

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Programa de Pós Graduação em Patologia

Adriano Francisco Alves

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ESTUDO HISTOLÓGICO E IMUNO-
HISTOQUÍMICO RENAL COM ÊNFASE NA FIBROPOESE**

Belo Horizonte

2018

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Programa de Pós Graduação em Patologia

Adriano Francisco Alves

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ESTUDO HISTOLÓGICO E IMUNO-
HISTOQUÍMICO RENAL COM ÊNFASE NA FIBROPOESE**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Patologia (área de concentração em Patologia Investigativa)

Orientador: Prof^a. Dr. Wagner Luiz Tafuri

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Héli da Monteiro Andrade

Belo Horizonte - MG

2018

Dedico esse trabalho a Deus, à minha família e a todos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força cotidiana e a vontade de continuar. Por ter me dado uma família que me ama e por me ter feito chegar até o fim.

À minha família, porque sem ela nada disso teria acontecido. Em especial a minha irmã, **Andréa**, que sempre me amou como um filho e a minha sobrinha linda **Gisele**, que sempre me ajuda a relaxar me chamando para brincar por whatsapp.

Ao Phillip, por me ouvir, ser meu porto seguro e tantas vezes ter de carregar cargas comigo as quais nem a ele pertence. Obrigado meu amor!

Aos meus amigos, todos eles, incluindo os da Paraíba (Weversson e Dafne em especial), aos meninos que moram ou moraram comigo, Pedroca, Bárbara, Bruno, Natália, Cris, Wanessa, entre outros. Aos grandes amigos que a UFMG me deu, como a Mayra e principalmente ao grande irmão Ramon que se não fosse a ajuda dele, não só em experimentos, mas principalmente com as coisas cotidianas eu não teria conseguido. Do mesmo modo ao Pedro, Leandro, Lucélia, Tamara, Mirian, Samantha e Larissa. De igual modo a Poliana e a todos os demais amigos dos laboratórios vizinhos. A todos, MUITO OBRIGADO!

Aos meus professores do ensino infantil, especialmente tia Líbia, Niomar, Zélia e Ilka. Aos professores do ensino fundamental e médio, obrigado!

A Universidade Federal da Paraíba, por ter me formado e me tornado apto para o concorrido mercado científico nacional.

À minha turma da graduação, especialmente Sandra, Igor e Priscylla, que sempre me apoiaram perguntando sempre: “Como é que tu aguenta essa vida hein..?!”

Aos meus professores de graduação da UFPB, especialmente Bagnólia, Regina, José Nascimento, Davi Antas (que foi meu professor de patologia e plantou em mim essa maravilhosa semente), Inês, Sandra, Zélia, entre outros.

À minha turma do mestrado, especialmente ao Igor e a Denise por nos motivarmos a continuar no sonho acadêmico.

À minha ex orientadora desde IC até o mestrado, Márcia Regina Piuvezam, por me ensinar a pensar cientificamente e a ter seriedade na demonstração dos resultados.

À minha turma do doutorado por termos passado juntos por todas as dificuldades, em especial a Elisa, a “rainha da neoplasia”. Fui luta, mas já está acabando!!

Ao meu grande orientador, Wagner, por tanto incentivo, motivação, despertar do senso crítico, puxões de orelha e principalmente por depositar em mim tanta confiança. Obrigado por ter me formado. Sei que minha formação com você SEM DÚVIDA, foi a melhor! Você é um orientador excelente e mais que tudo, um amigo! Obrigado.

A minha co-orientadora, Héliida, por sempre me ouvir, me motivar, puxar/arrancar minha orelha, me fazer ver as situações por um outro ângulo e me fazer perceber que cada pessoa tem seu jeito e cada um tem o seu tempo. Obrigado!

Aos integrantes do laboratório, a todos IC's, mestrandos e doutorandos. Especialmente a Fernanda, Débora (rainha das necropsias), Pedro, Leandro, Tamara e ao Igor que me ajudaram de forma pessoal, MUITO OBRIGADO!

A Michele Rodrigues e ao Prof. Dawidson, pelos vários ensinamentos em imuno-fluorescência e microscopia confocal.

A todos os professores do programa, ao colegiado, por tudo o que foi ensinado, especialmente ao Marcelo e a Tatiana. Vocês foram peças fundamentais na minha formação!

Aos funcionários e técnicos do laboratório, em especial a Vânia e Jaque por serem minhas amigas, mães e psicólogas!! A Raquelzinha e Luciana pela ajuda cotidiana quando eu levava uns 300 blocos e queriam me matar!! Kkkkkkk. Obrigado!

Aos meus alunos da graduação, especialmente, das turmas de farmácia, fisioterapia, odontologia e medicina. Obrigado por me fazerem um profissional melhor.

A Cássia que nos ajuda na limpeza deixando sempre um ambiente mais limpo e agradável.

À Universidade Federal de Minas Gerais, pela viabilidade técnica fundamental ao desenvolvimento de minhas atividades.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado à todos!

“Todos nós sabemos alguma coisa, todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso estamos sempre aprendendo” – Paulo Freire.

RESUMO

Os estudos das alterações da matriz extracelular (MEC) na leishmaniose visceral são, sobretudo, aqueles relacionados a deposição de colágeno (fibropoese). Na leishmaniose visceral canina (LVC) há estudos mostrando intensa fibropoese associada à inflamação crônica que se instala em vários órgãos como, pulmões (pneumonite intersticial), baço (esplenite esclerosante granulomatosa), fígado (hepatite granulomatosa), linfonodos (linfadenite granulomatosa) e rins (glomerulonefrites e nefrite intersticial). Todavia, de acordo com a literatura, não há uma caracterização mais detalhada da fibropoese renal, tanto glomerular ou túbulo-intersticial em cães natural ou experimentalmente infectados com parasitos do gênero *Leishmania* da espécie *L. (L.) infantum*. E mais ainda, não há descrição detalhada da anatomiopatológica de rins de cães experimentalmente infectados com *L. (L.) infantum*. No Brasil, o principal agente etiológico da LVC é a espécie *L. (L.) infantum*, mas trabalhos recentes têm demonstrado cada vez mais a participação de outra espécie viscerotrópica: a *L. (L.) amazonensis*. Assim, os objetivos desse trabalho foram os de estudar alguns aspectos anatomopatológicos de rins obtidos de cães naturalmente infectados com *L. infantum* quanto de cães experimentalmente infectados com duas diferentes cepas de *L. infantum* e uma única cepa de *L. amazonensis*, com ênfase especial ao processo da fibropoese. Oitenta e sete amostras de fragmentos de rim emblocados em parafina (acervo) foram assim distribuídas: (1) sessenta e duas amostras de rins de cães, sem raça definida, naturalmente infectados com *L. infantum*, com diagnóstico sorológico e parasitológico positivos, obtidos de Centros de Zoonoses, da região metropolitana de Belo Horizonte, MG, denominado grupo CNI; (2) cinco amostras de rins cães experimentalmente infectados com *L. infantum* cepa MCAN/BR/2002/BH401, na dose de 5×10^7 promastigotas/ml de *L. infantum*, via endovenosa, denominado grupo BH401; (3) onze amostras de rins de cães experimentalmente infectados com *L. infantum* cepa MCAN/BR/2000/BH400, na mesma dose e via do grupo anterior, denominado grupo BH400. (4) cinco amostras de rins de cães experimentalmente co-inoculados com *L. infantum* cepa MCAN/BR/2002/BH401 (BH401) e *L. amazonensis* cepa PH8 (FLA/BR/1967/PH8), denominados grupo Co-inoculados. Os cães desse grupo foram infectados com formas promastigotas de *L. infantum* na dose de $2,5 \times 10^7$ parasitos/ml e de formas promastigotas de *L. amazonensis* na dose de $2,5 \times 10^7$ parasitos/ml, ambas por via endovenosa, em uma única suspensão. A infecção experimental ocorreu aos 11 meses de vida de cada animal para todos os grupos, e o intervalo de tempo da infecção experimental foi de dois anos para os grupos BH401 e co-infectados, e de dezoito meses para o grupo BH400. Todos os animais com exames parasitológicos positivos para *Leishmania* aos 6-8 meses após a infecção, e que se mantiveram positivos até o final do ensaio experimental; (5) quatro amostras de rim de cães da raça Beagle, dois anos e meio de idade, todos com exames sorológicos e parasitológicos negativos para *Leishmania*. A eutanásia desses animais ocorreu juntamente com as dos grupos BH401 e os Co-inoculados. Após análises histológicas pela microscopia óptica convencional, todos os animais, revelaram a fibropoese glomerular e intersticial, em menor ou maior intensidade, associadas respectivamente aos diferentes tipos de glomerulonefrites e a nefrite intersticial crônica. Entretanto, a frequência das lesões foi distinta entres os grupos. A fibrose foi nitidamente mais intensa no grupo BH401, seguido dos animais do grupo CNI. Estudo imuno-histoquímico para investigar alguns aspectos dos mecanismos dessa fibrose foi realizado tendo como alvo marcadores celulares para miofibroblastos (marcadores mesenquimais) como a alfa-actina (α -SMA) e a vimentina. A citocina fator transformador do crescimento do tipo β (TGF- β) e as metaloproteinases (MMPs), enzimas celulares secretadas de forma inativa relacionadas ao remodelamento da MEC, do tipo 2 (MMP-2), 7 (MMP-7) e 9 (MMP-9), foram também investigadas. Novamente, o grupo BH401, seguido dos Co-inoculados, foi o mais marcante para a visualização da expressão de todos esses marcadores quando comparados aos demais grupos. As glomerulonefrites do tipo membranoproliferativas foram mais frequentes nos grupos BH401 (75%) e CNI (75%). As glomerulonefrites do tipo membranosa (mediante diagnóstico diferencial pela prata metenamina de Jones) ocorreram em todos os animais do grupo Co-inoculados e em alguns animais do grupo BH400 (33,3%). As glomerulonefrites do tipo esclerosante apareceram apenas nos animais do grupo BH401 (100%). Estudo morfométrico da celularidade glomerular e deposição de matriz mesangial visualizadas pelas colorações especiais do "periodic acid shiff" (PAS) e o tricromico de Masson confirmaram lesões mais marcantes no grupo BH401. Macrófagos mesangias L1 e CD163 positivos foram visualizados por microscopia confocal preferencialmente no grupo BH401 reforçando os achados descritos. A presença de formas amastigotas intracelulares de *Leishmania*, visualizadas por imuno-histoquímica, foi observada em especial no grupo BH401, seguido do grupo CNI, mas não visualizados no grupo BH400 e nos cães CC. Os resultados confirmam a fibrose renal com marcações intensas para α -SMA, vimentina e TGF-beta, e MMPs, em especial do grupo BH401, indicando ser a cepa MCAN/BR/2002/BH401 uma boa escolha para o estudo das alterações renais no modelo experimental da LVC.

