas em 24/24 (100%) cães do grupo 1 e 42/43 (97,7%) do grupo 2 (figura 15). Nos cães com parasitos no tecido renal a percentagem de área marcada, avaliada pela análise de captura, variou de 1,52% a 13,63%, enquanto no grupo 2 a variação foi de 0% a 9,67% (figura 16). Verificou-se uma associação positiva ($p = 0,0005$) entre a presença

de formas amastigotas no tecido renal e a intensidade do infiltrado inflamatório constituído de linfócitos T CD3⁺. Os valores médios, desvio-padrão e a mediana das percentagens de áreas com imunomarcação de linfócitos T CD3⁺ encontram-se dispostos na tabela 6. Os valores individuais da porcentagem de áreas com imunomarcação para linfócitos T CD3⁺ dos animais dos dois grupos encontram-se apresentados nos anexos C e D.

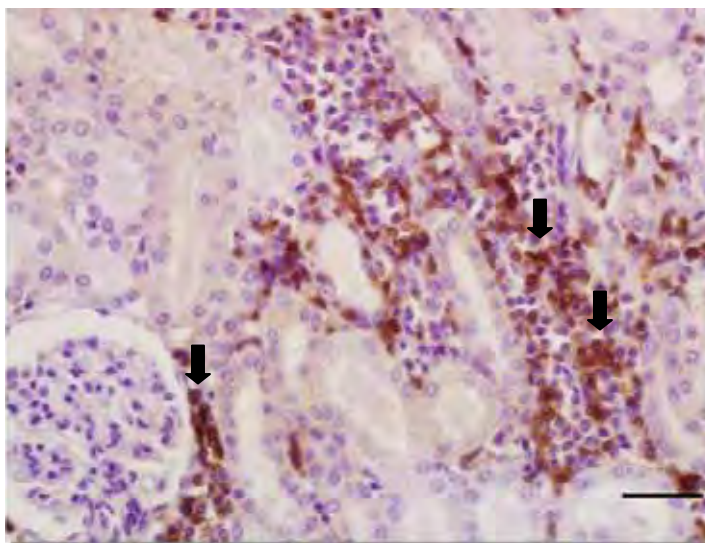


Figura 14 – Fotomicrografia de rim de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral, evidenciando a presença de imunomarcação para linfócitos T (setas) no infiltrado inflamatório intersticial. Complexo Estreptavidina-Peroxidase) (Barra = 50µm)

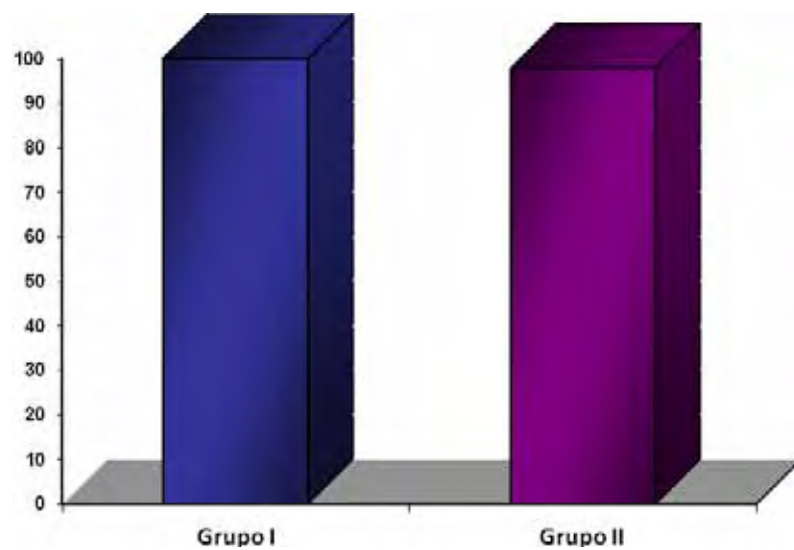


Figura 15 – Percentagem de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) formas amastigotas de *Leishmania* sp. nos rins, em que foi observada imunomarcção para linfócitos T CD3+ no tecido renal.

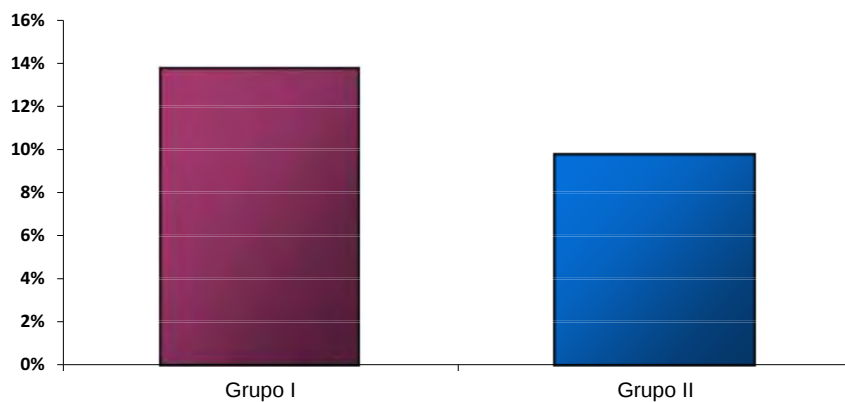


Figura 16 – Percentagem da área marcada para linfócitos T CD3+ em tecidos renais de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) formas amastigotas de *Leishmania* sp. nos rins.

