

APOPTOSE E CARACTERIZAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA NEFROPATIA EM CÃES SINTOMÁTICOS E ASSINTOMÁTICOS COM LEISHMANIOSE VISCERAL

VERÇOSA, B.L.A.^{1*}; TAFURI, W.L.¹; PEREIRA, N.B.¹; MENDONÇA, I.L.²; COSTA, F.A.L.²; VITORINO FILHO, R.N.L.²; MEÇA, K.K.O.L.¹; VASCONCELOS, A.C.¹

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma antropozoonose causada por *Leishmania*. O cão é o mais importante reservatório doméstico da doença e um excelente modelo de estudo. O objetivo deste estudo consiste em caracterizar as lesões histopatológicas renais no cão positivo para Leishmaniose visceral. Foram utilizados 10 animais sendo 05 sintomáticos e 05 assintomáticos. Após anestesia, realizou-se coleta de fragmentos de rim, conservados em formol a 10% tamponado. Os fragmentos foram processados, cortados e corados com H-E, SHORR e Giemsa-Lenmert. Para a quantificação da apoptose foram utilizados 5 animais sendo 3 assintomáticos e 2 sintomáticos. Na quantificação do índice apoptótico, consideraram-se as células mesangiais com morfologia sugestiva de apoptose em objetiva planacromática de 40 vezes. Serão contadas as células que apresentaram pelo menos três das características morfológicas sugestivas de apoptose. Todos os animais apresentavam lesão inflamatória. O infiltrado inflamatório variava de média a severa intensidade estando esta diretamente relacionada com o número de sinais clínicos, estando presente predominantemente na região cortical. A apoptose estava presente em ambos os grupos, sendo mais freqüente nos animais sintomáticos com índice apoptótico de 67,95%. Alterações renais, resposta inflamatória e apoptose ocorrem em cães com Leishmaniose visceral, sendo estas mais intensas em animais sintomáticos quando comparados a animais assintomáticos.

Palavras chaves: rim, cão, leishmânia, apoptose

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são enfermidades parasitárias causadas por várias espécies diferentes de protozoários do gênero *Leishmania* (LAINSON e SHAW, 1987). A doença manifesta-se sob três síndromes clínicas principais: leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea e leishmaniose muco-cutânea. No Brasil a LV é causada pela espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* e transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (LAZARO e WARBURG, 1995).

¹Departamento de Patologia Geral. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais; e-mail: brbaravet@yahoo.com.br, anilton@icb.ufmg.br

²Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária. Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Piauí.

O agente da LV é um parasito intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear, que causa, nos indivíduos susceptíveis, supressão da imunidade mediada por células, levando à difusão e multiplicação incontrolada do parasito (NICKOL e BONVENTRE, 1985). A enfermidade acomete o homem e várias espécies animais. O cão é considerado o principal reservatório doméstico da doença humana (DIETZE et al., 1997).

O estudo das alterações renais provocadas por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*, revela vários padrões de lesão glomerular, como glomerulonefrite (GN) de alterações mínimas, glomerulosclerose segmentar focal, GN mesangioproliferativa, GN membranoproliferativa (BRITO et al., 1975; COSTA et al., 2003), mas ainda não sabemos se um padrão de GN é característico de uma fase da infecção ou se os diferentes padrões ocorrem aleatoriamente. De outro lado, a injúria túbulo-intersticial, que parece comprometer mais a função renal do que a lesão glomerular (BOHLE et al., 1987), ainda é pouco conhecida. Nefrite intersticial está presente no homem e no cão com LV, mas a interferência de outros fatores não deixa claro se a lesão é específica da LV, pois ao longo da vida do homem e dos animais, a exposição dos rins a drogas (ANDRES e MCCLUSKEY, 1975) e outras enfermidades (KOOSTRA et al., 1998), que fogem ao controle em casos de infecção natural por *Leishmania (L.) chagasi*, são causas freqüentes de lesões renais que podem ocorrer concomitantemente com a nefrite intersticial devida a LV.

O fenômeno de apoptose está presente em várias infecções influenciando ou não o seu desenvolvimento, como durante infecção por *Leishmania* (DAS et al., 2001; LEE et al., 2002) e *Trypanosoma* (WELBURN et al., 1999).

OBJETIVO

Caracterizar e mensurar as lesões histopatológicas renais e a presença de apoptose presentes em cães com ou sem sintomatologia da LV canina.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 10 animais sendo 05 sintomáticos e 05 assintomáticos. Os cães utilizados no experimento foram examinados e considerados ou não portadores inaparentes quanto a seus parâmetros clínicos. O diagnóstico de LV foi confirmado pelas análises sorológica e parasitológica.