Palavras-chave: LVC, *L. infantum*, Rim, Fibrose.

ABSTRACT

Extracellular matrix (ECM) changes studies, in visceral leishmaniasis, are mainly those related to collagen deposition (fibropoiesis). There are studies in canine visceral leishmaniasis (LVC) showing intense fibropoiesis associated to a chronic inflammation that occurs in various organs such as lungs (interstitial pneumonitis), spleen (granulomatous sclerosing splenitis), liver (granulomatous hepatitis), lymph nodes (granulomatous lymphadenitis) and kidneys (glomerulonephritis and interstitial nephritis). However, according to the literature, there are no renal fibropoiesis detailed studies, either glomerular or tubulo-interstitial renal lesions in dogs naturally or experimentally infected with parasites of the genus *Leishmania*, *L. (L.) infantum* specie. Furthermore, there is no detailed description of the pathological aspects of the kidneys of dogs experimentally infected with *L. (L.) infantum*. In Brazil, the main etiological agent of the LVC is the species *L. (L.) infantum*, but recent works have increasingly demonstrated the participation of another viscerotropic species: *L. (L.) amazonensis*. The objectives of this work were to study some pathological aspects of kidneys obtained from dogs naturally infected with *L. infantum* and from dogs experimentally infected with two different strains of *L. infantum* and a single strain of *L. amazonensis*, with special emphasis on fibrotic process. Eighty-seven specimens of paraffin-embedded kidney fragments were collected as follows: (1) sixty-two kidney samples of adult mongrel dogs, naturally infected with *L. infantum*, with positive serological and parasitological diagnosis, obtained from Centers of Zoonoses of the metropolitan region of the municipality Belo Horizonte, MG, denominated group CNI; (2) five kidney samples of adult Beagles experimentally infected with *L. infantum* strain MCAN / BR / 2002 / BH401 at the dose of 5×10^7 promastigotes/ml of *L. infantum*, endovenous route, denominated group BH401; (3) eleven kidney samples of adult Beagles dogs experimentally infected with *L. infantum* strain MCAN / BR / 2000 / BH400, at the same dose and same route of the previous group, denominated group BH400. (4) five kidney samples of adult Beagles experimentally co-inoculated with *L. infantum* strain MCAN / BR / 2002 / BH401 (BH401) and *L. amazonensis* strain PH8 (FLA / BR / 1967 / PH8), denominated Co-inoculated group. The dogs of this group were infected with promastigote forms of *L. infantum* at the dose of 2.5×10^7 parasites / ml and promastigotes forms of *L. amazonensis* at the dose of 2.5×10^7 parasites / ml, both intravenously, in a single strain. The experimental infection occurred at 11 months of life of each animal for all groups, and the time interval of the experimental infection was two years for the BH401 and co-infected groups, and eighteen months for the BH400 group. All animals with *Leishmania*-positive parasitological examinations at 6-8 months post-infection and remained positive until the end of the experimental trial; (5) four kidney samples from adult Beagle dogs, two and a half years old, all with negative serological and parasitological tests for *Leishmania*, denominated control group (CC). The euthanasia of these animals occurred along with those of the BH401 and Co-inoculated groups. After histological analysis by conventional optical microscopy, all animals revealed glomerular and interstitial fibropoiesis, discrete to intense, associated with different types of glomerulonephritis and chronic interstitial nephritis. However, the frequency of lesions was different between groups. Fibrosis, for example, was markedly more intense in the BH401 group, followed by animals in the CNI group. Immunohistochemical study to investigate some aspects of the mechanisms of this fibrosis was carried out targeting cell markers for myofibroblasts (mesenchymal markers) such as alpha-actin (α -SMA) and vimentin. The cytokine transforming growth factor beta (TGF- β) and metalloproteinases (MMPs), cellular enzymes secreted inactivated related to ECM remodeling, type 2 (MMP-2), 7 (MMP-7) and 9 (MMP-9), were also investigated. Again, the BH401 group, followed by the Co-inoculated group, was the most striking for the visualization of the expression of all these markers when compared to the other groups. Membranoproliferative glomerulonephritis was more frequent in the BH401 (75%) and CNI (75%) groups. Membranous glomerulonephritis (by means of a differential diagnosis of Jones silver metenamine) occurred in all animals of the Co-inoculated group and in some animals of the BH400 group (33.3%). Sclerosing glomerulonephritis appeared only in animals of group BH401 (100%). Morphometrical study of glomerular cellularity and mesangial matrix deposition visualized by the special staining as periodic acid Schiff (PAS) and Masson trichrome confirmed more striking lesions in the BH401 group. Mesangial macrophages, L1 and CD163 positive cells, were visualized by confocal microscopy preferably in the BH401 group reinforcing the described findings. The presence of intracellular amastigotes forms of *Leishmania*, visualized by immunohistochemistry, was observed especially in the BH401 group, followed by the CNI group, but not visualized in the BH400 group and in the CC dogs. The results confirm renal fibrosis with intense labeling for α -SMA, vimentin and TGF-beta, and MMPs, especially the BH401 group, indicating that the MCAN / BR / 2002 / BH401 strain is a good choice for the study of renal LVC experimental model.