Imunomarcações para linfócitos B CD79⁺ (figura 17) foram observadas em 24/24 (100%) cães do grupo 1 e 24/43 (55,8%) do grupo 2 (figura 18) ($p < 0,0001$). Nos cães com parasitos no tecido renal a porcentagem de área marcada variou de 1,02% a 12,81%, enquanto no grupo 2 a variação foi de 0% a 3,15% (figura 19), com distribuição difusa no parênquima renal. A presença de formas amastigotas do parasito no tecido renal apresentou associação positiva com a intensidade do infiltrado de linfócitos B ($p < 0,0001$). Os valores médios, desvio-padrão e a mediana para as imunomarcações de linfócitos B CD79⁺ estão dispostos na tabela 6. Os valores individuais da porcentagem de áreas com imunomarcações para linfócitos B CD79⁺ dos animais dos dois grupos encontram-se apresentados nos anexos C e D.

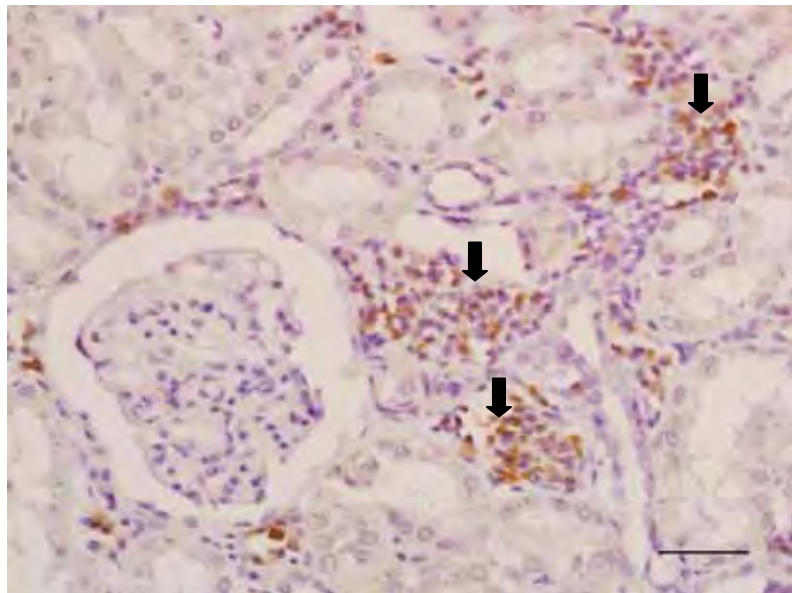


Figura 17 – Fotomicrografia de rim de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral evidenciando a presença de imunomarcações para linfócitos B CD79⁺ (setas) no infiltrado inflamatório intersticial. Complexo Estreptavidina-Peroxidase). (Barra = 50 μ m)

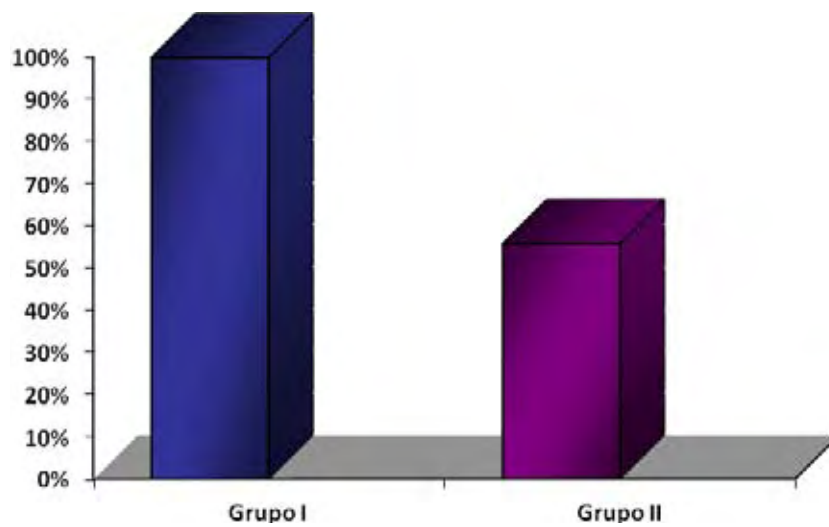


Figura 18 - Percentagem de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) formas amastigotas de *Leishmania* sp. nos rins, em que foi observada imunomarcacão para linfócitos B CD79+ no tecido renal.