Na sorologia realizou-se detecção de anticorpos anti-*Leishmania* por meio de imunofluorescência indireta (RIFI) e ELISA. Para análise parasitológica foram feitos imprints em lâminas da medula óssea, linfonodo, baço, fígado e pele, que depois de fixados com metanol e corados com Giemsa foram examinados em microscópio de luz para a observação direta do parasito sendo o resultado confirmado por meio da cultura de parasitos em meio NNN e Schneider's Insect Medium.

Após anestesia, realizou-se necrópsia completa para a coleta de fragmentos de até 5 mm de espessura de rim e fígado, conservados em formol a 10% tamponado com fosfato 0,01M pH 7,4. Os fragmentos foram processados segundo técnicas de rotina, cortados a 5 um e corados com Hematoxilina-Eosina, Tricrômio de Shorr e Giemsa-Lenmert.

Foram utilizados 5 animais sendo 3 assintomáticos e 2 sintomáticos para quantificação da apoptose. Essa análise será realizada em lâminas coradas pela coloração Methyl Green Pironina. Na quantificação do índice apoptótico, considerar-

se-á as células mesangiais com morfologia sugestiva de apoptose em objetiva planacromática de 40 vezes. Serão contadas as células que apresentaram pelo menos três das características morfológicas sugestivas de apoptose. O índice apoptótico será determinado pela seguinte fórmula:

$$\text{Índice apoptótico (IA)} = \left(\frac{\text{S nº de células apoptóticas}}{\text{S nº de células totais}} \right) \times 100$$

RESULTADOS

Todos os animais são sorologicamente e parasitologicamente positivos para LV. A linfadenopatia ocorreu em 4 casos (80%), seguida de conjuntivite, alopecia e descamação furfurácea (3 casos, 60%), onicogribose (2 casos, 20%). Os demais sinais clínicos avaliados obtiveram valores abaixo de 10%. Lesões renais foram observadas em todos os animais.

Embora sem descartar totalmente que outras infecções subclínicas pudessem estar presentes na amostra dos casos estudados, consideramos que as lesões renais foram causadas por *Leishmania (L.) chagasi*, pois em todos os casos a infecção foi confirmada por exame parasitológico para leishmaniose; o exame clínico e de necropsia não mostraram quadros sugestivos de outras doenças.

Todos os animais apresentavam lesão inflamatória. O infiltrado inflamatório variava de média a severa intensidade estando esta diretamente relacionada com o número de sinais clínicos. Nos animais sintomáticos verificou-se a presença de infiltrado inflamatório mononuclear, multifocal intenso a moderado, localizado predominantemente nas regiões perivascular, peritubular e periglomerular renais da região cortical (Figura 1). Lesões como Pielonefrite focal e a presença de cilindros hialinos foram observadas apenas em animais com sintomatologia clínica. Nesses animais, a lesão inflamatória abrangia uma maior área com diferença significativa em relação aos animais assintomáticos (Gráfico 1). O infiltrado localizava-se preferencialmente em ambos os grupos analisados na região cortical conforme gráfico 2. Os animais assintomáticos apresentaram lesões renais pouco significativas.

Estudo ultraestrutural realizado no homem sobre nefrite intersticial mostrou que a maioria das células do infiltrado inflamatório pertencia à categoria de linfócitos e macrófagos, sendo rara a presença de células plasmáticas (OLSEN et al., 1986), como foi observado no presente estudo, sugerindo naquele e neste trabalho que a composição do infiltrado inflamatório intersticial é condizente com o mecanismo de lesão mediada por células. Atualmente, está bem estabelecido que a patogênese da maioria das glomerulonefrites é mediada imunologicamente (BLANTZ et al., 1997), embora não esteja claramente definido o tipo de mediação imunológica que ocorre. A predominância de infiltrado de células mononucleares é uma característica de reação mediada por células em tecidos em geral (McCLUSKEY e BHAN, 1982) e em casos de glomerulonefrites (FILLIT e ZABRISKIE, 1982). Essas células, provavelmente, chegam ao interstício renal por migração através da membrana basal dos capilares, cujo endotélio ativado pela presença de antígeno de leishmânia, começa a expressar moléculas de adesão, como tem sido sugerido em GN em cães com LV (COSTA, 2001).