Key-words: LVC, *L. infantum*, kidney, Fibrosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotomicrografia de fragmento renal dos cães do grupo controle corados em H&E	49
Figura 2	Fotomicrografia de fragmento renal dos cães com Glomerulonefrite membranoproliferativa	53
Figura 3	Fotomicrografia de fragmento renal dos cães com Glomerulonefrite membranosa	54
Figura 4	Fotomicrografia de fragmento renal dos cães do grupo Co-inoculado com lesão congênita	55
Figura 5	Fotomicrografia de fragmento renal dos cães com Glomeruloesclerose	56
Figura 6	Fotomicrografia de fragmento renal dos cães do grupo controle corados em PAS	58
Figura 7	Fotomicrografia de fragmento renal dos cães nas diferentes condições experimentais corados em PAS	59
Figura 8	Fotomicrografia de fragmento renal dos cães corado em Vermelho congo	61
Figura 9	Fotomicrografia de fragmento renal dos cães nas diferentes condições experimentais corados em tricrômico de Masson	63
Figura 10	Fotomicrografia de fragmento renal dos cães nas diferentes condições experimentais corados em tricrômico de Masson	64
Figura 11	Fotomicrografia de fragmento renal dos cães nas diferentes condições experimentais corados pela prata metenamina de Jones	68
Figura 12	Região Tubulo-intersticial renal de cães nas diferentes condições experimentais	75
Figura 13	Fotomicrografia de parênquima renal de cães nas diferentes condições experimentais corados em tricrômico de Masson	78

Figura 14	Fotomicrografia de vasos corados em H&E e tricrômico de Masson	82
Figura 15	Fotomicrografia da reação imuno-histoquímica para detecção de formas amastigotas	84
Figura 16	Fotomicrografia da reação imuno-histoquímica para detecção de alfa-actina de músculo liso	86
Figura 17	Fotomicrografia da reação imuno-histoquímica para detecção de vimentina	90
Figura 18	Fotomicrografia da reação de imuno-fluorescência para visualização de células CD163 e L1 positivas	95
Figura 19	Fotomicrografia da reação imuno-histoquímica para detecção do TGF- β	97
Figura 20	Fotomicrografia da reação imuno-histoquímica para detecção de MMP-2	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Especificação e tempo de reação dos anticorpos utilizados segundo padronização do laboratório de patologia das leishmanioses - LPL	43
Tabela 2	Distribuição e classificação das glomerulonefrites nas diversas condições experimentais avaliadas	51
Tabela 3	Distribuição da deposição de matriz extracelular (MEC) glomerular em todas as condições experimentais avaliadas	65
Tabela 4	Distribuição e classificação das lesões túbulo-intersticiais nas diversas condições experimentais	81

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Análise morfométrica referente a deposição da matriz extracelular glomerular	66
Gráfico 2	Escore histológico referente a presença de lesão glomerular	69
Gráfico 3	Análise morfométrica referente a contagem do número de células glomerulares	71
Gráfico 4	Análise morfométrica referente ao tamanho da área glomerular	73
Gráfico 5	Escore histológico referente a presença de lesão túbulo-intersticial	79
Gráfico 6	Análise morfométrica referente a deposição de matriz extracelular túbulo-intersticial	79
Gráfico 7	Escore histológico referente a presença de lesão vascular	83
Gráfico 8	Análise morfométrica referente a positividade da marcação para a alfa-actina de músculo liso	88
Gráfico 9	Análise morfométrica referente a positividade da marcação para a vimentina	91
Gráfico 10	Análise morfométrica referente a positividade da marcação para células CD163 e L1	93
Gráfico 11	Análise morfométrica referente a positividade da marcação para o TGF- β	98
Gráfico 12	Análise morfométrica referente a positividade da marcação para a MMP-2	100
Gráfico 13	Análise morfométrica referente a positividade da marcação para a MMP-7	101
Gráfico 14	Análise morfométrica referente a positividade da marcação para a MMP-9	102

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSA	Albumina em soro bovino
CD	Classe de diferenciação
CEUA	Comitê de ética em uso animal
CNI	Cão naturalmente infectado
DAB	Diaminobenzina
GE	Glomeruloesclerose
GESF	Glomeruloesclerose segmentar focal
GNm	Glomerulonefrite membranosa
GNMP	Glomerulonefrite membranoproliferativa
H&E	Hematoxilina e eosina
HSC	Célula estrelada hepática
ICB	Instituto de ciências biológicas
Ig	Imunoglobulina
IHQ	Imuno-histoquímica
IFAT	Imunofluorescência direta
kDa	Kilodalton
LCD	Leishmaniose cutâneo difusa/anérgica
LCL	Leishmaniose cutâneo localizada
LCM	Leishmaniose cutâneo mucosa
LPL	Laboratório de patologia das Leishmanioses
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LVA	Leishmaniose visceral americana
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
LVH	Leishmaniose visceral humana
Lu.	Lutzomia
MBG	Membrana basal glomerular
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinase
NLP3	Nucleotídeos ligados a domínios ricos em leucina do tipo 3
OPN	Osteopoetina
PAS	Ácido periódico de Schiff
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBS	Solução de tampão fosfato
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
TEM	Transição epitélio mesênquima
TGF- β	Fator transformador do crescimento do tipo β
TGI	Trato gastrointestinal
TIMP	Proteína inibitória tecidual da MMP
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
α -SMA	Alfa actina de músculo liso
μm	micrometro
μm^2	Micrometro quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1- As Leishmanioses	18
1.2- Leishmaniose Visceral Canina (LVC): Alterações Histológicas Renais	19
1.3 - Fibropoese na Leishmaniose Visceral Canina (LVC).....	22
1.4 - Fibrose e seus mecanismos.....	24
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	35
3.1 - Geral	35
3.2 - Específicos.....	35
4. METODOLOGIA	37
4.1 - Animais	37
4.2 - Técnica da Hematoxilina e Eosina – H&E	39
4.3 - Técnica do PAS - <i>Periodic Acid Schiff</i>	39
4.4 – Prata Metenamina de Jones.....	39
4.5 - Técnica do Tricrômico de Masson	40
4.6 – Vermelho Congo	40
4.7 - Técnica da estreptoavidina-peroxidase para detecção de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> nos fragmentos de rins parafinados.....	41
4.8 - Técnica da estreptoavidina-peroxidase para detecção de alfa-actina, vimentina, TGF- β e metaloproteinases 2, 7 ou 9 nos fragmentos de rins parafinados	42
4.9 - Imunofluorescência em microscopia confocal para detecção de células CD163 e/ou calprotectina nos fragmentos de rins parafinados.....	43
4.10 - Análise semi-quantitativa das lesões renais	44
4.11 - Análise morfométrica.....	45
4.12 - Análise Estatística	46
5. RESULTADOS	48
5.1 – Lesões Glomerulares	48
5.2 - Lesões túbulo-intersticiais renais.....	74
5.3- Lesões vasculares arteriolares.....	82
5.4- Parasitismo tecidual renal	84
5.5-Imuno-histoquímica evidenciando dois marcadores celulares mesenquimais: alfa-actina (α -actina) e vimentina	85
5.6 - Imuno-fluorescência evidenciando marcadores de macrófagos glomerulares (CD163 e calprotectina – antígeno L1).....	92
5.7-Imuno-histoquímica para a citocina TGF- β	96

5.8-Imuno-histoquímica para as enzimas da família das metaloproteinases dos tipos 2, 7 e 9.....	99
6.DISSCUSSÃO	106
7.CONCLUSÃO	118
8. REFERÊNCIAS	120
9.ANEXOS	137

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1- As Leishmanioses

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças causadas por várias espécies de protozoários intracelulares obrigatórios, digenéticos, pertencentes ao gênero *Leishmania* (ROSS, 1993), da família *Trypanosomatidae* e a ordem *Kinetoplastida*. Esses parasitos têm como hospedeiros vertebrados susceptíveis, os roedores, marsupiais, canídeos, edentados e primatas (GRIMALDI et al., 1989). Os hospedeiros invertebrados flebotomíneos pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, do gênero *Lutzomyia* em países do Novo Mundo e do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (GRIMALDI e TESH, 1993; LAINSON et al., 1982). Esses parasitos são transmitidos ao hospedeiro vertebrado através da picada do flebotomíneo fêmea infectado que durante o repasto sanguíneo inoculam as formas promastigotas nas camadas superficiais da derme do hospedeiro vertebrado. As formas promastigotas metacíclicas são as que determinam o sucesso na infecção no hospedeiro vertebrado. Essas formas extracelulares flageladas do parasito são rapidamente fagocitadas pelas células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) transformando-se nas formas intracelulares não flageladas denominadas amastigotas (SACKS & KAMHAWI, 2001). As formas amastigotas de *Leishmania*, por sua vez, são as responsáveis pelo espectro clínico da doença no hospedeiro vertebrado (SILVEIRA et al. 2014).