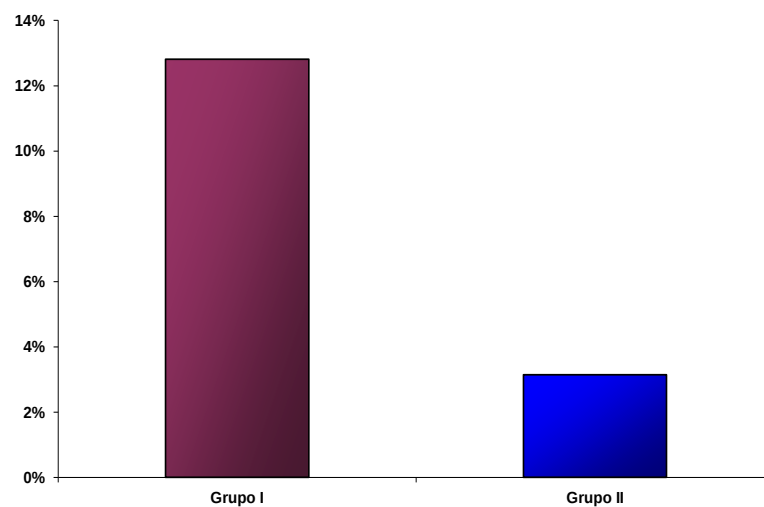


Figura 19 - Percentagem da área marcada para linfócitos B CD79+ em tecidos renais de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) formas amastigotas de *Leishmania* sp. nos rins.

Tabela 6 – Valores da média ($\bar{x}$), desvio padrão (s) e mediana (Md) da percentagem de área com imunomarcção de linfócitos T e de linfócitos B no tecido renal de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com (Grupo 1) e sem (Grupo 2) a presença do parasita nos rins.

Variável	G 1 (n=24)		G 2 (n=43)		P ⁽¹⁾
	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	
Linfócitos T	5,65 $\pm$ 3,01	5,47	2,66 $\pm$ 2,81	1,54	0,0005
Linfócitos B	4,42 $\pm$ 3,28	3,13	0,80 $\pm$ 1,08	0,25	< 0,0001

⁽¹⁾ Teste Mann-Whitney

6. DISCUSSÃO

A escolha por utilizar cães nefropatas acometidos por leishmaniose visceral baseou-se no interesse dos autores em pesquisar a real presença do parasito no tecido renal e averiguar as consequências decorrentes desta deposição. A média de idade dos cães avaliados foi de três anos, reforçando a constatação de NUNES e colaboradores (2008), que ao acompanharem a dinâmica populacional canina de área endêmica para leishmaniose visceral observaram uma significativa redução na faixa etária dos cães parasitados, fato este relacionado com a eliminação de animais infectados e a alta taxa de reposição de cães jovens susceptíveis no meio.

No que diz respeito aos sinais clínicos todos os animais do presente estudo eram sintomáticos, o que difere das proporções estimadas de 20 a 40% de cães assintomáticos em uma população infectada descritas por NOLI (1999) e SOLANO-GALLEGO e colaboradores (2009). Tal discrepância se deve ao fato dos cães utilizados terem sido encaminhados ao setor de clínica médica do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária para atendimento ambulatorial.

Os principais achados de exame físico compreenderam a linfadenopatia periférica, lesões dermatológicas e perda de peso observados em 74,6%, 73,1% e 71,7% dos cães respectivamente. Tais alterações foram semelhantes às referidas por CIAMARELLA & CORONA (2003), KOUTINAS e colaboradores (1999), FEITOSA e colaboradores (2000) e BANETH (2006).

O diagnóstico de doença renal crônica foi estabelecido, por meio de exames laboratoriais, em 46/64 cães (71,9%), prevalência maior do que a descrita em estudos pretéritos (COSTA et al., 2003; PLANELLAS et al., 2004; FRANCESHI et al., 2007). A discrepância entre os resultados obtidos pode ser justificada ao notar que estes estudos utilizaram valores de $P/C U > 1$ como indicadores de lesão renal, enquanto o presente estudo utilizou critérios mais rigorosos, ou seja, $P/C U > 0,5$, segundo as orientações da Sociedade Internacional de interesse renal. (IRIS, 2011). Nossos resultados ressaltam a validade deste critério para detecção laboratorial da lesão renal, uma vez que dos 44 animais que apresentaram valores de $P/C U > 0,5$, somente em quatro deles não houve confirmação das lesões renais quando da avaliação histopatológica.