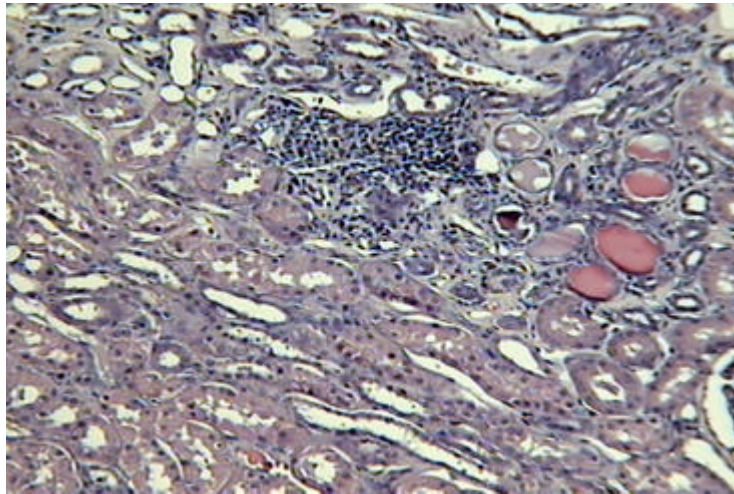


Figura 01- Rim. Cão sintomático naturalmente infectado com *Leishmania (L.) chagasi*. Presença de cilindros hialinos e intenso infiltrado inflamatório mononuclear peritubular e perivascular. H-E. 10x.

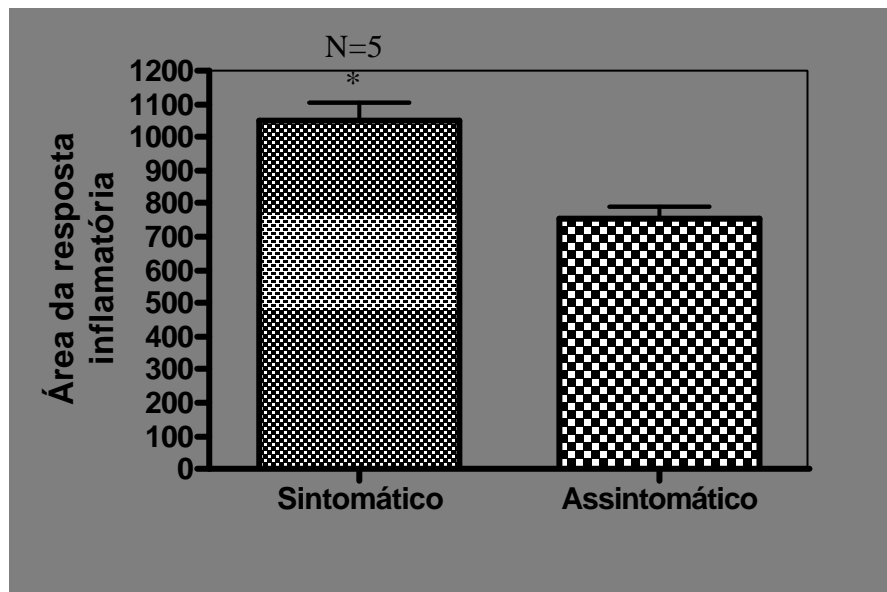


Gráfico 01- Rim. Área de infiltrado inflamatório presente em cães sintomáticos e assintomáticos naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* (Mann Whitney test, * $p < 0.0001$).

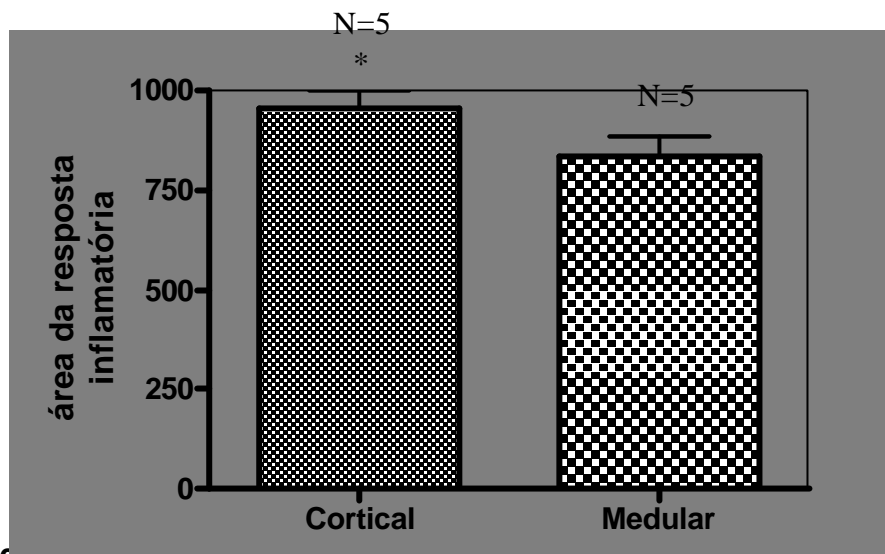


Gráfico 02- Rim. Área de infiltrado inflamatório presente nas regiões cortical e medular de cães sintomáticos e assintomáticos naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* (Mann Whitney test, *p= 0.0012).