Nas Américas ocorrem a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a Leishmaniose Visceral Americana (LVA). Todavia, ambas as doenças apresentam um grande espectro de manifestações clínicas. A LTA, em geral, apresenta-se na forma de Leishmaniose cutâneo-localizada (LCL), Leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM), Leishmaniose cutâneo disseminada (LCD) e a Leishmaniose Cutânea Difusa ou Anergica (LCA) (SILVEIRA et al. 2014). A LTA é causada por uma ampla variedade de espécies sendo os principais agentes etiológicos a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a *Leishmania (Viannia) guyanensis* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, nessa ordem. No Brasil, as principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L.*

wellcome e *L. migonei*. Infecções por *Leishmania* que causam a LTA foram descritas em várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e eqüídeos). Com relação a este último, seu papel na manutenção do parasito no ambiente doméstico continua indefinido (LAINSON et al., 1987; GRIMALDI & TESH, 2001).

A LVA é uma infecção crônica generalizada e fatal quando não tratada (BITTENCOURT, et. al. 1996) que acomete órgãos ricos em células do SFM como o fígado, baço, medula óssea, rim, pele e Trato Gastrointestinal (TGI). *Leishmania (Leishmania) infantum (syn L. chagasi)* (MAURICIO et al. 2000) é a espécie responsável pelos casos de LVA, possuindo *Lutzomyia longipalpis* como vetor e os cães como reservatórios domésticos (DEANE, 1995).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) tem grande importância epidemiológica, devido à alta prevalência e ao intenso parasitismo cutâneo dos cães, que favorece a infecção do vetor e a transmissão ao homem. O desenvolvimento e progressão da doença nos cães são altamente variáveis. Alguns cães desenvolvem a infecção sintomática, muitas vezes fatal, enquanto outros permanecem assintomáticos, ou desenvolvem um ou poucos sinais clínicos. As anormalidades dermatológicas nos cães sintomáticos são bastante comuns e variáveis quanto à caracterização e extensão como: hiperqueratose, descamações, despigmentações e ulcerações principalmente localizadas no espelho nasal e nas extremidades das orelhas e membros (SOLANO-GALEGO et al., 2011). As lesões encontradas na LVC, com exceção das alterações cutâneas, são similares às descritas na doença humana (KEENAN et al., 1984b). As alterações histológicas são principalmente associadas à hipertrofia e hiperplasia do SFM em órgãos como o baço, fígado, medula óssea, linfonodos, rins, pulmões, tubo gastrointestinal (TGI) e tegumento (GENARO, 1993; TAFURI, 1996, KOUTINAS & KOUTINAS 2014).

1.2- Leishmaniose Visceral Canina (LVC): Alterações Histológicas Renais

As lesões microscópicas renais já descritas, são sobretudo aquelas observadas em cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Ao que parece, existe um amplo espectro de lesões glomerulares e intersticiais independentemente das formas clínicas da doença. Em resumo, as lesões

fundamentais renais podem ser assim enumeradas: (1) glomerulonefrite membranoproliferativa e/ou mesangioproliferativa, focal ou difusa, com pronunciada proliferação celular e alargamento da matriz com consequente reforço da lobulação glomerular; (2) esclerose glomerular e dilatação dos túbulos renais contendo, por vezes, cilindros hialinos; (3) degeneração albuminosa ou gordurosa do epitélio dos túbulos renais; (4) nefrite intersticial crônica com exsudação de células mononucleares de plasmócitos, macrófagos e linfócitos (exsudato plasmohistiolinfocitário); (5) fibrose intersticial crônica; (6) arteríolas com aspecto hialino das camadas subintimal e/ou media devido a exsudação de proteína plasmática ou deposição colágena. (6) deposição de material amiloide nos glomérulos (GEORGE et al., 1976; TAFURI et al. 1989, MARCUSSEN et al. 1989; TAFURI et al. 2001; COSTA et al. 2003; ARESU et al. 2008; COSTA et al. 2010; COIMBRA et al. 2013; RIGO et al. 2013; ESCH et al. 2015; ABBEHUSEN et al. 2017),

CIANCIOLO et al. (2016), autor que usaremos para classificar as lesões glomerulares caninas neste trabalho, propôs uma classificação para as doenças glomerulares caninas em estudo utilizando a microscopia de luz, imunofluorescência e microscopia eletrônica de 89 biopsias de rins obtidas de cães com histórico de proteinúria (os autores consideraram 114 histológicos parâmetros sob todas as técnicas usadas), classificando-as como:

(1) Glomerulonefrite Membranoproliferativa (GNMP), também chamada de mesângiocapilar, histologicamente caracterizada por espessamento de alças capilares (membrano) e aumento da celularidade do tufo (proliferativa) e também da matriz mesangial. Há aumento global e difuso do volume glomerular e da celularidade (hipercelularidade) dos tufos, por proliferação das células mesangiais. Em consequência, essa hipercelularidade frequentemente aparece associada à expansão da matriz mesangial que confere aos glomérulos nítida acentuação da lobulação (os tufos glomerulares se destacam uns dos outros à maneira de folhas de trevo). Associa-se também a interposição do mesângio e, por vezes, depósitos de imunoglobulinas entre o endotélio e a membrana basal glomerular, formando uma nova membrana basal junto ao endotélio. Então, a nova membrana basal é mais facilmente evidenciada nas alças periféricas por meio das colorações especiais do PAS e impregnação pela prata metenamina

de Jones. Interessante observar também nessa lesão, a presença de raros neutrófilos (2-5) no interior dos vasos glomerulares.

(2) Glomeruloesclerose Segmentar e Focal (GESF) caracteriza-se histologicamente pela expansão segmentar da matriz mesangial, que se cora pela PAS e pela prata metenamina de Jones, além de acúmulo de proteínas plasmáticas em forma de depósitos hialinos. Em alguns casos a lesão causa obstrução da luz capilar podendo formar aderências capsulares ou sinéquias. De acordo com COSTA, *et al.*, (2003) a GESF na Leishmaniose visceral canina (LVC) ocorre preferencialmente nos glomérulos justamedulares em áreas onde os lumens capilares estão colapsados. ARESU, *et al.*, (2012), por sua vez, descrevem que durante a evolução da GESF surge esclerose global de um número cada vez maior de glomérulos;

(3) Glomerunefrite Crescêntica ou crescente caracterizada histologicamente pelo acúmulo de células no espaço de *Bowman*, dispondo-se em forma de “meia-lua” ou circunferencialmente ao tufo capilar. De início migram as células epiteliais parietais proliferadas, monócitos e macrófagos, sendo pouca migração de linfócitos ou neutrófilos. Ocorrem em seguida acúmulo de fibroblastos e deposição de colágeno, resultando nas chamadas “crescentes fibróticas”;

(4) Nefropatia membranosa ou glomerulonefrite membranosa (GNm) caracterizada histologicamente pelo espessamento difuso e uniforme da parede capilar glomerular. A microscopia eletrônica revela que esse espessamento é causado, em parte, pela formação de depósitos subepiteliais entre a membrana basal. Pela prata metenamina de Jones observamos o chamado padrão em cúpula ou espícula diagnosticado pela coloração. Com a progressão da doença, essas espículas fecham-se sobre os depósitos imune, incorporando-os à Membrana Basal Glomerular (MBG). Como em outros casos de síndrome nefrótica, os pedicelos apresentam-se obliterados. Com o progredir da doença, os depósitos incorporados podem eventualmente desaparecer, formando cavidades na MBG. A deposição progressiva de matriz na membrana basal glomerular induz o espessamento da membrana basal, fazendo com que o glomérulo possa sofrer esclerose. A imunofluorescência mostra depósitos granulares típicos de imunoglobulinas (IgG e IgM) e complemento (fragmentos do fator 3 do complemento – C3) ao longo da MBG;

(5) Glomerulonefrite Esclerosante caracterizada histologicamente por intensa proliferação da matriz mesangial e obstrução da alça capilar (esclerose glomerular). O tufo glomerular toma aspecto hialino, atrófico, hipocelular ou mesmo amorfo e acelular com fibrose acentuada.

Outra lesão frequente renal na LVC é a nefrite intersticial crônica que é caracterizada pelo infiltrado multifocal ou difuso de células do tipo mononucleadas (plasmohistiocitário), mas sem formar granulomas (TAFURI, et. al., 1989; KOUTINAS E KOUTINAS, 2014). Além disso, ESCH et al. (2015), comparando amostras parafinadas de rins de dez cães naturalmente infectados com *L. infantum* oriundas do Brasil e outras amostras de cães com proteinúria, mas não infectados por *Leishmania* nos Estados Unidos, reforçam a presença da fibropoese intersticial seguida da inflamação intersticial.