O estadiamento da doença renal crônica foi determinado em todos os cães com intuito de avaliar a intensidade do comprometimento renal. Observou-se o predomínio do estágio inicial, caracterizado pela ocorrência de proteinúria e ausência de azotemia, observado em 34/46 (73,95) dos cães. Estágio avançado da enfermidade, caracterizado pela presença de azotemia, foi observado em 12/46 (26,1%). Tais resultados divergem dos achados de CORTADELLAS e colaboradores (2006) que observaram maior porcentagem de animais azotêmicos.

Todos os animais com *Leishmania* sp. no rim apresentavam doença renal crônica, enquanto no grupo sem presença de parasitos o quadro foi verificado em 56% dos cães. Tais achados reforçam a hipótese de participação direta do parasita no desenvolvimento da injúria renal, concordando com os achados de COSTA e colaboradores (2010) e discordando de TAFURI e colaboradores (1989) e COSTA e colaboradores (2000) que sugeriram que a lesão renal é decorrente da deposição de imunocomplexos no glomérulo.

Animais com parasitas nos rins possuíam concentrações séricas de creatinina mais elevadas em relação ao grupo 2, sugerindo maior gravidade das lesões, que foi confirmada quando da avaliação histopatológica, uma vez que 13/24 (54,2%) cães do grupo 1 e 1/38 (2,6%) cão do grupo 2 possuíam lesões glomerulares severas. Tais observações corroboram com os relatos de COSTA e colaboradores (2010).

Todos os animais com parasitas nos rins apresentaram proteinúria enquanto a mesma foi observada em apenas 53,6% dos cães do grupo 2. Verificou-se uma associação entre a presença de leishmanias no rim e a ocorrência de proteinúria. Até onde é de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avaliou a associação entre a presença do parasito com a ocorrência de proteinúria.

A presença de lesões renais foi identificada em 92,5% dos cães, valores semelhantes aos descritos por POLI e colaboradores (1991), NIETO e colaboradores (1992) e COSTA e colaboradores (2003). Tais achados ressaltam a alta sensibilidade da avaliação histopatológica quando comparada ao estabelecimento do diagnóstico de doença renal por meio de exames laboratoriais, que determinou a presença da enfermidade em apenas 71,9% dos animais.

No presente estudo as alterações glomerulares foram mais prevalentes do que as alterações túbulos-intersticiais, corroborando com os achados de POLI e

colaboradores (1991) e COSTA e colaboradores (2003). Quando presente, as lesões túbulos-intersticiais estavam sempre acompanhadas de alterações glomerulares, concordando com os achados de ZATELLI e colaboradores (2003). Esta constatação ressalta os efeitos deletérios da proteinúria apontados por GRAUER (2005).

Diferente de NIETO e colaboradores (1992) e BENDERITTER e colaboradores (1998) que só identificaram um padrão histopatológico em lesões glomerulares de cães com leishmaniose visceral, no presente estudo foram observados quatro padrões, semelhante ao descrito por ZATELLI e colaboradores (2003). A alteração mais frequentemente observada foi a glomerulonefrite membranoproliferativa, identificada em 30/67 (44,7%) cães, concordando com os relatos de COSTA e colaboradores (2003) e ZATELLI e colaboradores (2003) que verificaram o mesmo padrão histopatológico em 32,7% e 29,3% dos animais, respectivamente.

No que diz respeito às lesões túbulos-intersticiais, a prevalência de 65,7% de nefrite intersticial e de 37,3% de alterações tubulares foi inferior à observada por COSTA e colaboradores (2003), que avaliando 55 cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* identificaram nefrite intersticial e lesões tubulares em 78% e 80% dos animais, respectivamente. Ainda, a presença de formas amastigotas do parasito foi evidenciada predominantemente em região intersticial, observando-se uma associação entre a existência da imunomarcação com a gravidade da nefrite intersticial. As células inflamatórias foram identificadas nas regiões periglomerular, perivascular e peritubular, confirmando as observações de COSTA e colaboradores (2000), que sugeriram que o infiltrado inflamatório pode ser decorrente da presença de antígenos parasitários. No que tange às lesões tubulares, cilindros hialinos foram comumente visualizados nos cães do grupo 1, sendo facilmente explicado devido a intensa proteinúria observada nos animais deste grupo.

Os doze animais azotêmicos apresentavam glomerulonefrite, sendo a glomerulonefrite membranoproliferativa o padrão mais comum, concordando com COSTA e colaboradores (2003) que observaram correlação entre a presença de azotemia e a intensidade da proliferação das células glomerulares.

No presente estudo a prevalência de cães infectados com presença de parasita no tecido renal foi de 35,8% (24/67), valores estes inferiores aos observados por COSTA e colaboradores (2003) e COSTA e colaboradores (2010) e superiores aqueles relatados por FERRARI e colaboradores (2010).