A apoptose estava presente em ambos os grupos, sendo mais freqüente nos animais sintomáticos (Figura 1). Nos animais sintomáticos foram observadas 1783 células mesangiais, dessas 1414 (79,30%) encontrava-se em apoptose. Os animais sintomáticos obtiveram um maior índice apoptótico de 67,95%. Nos animais assintomáticos do total de 1963 células analisadas, 1376 (70,10%) células apresentavam pelo menos três características de apoptose.

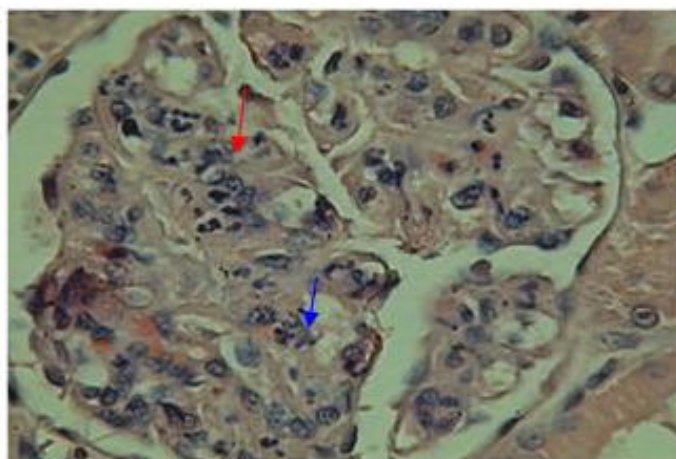


Figura 02- Rim. Cão sintomático. Presença de apoptose em células glomerulares. Formação de corpos apoptóticos (→) e zeiosis (→). Hematoxilina Eosina. 40x.

CONCLUSÃO

Alterações renais, resposta inflamatória e apoptose ocorrem em cães com Leishmaniose visceral. Nossos resultados sugerem que os animais sintomáticos

possuam maiores lesões renais, uma resposta inflamatória mais intensa quando comparados aos animais assintomáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRES, G.A.; MCCLUSKEY, R.T. Tubular and interstitial renal disease due immunologic mechanism. **Kidney International**, v.7, p. 271-289, 1975.

BLANTZ, R. C.; WILSON, C. B.; GABBAI, F. B. Pathophysiology of acute immune injury. In: Neilson, E. G; Couser, W. G. (Ed.) Immunologic renal diseases. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997, 237-250 / P.

BOHLE, A.; MACKENSEN-HAEN, S.; GISE, H. V. Significance of tubulointerstitial changes in the renal cortex for the excretory function and concentration ability of the kidney: a morphometric contribution. **American Journal of Nephrology**, v.7, p. 421-433, 1987.

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

COSTA, F.A.L. Patologia e imunopatogenia da nefropatia da leishmaniose visceral canina. 2001. 129 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia da universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

COSTA, F.A.L.; GUERRA, J.L.; SILVA, S.M.M.S.; KLEIN, R.P.; MENDONÇA, I.L.; GOTO, H. CD4+ T cells participate in the nephropathy in canine visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v.33, p.1455-1458, 2003.

DAS, M.; MUKHERJEE, S. B.; SHAHA, C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **J. Cell Sci.**, v.114, (Pt 13), p.2461-9, 2001.

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brasil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, p. 1240-1242, 1997.

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

KOOTSTRA, C.J.; SUTMULLER, M.; BAELDE, H.J.; HEER, M.; BRUIJN, J.A. Association between leukocyte infiltration and development of glomeruloesclerosis in experimental lupus nephritis. **Journal of Pathology**, v.184, p.219-225,1998.

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

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

LEE, N.; BERTHOLET, S.; DEBRABANT, A.; MULLER, J.; DUNCAN, R.; NAKHASI, H. L. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Death Differ.**, v. 9, n.1, p.53-64, 2002.

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

NICKOL, A. D.; BONVENTRE, P.F. Immunossuppression associated with visceral leishmaniasis of hamsters. **Parasite Immunology**, v.7, p. 439-49, 1985.

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

WELBURN, S.C.; MAUDLIN, I. Control of Trypanosoma brucei brucei infections in tsetse, Glossina morsitans. **Med. Vet. Entomol.**, v.11, n.3, p.286-9, 1997.