1.3 - Fibropoese na Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

Os estudos das alterações da matriz extracelular (MEC) na leishmaniose visceral são, sobretudo, aqueles relacionados ao colágeno quer seja no homem (BOGLIOLO, 1956; ANDRADE e ANDRADE, 1966; CORBETT et al., 1993), ou no cão (GIUNCHETTI, 2006; MELO et al., 2008; MELO et al., 2009). Alguns estudos demonstram associação entre alterações da MEC e infecção por *Leishmania*. ABREU-SILVA et al. (2004), por exemplo, trabalhando com camundongos experimentalmente infetados com *L. amazonensis* descreveram a substituição do colágeno do tipo I pelo tipo III na pele dos animais no decorrer da infecção, com alterações da arquitetura normal daquele órgão. A ocorrência do colágeno tipo III também foi demonstrada em granulomas hepáticos de camundongos infectados com *L. donovani* (GOSHI et al., 1999) e em cães naturalmente infectados por *L. infantum* (MELO et al. 2008, 2009). Então, os trabalhos do nosso grupo de pesquisa relacionados a patogenia da LVC (TAFURI et al. 1996 e 2001; LIMA et al 2004) descrevem deposição colagênica nos pulmões (pneumonite intersticial) (GONÇALVES et al. 2003), baço (esplenite esclerosante e parênquima) (SILVA et al. 2013), fígado (cápsula de Glisson e parênquima) (MELO et al 2008; 2009), rins (acometimento de cápsula e tufo glomerulares e interstício) (TAFURI et al. 2001; SILVA et al. 2013), e linfonodos (linfadenite cápsula e parênquima) (LIMA et al. 2004).

Gonçalves, et al. (2003) observaram pneumonite intersticial crônica, produtiva, difusa e intensa em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Nesse estudo os autores descreveram a presença abundante de fibras reticulares no interior dos septos alveolares e de forma mais intensa em cães sintomáticos. As fibras reticulares eram profundamente coradas (coloração da prata amoniaca de Gomori) e formavam estruturas densas emaranhadas. A deposição de fibras reticulares era observada com maior intensidade nas áreas em que o infiltrado inflamatório crônico se mostrava mais intenso, em geral, no septo pulmonar que se apresentava sempre mais espessado quando comparado com os pulmões dos animais controle não infectados por *Leishmania*. Os autores demonstraram ainda uma fibrogênese pulmonar significativa em relação aos animais assintomáticos.

Melo et al. (2008 e 2009) relatam correlação positiva entre carga parasitária tecidual, deposição de colágeno e expressão de fibronectina e laminina em fígados de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.

Souza et al., (2014) correlacionaram um desequilíbrio sorológico e tecidual dos elementos traço (ferro, selênio e cobre) em cães naturalmente infectados. Os autores discutem a fibrose com a intensa deposição desses elementos nos tecidos, em especial o ferro.

Madeira et al, (2016) elucidaram alguns mecanismos da fibrose hepática na leishmaniose visceral canina, demonstrando por imuno-histoquímica intensa expressão do Fator Transformador do Crescimento tipo Beta (TGF- β) mostrando paralelamente a molécula alfa-actina de músculo liso (α -SMA) e vimentina como marcador de ativação das células estreladas hepáticas (HSC) produtoras de colágeno. Todavia, Castro et al, (2018) sugerem que essa fibrose possa ser um processo reversível. O tratamento com o alopurinol inibe a reação inflamatória granulomatosa crônica e conseqüentemente o processo de fibrose hepática na LVC. Os autores discutem a provável inibição da fibropoese induzida pelas células estreladas hepáticas (HSC) evidenciando a menor expressão de alfa-actina, vimentina e TGF- β no fígado dos animais tratados com alopurinol.

1.4 - Fibrose e seus mecanismos

Fibrose pode ser definida como excesso de deposição de componentes da matriz extracelular (MEC), sobretudo do colágeno, de forma localizada ou difusa em órgãos e tecidos, podendo acarretar aumento ou diminuição do volume do órgão, com subversão da sua arquitetura levando ao endurecimento e formação de cicatriz, por exemplo: queloide e a cirrose hepática, etc. Trata-se de uma resposta fisiopatológica comum a muitos tecidos e órgãos submetidos, sobretudo às injúrias crônicas, mas podendo ocorrer nas injúrias agudas. Uma ampla variedade de estímulos, incluindo infecções persistentes, reações autoimunes, respostas alérgicas e insultos químicos, físicos e mecânicos, podem desencadear um processo fibrótico (WYNN, et.al., 2008). Independente da etiologia, as desordens fibróticas possuem, em comum, a persistência do estímulo e conseqüente produção de fatores de crescimento, citocinas fibrogênicas e fatores angiogênicos que estimulam a deposição de componentes da MEC, ocasionando remodelação e destruição da arquitetura tecidual normal (WYNN, 2008; FRIEDMAN, 2004). A composição da MEC resulta do equilíbrio entre a deposição e a degradação de seus componentes. O acúmulo de MEC, que leva à fibrose, ocorre quando a formação excede a degradação. As inflamações crônicas, conseqüência comum das infecções parasitárias, são potentes promotores de formação de matriz extracelular. A remoção da causa diminui a inflamação e a degradação do excesso intersticial, resultando no remodelamento ou restabelecimento do parênquima o mais próximo do normal. Quanto mais jovem for a fibrose, mais rapidamente ela pode ser degradada. Porém, o processo de degradação matricial também pode ocorrer em fibroses de longa duração, entretanto, a passos lentos (ANDRADE et al., 1991; CASTRO, et. al., 2018).

A MEC sofre mudanças quantitativas e qualitativas em sua composição. Recentemente, tem sido descritas as fontes celulares responsáveis pela fibrose, entre elas destacam-se:

1. Miofibroblastos: São células que expressam características morfológicas e moleculares comuns entre fibroblastos e células musculares lisas. Segundo AGHA et al. (2017) os miofibroblastos são populações celulares altamente heterogêneas oriundas de pericitos (células adjacentes aos

vasos sanguíneos), fibroblastos residentes e células derivadas da medula óssea. Segundo ainda esses autores, há controvérsias na literatura a respeito do potencial das células endoteliais e epiteliais originarem esses miofibroblastos. Na verdade, à luz dos conhecimentos atuais, a grande potencial candidata a originar miofibroblastos seriam as chamadas células multipotentes mesenquimais estromais ou mesenquimais ou simplesmente MSCs ("mesenchymal stem cells). Então, miofibroblastos clássicos têm origem mesenquimal e são prontamente ativados por citocinas como o fator transformador do crescimento do tipo Beta 1 (TGF- β 1) e moléculas da MEC, como fibronectina e colágeno do tipo I. O marcador molecular principal dessas células é a alfa actina de músculo liso (α -SMA), proteínas do citoesqueleto celular. Essas formam bandas de miofilamentos denominados "fibras de estresse", críticas em conectar os miofibroblastos a MEC participando nos mecanismos da reorganização e retração da matriz (fechamento da ferida cicatricial).

Vários marcadores bioquímicos e moleculares já descritos são utilizados para caracterização dos miofibroblastos (marcadores mesenquimais): (1) alfa-actina (*α -smooth muscle actin - α -SMA*); (2) colágeno tipo 1 (*Collagen α -1 - Col α 1*); (3) vimentina; (4) proteína específica do fibroblasto (*Fibroblast-specific protein 1 - FSP1*); (5) citoqueratinas (KISSELEVA e BRENER, 2008; HUMPHREYS et al. 2018); (6) antígeno GL1 ("glioma-associated oncogene) (AGHA et al., 2017).

2. Transição Epitélio-Mesenquima (TEM) a qual é definida como a conversão fenotípica de células epiteliais em células com fenótipo mesenquimal. Os pontos-chave da transição incluem quatro eventos: (1) perda de proteínas de adesão, como a E-caderina (BENALI, et. al., 2014); (2) expressão de marcadores mesenquimais, como a vimentina e perda de marcadores epiteliais como as citoqueratinas; (3) Perda da membrana basal e (4) capacidade de invasão da célula (LIU, 2010). Além disso, a TEM classifica-se em três tipos: tipo 1 quando há ocorrência de alterações do fenótipo celular durante o desenvolvimento embrionário e no desenvolvimento de órgãos eventos esses relacionados a fase fetal. A TEM tipo 2 está associado à cicatrização de feridas, regeneração de

tecidos e fibrose de órgãos. A do tipo 3 é encontrada principalmente na biologia de metástase e progressão tumoral (CERVANTES-ARIAS et al., 2013). Mesmo que não tenha em medicina veterinária uma distinção clara entre estes três tipos de TEM, a literatura concorda com esta classificação (BONGIOVANNI et al., 2013).