A ocorrência de imunomarcações para linfócitos T CD3+ no tecido renal foi elevada em ambos os grupos, entretanto com maior intensidade nos cães com parasitos no tecido renal, sugerindo uma participação da imunidade celular no desenvolvimento das lesões renais, conforme salientado por VAN ALDERWEGEN e colaboradores (1997) e COSTA e colaboradores (2000) quando da avaliação de cães com leishmaniose visceral, e de LIM e colaboradores (2001) e TIPPING & TIMOSHANKO (2005) que avaliaram a participação de células T nas glomerulonefrites de humanos. Embora não tenha sido avaliada, no presente estudo, a presença de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, estudo pretérito sugere a participação maior de linfócitos T CD4⁺ (COSTA et al., 2010).

Apesar de haver evidências da participação da imunidade celular na etiopatogenia das lesões renais em cães com leishmaniose visceral, há que se considerar também o envolvimento de imunidade humoral. No presente estudo todos os cães do grupo 1 e 55% dos cães do grupo 2 possuíam imunomarcação para linfócitos B CD79⁺, como maior intensidade nos animais do primeiro grupo, sugerindo que a presença do parasita pode favorecer a formação local de anticorpos, e não só a deposição de imunocomplexos circulantes como sugeriram TAFURI e colaboradores (1989) e COSTA e colaboradores (2000). Tais resultados discordam dos relatos de COSTA e colaboradores (2010) que não verificaram diferença estatisticamente significativa entre depósitos de imunoglobulinas nos rins de cães com leishmaniose visceral e de cães não infectados, mas confirmam as observações de SOLANO-GALLEGO e colaboradores (2003) e TODOLÍ e colaboradores (2009).

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo, nas condições do presente experimento, permitiram concluir que:

- A prevalência de doença renal crônica na população estudada foi de 72,9%, evidenciando-se uma associação entre a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp nos rins e a severidade da nefropatia;
- A presença do parasito nos rins esteve associada a uma elevação das concentrações séricas de creatinina e da relação proteína/creatinina urinária;
- Existiu uma associação positiva entre a identificação do parasito no tecido renal e uma maior prevalência e intensidade das lesões glomerulares e intersticiais;
- Cães com presença do parasito nos rins apresentaram uma maior intensidade de infiltrado inflamatório constituído por linfócitos T CD3+ e de linfócitos B CD79+;
- A presença de *Leishmania* sp, linfócitos T CD3+ e de linfócitos B CD79+ nos rins de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral confirmam a participação do parasita, da imunidade celular da imunidade humoral na patogênese da lesão renal.

REFERÊNCIAS

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v.57, 2004, 88p.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGÓ, L. Canine leishmaniosis, In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. p. 735-746.

BARBIÉRI, C. I. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**. v.28, p.329-337, 2006.

BENDERITTER, T.H.; CASANOVA, P.; NASHKIDACHVILI, L. Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine Parasitology**. v.82, p.335- 341, 1998.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.H.; GOY-THOLLOT, I.; CADORÉ, J.L. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**. v. 162, p.108-120, 2001.

BOYD, L.M.; LANGSTON, C.; THOMPSON, K.; ZIVIN, K.; IMANISHI, M. Survival in cats with naturally occurring chronic kidney disease (2000-2002). **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.22, p. 111-117, 2008.

CHURG, J.; BERNSTEIN, J.; GLASSOCK, R.J. Renal disease: classification and atlas of glomerular disease. 2 ed. New York: Igaku-shoin, 1985. 541p.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, n.5, p.358-368, 2003.

CENTER, S.A.; WILKINSON, E.; SMITH, C.A.; ERB, H.; LEWIS, R.M. 24-hour urine protein/creatinine ratio in dogs with protein-losing nephropathies. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.8, p.820-824, 1985.

CORTADELLAS, O.; FERNÁNDEZ DEL PALACIO, M.J.; TALAVERA, J.; BAYÓN, A, ALBERT, A. Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.20, p.941-947, 2006.

CORTADELLAS, O.; FERNÁNDEZ DEL PALACIO, M.J.; TALAVERA, J.; BAYÓN, A. Glomerular filtration rate in dogs with leishmaniasis and chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.22, p.293-300, 2008.

COSTA, F. A.; GUERRA, J.L.; SILVA, S.M.; KLEIN, R.P.; MENDONÇA, I.L.; GOTO, H. CD4 (+) T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biologic Research**. v.33, p.1455-1458, 2000

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

COSTA, F.A.L.; PRIANTI, M.G.; SILVA, T.C.; SILVA, S.M.M.S.; GUERRA, J.L.; GOTO, H. T cells, adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis. **BMC Infectious Diseases**. v.10, p.112-124, 2010.

DUARTE, M.I.; SILVA, M.R.; GOTO, H.; NICODEMO, E.L.; AMATO NETO, V. Interstitial nephritis in human kala-azar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.77, p.531-537, 1983.