3. Monócitos / Macrófagos: uma questão antiga é a relação entre fibrócitos e monócitos, com base na observação de que ambos os tipos de células compartilham uma variedade de marcadores de superfície, como CD45, CD11b, CD16 / 32, CD68, complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC) e proteína específica para fibroblastos. Fibrócitos poderiam simplesmente ser uma subpopulação de monócitos ou macrófagos produtores de colágeno, e de fato a produção de vários tipos de colágenos foi encontrada em macrófagos humanos e murinos. Alternativamente, sob a influência de estímulos ambientais e profibróticos, os fibrócitos poderiam desenvolver a partir de monócitos que foram atraídos para locais os quais ocorreram dano tecidual. Mudanças pronunciadas em marcadores de superfície foram observados quando os fibrócitos foram cultivados *in vitro* a partir de culturas de leucócitos humanos ou murinos. Após cultura prolongada, os marcadores hematopoiéticos foram gradualmente perdidos. O conceito de que os monócitos diferenciam em fibroblastos é baseada em experiências de cultura celular com monócitos purificados. Foi demonstrado que as células que expressam marcadores monocíticos, tais como CD14 ou CD11b, desenvolvem-se em fibrócitos sob condições de cultura apropriadas (MACK, et. al., 2014).

Em relação aos processos fibróticos renais os miofibroblastos teriam diversas origens, entre elas: (1) fibroblasto residente, o qual frente a injúria polariza-se diretamente para miofibroblasto; (2) pericitos os quais podem, frente a diversos estímulos, diferenciar-se em um fibroblasto residente ou miofibroblastos clássicos em resposta a diversos estímulos (*turn over* fisiológico) ou frente a estimulação pelo TGF- β 1 em miofibroblastos clássico (HUMPHREYS et al. 2018)

(3) células multipotentes mesenquimais estromais ou mesenquimais ou simplesmente MSCs (mesenchymal stem cells); (4) células endoteliais vasculares peritubulares também estimuladas pelo TGF- β 1 podem diferenciar-se em miofibroblasto e principalmente, células tubulares, as quais teriam um papel na fibrose renal, porém controverso, poderiam diferenciar-se em miofibroblastos clássicos também (MACK. et. al., 2014). Todavia, as principais fontes de miofibroblastos parecem ser mesmo os fibroblastos residentes e as MSCs (Kramman et al., 2015 ; AGHA, et. al. 2017).

Entre as citocinas responsáveis pelo processo de fibrose, destaca-se o TGF- β , o qual é uma proteína homodímera de 25 kDa unida por ligação dissulfeto. Ela apresenta múltiplas funções tanto fisiológicas quanto patológicas relacionadas a processos inflamatórios, apoptose, proliferação e autofagia. O principal sinal pró-fibrótico no rim é desencadeado por essa citocina. Esta existe nas isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, e o aumento crônico de TGF- β 1 correlaciona-se com a progressão da fibrose renal. Exposição das células epiteliais ao TGF- β 1 leva a um consequente aumento da secreção de colágeno, fibronectina e marcadores mesenquimatosos como a vimentina e α -SMA os quais correlacionam-se com as mudanças observadas durante fibrose renal em modelos murinos e humanos (VEGA, et. al., 2016).

Por fim, outra classe de moléculas envolvidas na fibrose são as metaloproteinases (MMPs), as quais compõem uma família de endopeptidases extracelulares definidas por domínios conservados (sem atividade catalítica) e domínios catalíticos (RA e PARKS, 2007). Como família, as MMPs de mamíferos compreendem 25 membros que podem ser secretadas ou estarem ligadas à membrana plasmática. Embora as MMPs tenham sido consideradas como responsáveis principalmente pelo *turnover* e a degradação dos substratos da MEC, hoje são reconhecidos como responsáveis pela mediação de funções cruciais em uma variedade de processos, relacionados à imunidade e ao reparo, como migração celular, ativação de leucócitos, defesa antimicrobiana, processamento de quimiocinas entre outros (PARKS et al., 2004; GILL e PARKS, 2008; MANICONE e MCGUIRE, 2008). O interessante dessa classe enzimática é que a depender do órgão que esteja presente e do tipo de MMP, elas podem assumir diversas funções no processo de fibrose, como a de degradar ou inibir

a degradação da MEC. Entre as moléculas inibidoras das MMPs, estão as proteínas inibitórias teciduais das metaloproteiases (TIMPs), que no tecido são classificadas em 4 tipos: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 (RA e PARKS, 2007). No rim, as principais MMP expressas pelas células tubulares renais são a MMP-2 e a MMP-9. A MMP-2, é constitutivamente expressa em quase todos os tecidos e principalmente por fibroblastos, células endoteliais e epiteliais (VAN DEN STEEN et al., 2003). A expressão de MMP-2 é induzida por pequenos estímulos quando comparada a outras proteases (GIANNANDREA, et. al., 2014). A atividade MMP-2 é rigorosamente regulada por TIMPs; em particular, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 exibem relevante afinidade para a MMP-2 e sua secreção adequada é necessária para uma relação MMP-2 / TIMP balanceada. A MMP-2 é também conhecida como colagenase tipo IV, cliva um vasto repertório de substratos, incluindo citocinas, fatores de crescimento ou receptores. Portanto, a atividade biológica da enzima está associada a uma infinidade de fisiopatologias e processos biológicos como: (i) doenças neoplásicas (ii) doenças cardiovasculares (iii) doenças auto-imunes e (iv) doenças fibrosantes (SBARTELA, et. al., 2012). Os principais substratos dessa enzima seriam o colágeno (tipos: I,IV,V,VII,X,XI e XIV); elastina; fibronectina; osteonectina; laminina-1; MMP-1; MMP-9; MMP-13 (ZITTA, et. al., 2010). No entanto, é importante lembrar que no rim essa enzima apresenta atividade anti-fibrótica (TAKAMIYA, et. al., 2013).

Outra MMP, também expressada no rim é a MMP-9, a qual é fisiologicamente apresentada por algumas células determinando um aumento de expressão dessa enzima em processos inflamatórios. A MMP-9 é induzida por moléculas de adesão, principalmente integrinas ativadas, citocinas e fatores de crescimento. O envolvimento de MMP-9 é descrito para doenças cardiovasculares, respiratórias e auto-imunes, por exemplo: lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, artrite reumatóide, asma, nefrite lúpica, penfigo bolhoso, entre outras. (DU et al., 2008; NOSEWORTHY et al., 2000; PATHAK et al., 2011). Os principais substratos para essa enzima são: colágeno (IV,V,VII,X and XIV); entactina; elastina; fibronectina; osteonectina; plasminogenio; IL-1 β (ZITKA, et. al., 2010). Ao contrário da MMP-2, é importante lembrar que no rim a MMP-9 apresenta atividade pro-fibrótica (TAKAMIYA, et. al., 2013). Outras