EDDY, A. Role of cellular infiltrates in response to proteinúria. **American Journal of Kidney Disease**. v.37, p.25-29, 2001

ENGWERDA, C.R.; ATP, M.; KAYE, P.M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **TRENDS in Parasitology**, v.20, n.11, p.524-530, 2004.

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

FERRARI, H.F.; CARREIRA, V.S.; MOREIRA, M.A.B.; MATTA, V.R.; HAGA, C.H.; LUVIZOTTO, M.C.R. Morphological, immunohistochemical and molecular study of renal lesions in canine visceral leishmaniasis. **Veterinária e Zootecnia**. v.17, n.1, p.123-131, 2010.

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Barcelona, Spain. **Canine Leishmaniasis: an update**. Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet, 1999. p.6.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2.; 2002, Sevilla, Spain. **Proceeding...**Salamanca: Intervet bv, 2002. p.21.

FRANCESCHI, A.; MERILDI, V.; GUIDI, G.; MANCIANTI, F. Occurrence of Leishmania DNA in urine of dogs naturally infected with leishmaniasis. **Veterinary Research Communications**. v.31, p.335-341, 2007.

GUYTON, A.C. Os rins e os líquidos corporais. In: GUYTON, A.C; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 10.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2002. p.265-278.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 1993, 202f. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

GRAUER, G.F. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America**. v.35, p.581-596, 2005.

GRAUER, G.F. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinúria and treatment. **Journal of Small Animal Practice**. v.46, p.469-478, 2005^a.

GRAUER, G.F. introduction: Proteinuric Renal Disease. **Topics in Companion Animal Medicine**. v.26, p.119-120, 2011.

HILGERS, K.F.; MANN, J.F.E. Role of angiotensina II in glomerular injury: lessons from experimental and clinical studies. **Kidney and Blood Pressure Research**. v.19, p.254-262, 1996.

IKEZUMI, Y.; KANNO, K.; KARASAWA, T.; HAN, G.D.; ITO, Y.; TOYABE, S.; UCHIYAMA, M.; SHIMIZU, F.; KAWACHI, H. The role of lymphocytes in the experimental progressive glomerulonephritis. **Kidney International**. v.66, p.1036-1048, 2004.

International Renal Interest Society (IRIS) – Available at: <http://www.iris-kidney.com>
Acesso em janeiro de 2011.

JACOBS, F.; POLZIN, D.J.; OSBORNE, C.A. Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.226, p. 393-400, 2005.

JERUMS, G.; PANAGIOTOPOULOS, S.; TSALAMANDRIS, C. Why is proteinuria such an important risk factor for progression in clinical trials? **Kidney International**. v.53, p.587-592, 1997.

KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K.G. Clinical considerations on canine

visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.35, n.5, p.376-383, 1999.

KRAMER, L.; CALVI, L.E.; GRANDI, G. Immunity to *Leishmania infantum* in the dog: Resistance and disease. **Veterinary Research Communications**, v.30, suppl.1, p.53-57, 2006.

LESS, G.E. Early diagnosis of renal disease and renal failure. **Veterinary Clinics of North America**. v.34, p.867-885, 2004.

LEES, G.E.; SCOTT, A.B.; ELLIOTT, J.; GRAUER, G.F.; VADEN, S.L. Assessment and Management of Proteinuria in Dogs and Cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (Small Animal). **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.19, p.377-385, 2005.

LIM, C.S.; ZHENG, S.; KIM, Y.S.; AHN, C.; HAN, J.S.; KIM, S.; LEE, J.S.; CHAE, D.W.; KOO, J.R.; CHUN, R.W.; NOH, J.W. Th1/Th2 predominance and proinflammatory cytokines determine the clinicopathological severity of IgA nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**. v.16, p.269-275, 2001.

LOBSIGER, L.; MULLER, N.; SCHWEIZER, T.; FREY, C.F.; WIEDERKEHR, D.; ZUMKEHR, B.; GOTTSTEIN, B. An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. **Veterinary Parasitology**. v.169, p.408-414, 2010.

MACHADO, J.G.; HOFFMANN, J.L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral. **Clínica Veterinária**, n.71, p.50-58, 2007.

MARCONDES, M. **Envolvimento do sistema nervoso central na leishmaniose visceral canina**. 2009. 154f. Tese (Livre-docência). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista- Araçatuba, 2009.

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILER, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology**. v.16, p.188-189, 2000.

MAXIE, M.G.; PRESCOTT, S.F. The urinary system. In: JUBB, K.V.F. **Pathology of Domestic Animals**. 4.ed. New York: Academic Press, 2007. p.449-487

MULLER, N.; WELLE, M.; LOBSIGER, L.; STOFFEL, M.H.; BOGHENBOR, K.K.; HILBE, M. GOTTSTEIN, B.; FREY, C.F.; GEYER, C. BOMHARD, W. Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. **Veterinary Parasitology**. v.166, p.346-351, 2009.

NIETO, C.G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M.A. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**. v.45, p.33-47, 1992.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**. v.9, n.2, p.16, 1999.

OLBRICHT, C.J.; CANNON, J.K.; GARG, L.C.; TISHER, C.C. Activities of cathepsins B and L in isolated nephron segments from proteinuric and nonproteinuric rats. **American Journal of Physiology**. v.250, p.1055-1062, 1986.

NUNES, C.M.; LIMA, V.M.F.; DE PAULO, H.B.; PERRI, S.H.V.; ANDRADE, A.M.; DIAS, F.E.F.; BURATTINI, M.N. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.153, p.19-23, 2008.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and immunity**. v.62, n.1, p.229-235, 1994.

PLANELLAS, M.; LLORET, A.; ROMANO, V. Evaluation of renal involvement in 116 dogs with leishmaniasis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.18, p.787, 2004.

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

POLZIN, D.J.; OSBORNE, C.A.; ROSS, S. Chronic kidney disease. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. St Louis, MO: Elsevier Saunders; 2005: p.1756-1785.

POLZIN, D.J.; ROUDEBUSH, P.; ADAMS, L.G.; TOWELL, T.L.; FORRESTER, S.D. An evidence-based review of therapies for canine chronic kidney disease. **Journal of Small Animal Practice**. v.51, p.244-252, 2010.

PRIANTI, M.G.; YOKOO, M.; SALDANHA, L.C.B.; COSTA, F.A.L.; GOTO, H. *Leishmania (Leishmania) chagasi*-infected mice as a model for the study of glomerular lesions in visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biologic Research**. v.40, p.819-824, 2007.

ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1993.

ROITT, I.M.; DELVES, P.J. **Fundamentos de Imunologia**, 10.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004, 490 p.

SILVA, A.R.S.; ROSSI, C.N.; GOMES, A.A.D.; VIEIRA, R.F.C.; IKEDA-GARCIA, F.A.; CIARLINI, P.C.; CIARLINI, L.D.R.P.; FEITOSA, M.M. Osteoartrite por *Leishmania sp.* em cão Pitt Bull - Relato de caso. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.2, p.730-732, 2007.

SMETS, P.M.; MEYER, E.; MADDENS, B.E.; DUCHATCAU, L.; DAMINET, S. Urinary markers in healthy young and aged dogs with chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.24, p.65-72, 2010

SOLANO GALLEGGO, L.; RODRÍGUEZ, A.; INIESTA, L.; ARBOIX, M.; PORTÚS, M.; ALBEROLA, J. Detection of anti-*Leishmania* Immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v.10, n.5, p.849-855, 2003.

SOLANO GALLEGGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; BORDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**. v.28, p.1-18, 2009

SYME, H.M.; ELLIOTT, J. Relation of survival time and urinary protein excretion in cats with renal failure and/or hypertension (abstract). **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.17, p.405, 2003

TANG, S.; SHERRIN, N.S.; ZHOU, W. Apical proteins stimulate complement synthesis by cultured human proximal tubular epithelial cells. **Journal of the American Society Nephrology**. v.10, p.69-76, 1999

TAFURI, W.L.; MICHALICK, M.S.M.; DIAS, M.; GENARO, O.; LEITE, V.H.R.; BARBOSA, A.J.A.; BAMBIRRA, E.A.; DA COSTA, C.A.; MELO, M.N.; MAYRINK, W. Estudo ao microscópio óptico e eletrônico do rim de cães naturalmente infectados e experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. v.31, p.139-145, 1989.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.E.; GONÇALVES, R.; DE MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M.; TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**. v.292, p.17-23, 2004.

TIPPING, P.G.; TIMOSHANKO, J. Glomerulonephritis, th1 and th2: what's the new? **Clinical & Experimental Immunology**. v.14, p.207-215, 2005

TODOLÍ, F.; SOLANO-GALLEGO, L.; OJEDA, A.; QUINTANA, J.; LLORET, A.; ROURA, X.; ALBEROLA, J.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, ALHELÍ. Anti-*Leishmania* IgA in urine samples from dogs with clinical leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v.159, p.17-23, 2009.

TORRES-NETO, R.; RODRIGUES, M.M.P.; AMORIM, R.L.; CONCEIÇÃO, L.G.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FRANCO, S.R.V.S. Expression of CD3 and CD79a cell markers in exfoliative and ulcerative skin lesions in dogs with leishmaniasis. **Semina: Ciências Agrárias**. v.29, p.165-174, 2008.

VADEN, S.L. Glomerular disease. **Topics in Companion Animal Medicine**. v.26, p.128-134, 2011.

VAN ALDERWEGEN, I.E.; BRUIJIN, J.A.; DE HEER, E. T cells subsets in immunologically-mediated glomerulonephritis. **Histology and Histopathology**, v.12, p.241-250, 1997.