MMPs também estão presentes no rim no entanto com menor contribuição no processo de fibrose renal (TAKAMIYA, et. al., 2013).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A patologia renal na LVC é discutida em trabalhos com cães naturalmente infectados com *L. infantum*, desde o início do século 20, época em que os cães foram confirmados como o reservatório doméstico da Leishmaniose visceral humana (LVH) (MORENO E ALVAR, 2002). Em relação aos cães experimentalmente infectados com *L. infantum*, não se encontram trabalhos com descrição detalhada de alterações histológicas renais ou intensas quando presentes, tanto glomerulares como túbulo-intersticiais. Relatos de lesões glomerulares do tipo membranoproliferativas foram descritas por Tafuri et al. (1989), no Brasil, em dois cães experimentalmente infectados com *L. infantum*. Keenan et al. (1984), nos Estados Unidos, descreveram tentativa frustrada de cultivo de parasitos a partir de tecido renal em cães da raça pastor alemão experimentalmente infectados com *L. donovani* embora os cães tenham desenvolvido a doença manifesta. Esses autores propõem o cão como modelo para o estudo da leishmaniose visceral humana (LVH), pois descreveram lesões hepáticas e de órgãos linfóides (baço, linfonodos, medula óssea) compatíveis com a doença humana, mas sem descrição de alteração renal. Por outro lado, Martinez-Moreno (1995) na Espanha, trabalhando com oito animais sem raça definida, descreveram parasitos em tecido renal, mas sem detalhamento histológico. Outros trabalhos com cães experimentalmente infectados não mencionam ou exploraram a anatomia-patológica renal, embora avaliem as funções renais pela patologia clínica (GEORGE, et al., 1976; MARCUSSEN, et al., 1989; NIETO, et al., 1992; COSTA, et al., 2000 e 2003; ARESU, et al., 2008; COSTA, et al., 2010; FERNÁNDEZ-COTRINA et al. 2013; HERNANDEZ et al. 2015; ABBEHUSEN et al. 2017). Sabe-se ainda que a leishmaniose visceral (LV) é uma causa frequente de insuficiência renal dano que evolui para doença crônica progressiva em seres humanos (DE BRITO et al. 1975; WEISINGER et al. 1978; DUTRA et al. 1985; CLEMENTI et al. 2011; ORTIZ et al. 2015), em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) infantum* (GEORGE et al., 1976; MARCUSSEN et al., 1989; MANCIANTI et al., 1989; TAFURI et al. 1989; POLI et al. 1991; NIETO et al. 1992; COSTA et al. 2003; ARESU et al. 2007; RIGO et al. 2013) ou cães experimentalmente infectados por *L. infantum* e/ou *L. donovani*

KEENAN et al., 1989), mas com relatos de alterações histológicas renais mais discretas em casos viscerais espontâneos.

No Brasil, *Leishmania infantum* é a espécie responsável pelos casos de Leishmaniose Visceral Americana (LVA), possuindo *Lu. longipalpis* como vetor e os cães como reservatórios. Enquanto, que a espécie *L. amazonensis* está associada a casos de LTA, transmitidos por *Lu. flaviscutellata*, sendo marsupiais os reservatórios. Apesar disso, Barral et al., (1991) demonstraram que *L. amazonensis* pode causar um amplo espectro de formas clínicas de leishmanioses incluindo a LVA, em um estudo no interior da Bahia. Sherlock (1996) e Savan et al., (2009) sugeriram que *Lu. longipalpis* poderia ter um importante papel na transmissão de *L. amazonensis* entre hospedeiros vertebrados, incluindo a população canina. Trabalhos recentes, como o de Tolezano, et al., (2007) e de Dias et al., (2011) têm demonstrado o desenvolvimento de LVA em cães, causada por *L. amazonensis*, acometendo até mesmo cães de áreas urbanas, nas quais não foram encontrados os vetores típicos dessa espécie. Recentemente, o grupo do laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia (ICB-UFMG), trabalhando com cães de áreas endêmicas para LVA, relataram que de 68 animais com suspeita clínica de LVA, todos positivos na sorologia pelo ELISA e com o isolamento de *Leishmania*, foram encontrados 39% de animais infectados por *L. amazonensis* e 61% infectados por *L. infantum*. Essa porcentagem elevada de animais infectados por *L. amazonensis* mostrou-se acima do esperado, principalmente por ter sido identificada a partir de amostras isoladas de medula óssea indicando visceralização (Dra. Héliada Andrade, informação pessoal).

O território brasileiro é uma das áreas endêmicas de ocorrência de leishmanioses de maior importância no mundo (SARAIVA et al., 2015), apresentando também áreas de sobreposição onde ocorrem casos tanto de LVA causada por *L. infantum* quanto de LTA causada por *L. amazonenses*: região Norte (Pará e Tocantins), região Nordeste (Bahia), região Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2006, 2007). Além disso, estudos *in vitro* demonstram que quando as espécies *L. infantum* e *L. amazonensis*, são cultivadas juntas em um mesmo meio de cultura, *L. amazonensis* tem um maior crescimento muitas vezes inibindo o crescimento de *L. infantum*, o que pode

mascarar a detecção de uma infecção mista (ABDULLAH et al. 1998). Esses dados levantam uma série de questões em relação ao ciclo de *L. amazonensis* e à doença causada por esse parasita. Como é a doença no cão infectado? Quais seriam as características da resposta imunológica dessa infecção nos cães? Em áreas de sobreposição da ocorrência de *L. infantum* e de *L. amazonensis* em caso de coinfeção canina qual infecção prevaleceria?

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 - Geral

Avaliar alguns dos mecanismos da fibrose em amostras de rins de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* e experimentalmente infectados com duas cepas distintas de *Leishmania infantum* e co-inoculados com *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis*.

3.2 - Específicos

1. Analisar lesões glomerulares;
2. Avaliar quantitativamente o número de células e área glomerular renal;
3. Avaliar quantitativamente a deposição de matriz extracelular nos glomérulos;
4. Avaliar lesões túbulo-intersticiais;
5. Avaliar quantitativamente a deposição de matriz extracelular nos túbulos renais;
6. Avaliar as lesões vasculares arteriolares;
7. Realizar análise qualitativa do parasitismo tecidual renal;
8. Realizar análises qualitativas e quantitativas de marcadores celulares;
9. Realizar análises qualitativas e quantitativas de citocinas e enzimas.

METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1 - Amostras

Fragmentos de rins incluídas em parafina foram oriundas do acervo do laboratório de Patologia das Leishmanioses (LPL) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Essas amostras são de cães naturalmente e experimentalmente infectados com *L. infantum* ou co-inoculadas com *L. infantum* e *L. amazonensis*, classificados clinicamente em animais assintomáticos ou sintomáticos, com diagnóstico sorológico e parasitológico positivo.

Todos os procedimentos experimentais adotados neste projeto foram aprovados em conformidade com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal em Pesquisa, e têm aprovação da Comissão de Ética em Uso Animal – CEUA - da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo de número 198/2014.

As amostras de rim foram separadas e classificadas por grupos de animais obedecendo ao seguinte: (1) Cães Naturalmente Infectados (CNI): 62 amostras de rim de cães obtidos dos Centros de Zoonoses, durante inquérito epidemiológico, do município de Ribeirão das Neves, Minas Gerais (MG) (região metropolitana de Belo Horizonte, MG) (39 amostras) e do município de Januária (MG), norte do estado (23 amostras) todos infectados com *L. infantum*, com diagnóstico sorológicos e parasitológicos positivos (2) Cães experimentalmente infectados: 21 amostras parafinadas de rim de cães da raça Beagle, 3 meses de idade, ambos sexos, adquiridos do canil Tad's Henriques, Colombo, Paraná, Brasil, área geográfica não endêmica de leishmaniose visceral. Os cães foram mantidos nos canis do ICB com alimentação e água *ad libitum* e vacinados (raiva, cinomose, hepatite / adenovírus tipo 2, leptospirose e parvovírus). Antes da infecção experimental, amostras de sangue foram coletadas para avaliações sorológicas e nenhum animal mostrou níveis detectáveis de anticorpos anti-*Leishmania*. Esses mesmos cães foram distribuídos em três grupos experimentais:

(a) Grupo BH401 constituído de cinco cães infectados unicamente com *L. infantum* cepa MCAN/BR/2002/BH401. Os cães desse grupo foram inoculados

na dose de 5×10^7 promastigotas/mL de *L. infantum*, via endovenosa. A infecção experimental ocorreu aos 11 meses de vida de cada animal e o intervalo de tempo de acompanhamento da infecção foi de 24 meses;

(b) Grupo BH400 constituído por 11 cães infectados com *L. infantum* cepa MCAN/BR/2000/BH400. Os cães desse grupo foram inoculados com formas promastigotas de *L. infantum* na dose de 5×10^7 parasitos/mL, via endovenosa. A infecção experimental também ocorreu aos 11 meses de vida de cada animal, mas o intervalo de tempo de acompanhamento da infecção foi de 18 meses;

(c) Grupo Co-inoculado formado por 5 cães co-inoculados com as cepas MCAN/BR/2002/BH401(BH401) de *L. infantum* e a cepa PH8 de *L. amazonensis* (FLA/BR/1967/PH8), denominados Co-inoculados. Os cães desse grupo foram infectados com formas promastigotas de *L. infantum* na dose de $2,5 \times 10^7$ parasitos /ml e de formas promastigotas de *L. amazonensis* na dose de $2,5 \times 10^7$ parasitos/ml , via endovenosa, em uma única suspensão. A infecção experimental ocorreu aos 11 meses de vida de cada animal, e o intervalo de tempo da infecção experimental foi de 24 meses.