VALENTINE, B.A.; MCGAVIN, M.D. Skeletal muscle. In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Pathologic basis of veterinary disease**. 4.ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. p.973-1039.

VIDES, J.P.; SCHWARDT, T.F.; SOBRINHO, L.S.V.; MARINHO, M.; LAURENTI, M.D.; BIONDO, A.W.; LEUTENEGGER, C.; MARCONDES, M. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.178, p.22-28, 2011

ZATELLI, A.; BORGARELLI, M.; SANTILLI, R.; BONFANTI, U.; NIGRISOLI, E.; ZANATTA, R.; TARDUCCI, A.; GUARRACI, A. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. **American Journal of Veterinary Research**. v.64, n.5, p.558-561, 2003.

APÊNDICES

Anexo A - Valores individuais de creatinina sérica (mg/dl) e de P/C U dos 24 animais incluídos no grupo 1.

Animal	Creatinina sérica (mg/dl)	P/C U
1	4,31	-
2	3,13	1,5
3	0,95	3,05
4	0,5	1,75
5	0,72	0,78
6	1,58	4,52
7	0,45	2,76
8	2,71	4,89
9	0,63	2,11
10	2,79	2,43
11	0,74	3,18
12	2,92	2,45
13	0,78	3,03
14	1,08	5,6
15	0,42	3,25
16	3,6	-
17	0,46	3,66
18	0,43	3,89
19	3,32	3,32
20	1,36	5,04
21	0,98	0,76
22	1,99	3,84
23	0,38	3,49
24	1,16	—

Anexo B - Valores individuais de creatinina sérica (mg/dl) e de P/C U dos 43 animais incluídos no grupo 2.

Animal	Creatinina sérica (mg/dl)	P/C U
1	0,69	0,21
2	0,82	1,29
3	0,84	0,23
4	0,79	1,14
5	0,66	0,24
6	0,68	0,16
7	0,87	0,21
8	0,82	0,4
9	0,74	0,4
10	1,1	0,22
11	0,98	0,79
12	0,82	0,79
13	0,94	1,69
14	0,19	1,98
15	0,53	0,46
16	0,75	0,93
17	0,69	0,52
18	0,64	0,87
19	0,98	2,79
20	1,74	0,43
21	4,73	0,55
22	0,73	0,37
23	1,31	0,43
24	0,45	0,37
25	0,44	—
26	0,42	0,77

continuação...

continuação...

27	0,87	1,6
28	0,42	1,53
29	0,45	0,32
30	0,45	0,74
31	0,39	1,9
32	0,72	0,61
33	0,81	0,33
34	2,56	0,57
35	0,31	1,84
36	0,34	0,95
37	0,36	1,85
38	0,82	—
39	0,78	0,77
40	0,57	0,41
41	0,65	0,41
42	0,51	0,42
43	0,75	0,21

Anexo C - Percentagem de área imunomarcada para linfócito T CD3+ e para linfócito B CD79+ no tecido renal dos 24 animais incluídos no grupo 1.

Animal	CD3+	CD79+
1	5,18	3,26
2	2,18	4,76
3	1,62	1,67
4	3,61	2,65
5	3,95	2,55
6	3,44	7,41
7	1,52	1,89
8	3,67	7,8
9	6,16	6,57
10	13,63	3,18
11	5,15	2,34
12	3,61	2,09
13	8,67	1,02
14	8,68	1,77
15	2,84	1,04
16	6,34	1,26
17	6,83	3,08
18	5,76	5,0
19	7,12	2,12
20	6,54	5,1
21	7,96	10,37
22	2,91	12,81
23	11,35	10,13
24	6,95	6,31

Anexo D- Percentagem de área imunomarcada para linfócito T CD3+ e para linfócito B CD79+ no tecido renal dos 43 animais incluídos no grupo 2.

Animal	CD3+	CD79+
1	0	0
2	0,9	0
3	5,27	0,52
4	0,81	0
5	1,99	0
6	0,18	0
7	1,23	0
8	8,72	0,97
9	0,07	0
10	0,69	0
11	9,67	0,8
12	8,6	2,55
13	6,47	0
14	8,02	0,24
15	2,38	0
16	2,9	3,01
17	0,28	0
18	1,03	0
19	3,21	3,15
20	1,54	0
21	0,78	3,06
22	5,16	1,6
23	8,46	3,0
24	5,68	2,48
25	0,12	0
continuação...	0,1	0
27	1,55	continuação...
28	1	

29	0,14	0
30	0,71	0,12
31	3,08	2,54
32	0,19	0
33	0,24	0
34	3,83	1,84
35	1,65	0,46
36	1,36	2,12
37	2,02	0,35
38	0,65	0,34
39	4,53	2,07
40	4,88	0,59
41	3,29	0,43
42	0,11	0,25
43	1,07	0,5