O diagnóstico sorológico foi confirmado seis meses após a infecção por imunofluorescência indireta (IFAT) (diluição 1:40) e ELISA (densidade óptica 0.100; diluição 1:400) e pela técnica molecular da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). (DE AMORIM et al. 2011) Todos os animais, naturalmente como os experimentalmente infectados foram classificados como sintomáticos segundo (SOLANO-GALLENO) 2011.

Grupo Controle (CC): O grupo controle foi constituído por 4 amostras de rim de cães da raça Beagle, 35 meses de idade de ambos sexos, adquiridos do canil Tad's Henriques, Colombo, Paraná, Brasil, área geográfica não endêmica de leishmaniose visceral. Os cães foram mantidos nos canis do ICB da mesma maneira como descrito. Esses animais também serviram como sentinelas no canil durante o protocolo experimental tendo todos eles PCR negativo para DNA de *Leishmania*. A eutanásia desses animais ocorreu juntamente com as do grupo BH401 e a do grupo Co-inoculado.

É importante ressaltar que o Grupo BH400 foi um ensaio experimental que precedeu os ensaios dos grupos BH401 e Co-inoculados. Esses dois últimos grupos por sua vez ocorreram na mesma época, isto é, simultaneamente.

4.2 - Técnica da Hematoxilina e Eosina – H&E

As amostras de fragmentos de rins incluídos em parafina foram cortadas em micrótomo na espessura de 3µm, montadas em laminas histológicas e desparafinadas em xilol durante 30 minutos, hidratadas em álcoois em concentrações decrescentes por 25 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos, e após, lavadas em água destilada. As amostras então foram tratadas pela hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavadas novamente em água destilada por 5 minutos e novamente coradas pela eosina por 3 minutos e, posteriormente também lavadas em água corrente durante mais 30 segundos. Finalmente as laminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcoois, diafanizadas em xilol, e montadas com Entellan®.

4.3 - Técnica do PAS - *Periodic Acid Schiff*

As amostras de fragmentos de rins incluídos em parafina foram cortadas em micrótomo na espessura de 3µm, desparafinadas em xilol durante 30 minutos, hidratadas em álcoois em concentrações decrescentes por 25 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos, e após, lavadas em água destilada. As amostras então foram tratadas pelo ácido periódico por cinco minutos, lavadas novamente em água destilada e tratadas pelo reativo de Schiff por 10 minutos, posteriormente foram lavadas em água corrente durante mais cinco minutos, contra coradas com Hematoxilina de Harris, lavando-as por mais 5 minutos em água corrente, sendo agora desidratadas em concentrações crescentes de álcoois, diafanizadas em xilol, e montadas com Entellan®.

4.4 – Prata Metenamina de Jones

As amostras de fragmentos de rins incluídos em parafina foram cortadas em micrótomo na espessura de 3µm, desparafinadas em xilol durante 30 minutos, hidratadas em álcoois em concentrações decrescentes por 25 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos, e após, lavadas em água destilada. As amostras então foram tratadas pelo ácido periódico por quinze minutos, lavadas em água destilada, tratadas pelo ácido crômico a 5% por 1 minutos,

lavadas em água corrente. Em seguida foram ainda tratadas pelo bissulfito de sódio a 1% por mais 1 minutos, lavadas em água, e então mergulhadas na solução de prata metenamina em banho maria a 60°C até atingirem coloração caramelo. Posteriormente os cortes histológicos foram tratados pela solução de cloreto de ouro a 0,02%, lavadas em água e então banhadas pela solução de hipossulfito de sódio a 1% por 1 minuto. Ao final desse protocolo foi feito a contra coloração utilizando-se a Hematoxilina de Harris por 40 segundos, lavando-as por mais 5 minutos em água corrente, e então coradas pela eosina por 40 segundo, lavando-as novamente em água corrente por 30 segundos sendo agora desidratadas em dois banhos de álcoois absolutos por 10 minutos cada, diafanizadas em xilol, e montadas com Entellan®.

4.5 - Técnica do Tricrômico de Masson

As amostras de fragmentos de rins incluídos em parafina foram cortadas em micrótomo na espessura de 3µm, desparafinadas em xilol durante 30 minutos, hidratadas em álcoois em concentrações decrescentes por 25 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos, e após, lavadas em água destilada. As amostras então foram tratadas pela hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavadas em água destilada por 5 minutos. Seguiu-se agora o tratamento pela solução do Tricrômio de Masson por 12 minutos com, posterior banho em água corrente durante 2 segundos. O termino desse protocolo encerrou-se na desidratação utilizando-se solução única de álcool absoluto por 15 minutos, diafanizadas em xilol, e montadas com Entellan®.

4.6 – Vermelho Congo

Para esse trabalho utilizou-se tecidos renais parafinados, cortados na espessura de 6-8µm e corados pela técnica de Vermelho Congo. A lâminas histológicas contendo os cortes de rins de todos os cães foram desparafinadas em xilol durante 30 minutos , hidratadas em álcoois em concentrações decrescentes por 3 minutos em cada solução de álcool, totalizando 5 concentrações, e lavadas em água corrente por 5 minutos. Utilizou-se solução de vermelho congo a 1% por um período de 20 minutos, lavadas em água corrente por 2 minutos. Após essa etapa, as lâminas foram tratadas com solução de cloreto de sódio por 20 minuto seguido da contra-coloração pela Hematoxilina de Harris por 1 minuto e lavadas em água destilada por 5 minutos. Por fim, as

laminas foram desidratadas por 5 minutos em 2 soluções de álcool absoluto e montadas em Entellan®.

Todas as análises histológicas foram realizadas em microscópio óptico no aumento de 20 vezes (Olympus Bx50, Olympus co. Japan) com luz polarizada utilizando os filtros U-ANT e U-POT(Olympus U-P530 e U-P110). Para a coloração de vermelho congo utilizou-se como controle positivo da reação cortes parafinados de nervos de casos cedidos gentilmente pelo Centro de Especialidades em Histologia Cajal, Belo Horizonte, MG.

4.7 - Técnica da estreptoavidina-peroxidase para detecção de formas amastigotas de *Leishmania* nos fragmentos de rins parafinados.

As lâminas contendo cortes parafinados de tecidos renais cortados na espessura de 3 µm foram desparafinadas em 2 banhos de xilol por 15 minutos cada, hidratadas em soluções de álcoois decrescentes e submetidas a um banho em PBS (“Phosphate Buffer Saline”-pH 7,2, 0,01M) a 10%. Posteriormente fez-se o bloqueio da peroxidase endógena adicionando-se ao banho de PBS o peróxido de hidrogênio (30 volumes diluída a 4% em PBS), por 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram cobertas com solução de bloqueio (leite em pó desnatado diluído em PBS -12g de leite em 200 mL de PBS). Logo após, o anticorpo primário (soro de cão infectado com *L. infantum* na diluição de 1/50 em PBS-BSA (soro albumina bovina) foi adicionado em quantidade suficiente para recobrir os fragmentos, sendo as lâminas incubadas *overnight* em câmara úmida a 4°C. A seguir, adicionou-se o anticorpo secundário biotinilado (anticorpo biotinilado de cabra anti-coelho e anti-camundongo na diluição de 1/100 (DAKO - LSAB 2 System, Peroxidase – K0675), segundo (Tafari, *et al.*, 2004) sendo as lâminas novamente incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se, então, o complexo estreptoavidina peroxidase seguido de incubação por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. A reação foi revelada utilizando-se solução de Diaminobenzidina (DAB) a 0,024% em PBS acrescida de solução de peróxido de hidrogênio 30 volumes a 0,16% em PBS, por 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente fez-se a lavagem das lâminas em água corrente e contra coloração com hematoxilina de Harris. As lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcoois 70 %, - álcool absoluto), diafanizadas em xilol, e montadas com Entellan®

Para cada bateria de lâminas utilizou-se um controle negativo e um positivo. Como controle negativo, utilizou-se PBS-BSA, em substituição ao anticorpo primário. Como controle positivo foi utilizado uma lâmina com corte histológico de pele de orelha de um cão naturalmente infectado com *Leishmania* com parasitismo cutâneo intenso. A avaliação das amostras foi realizada através da observação presença ou ausência de formas amastigotas no tecido.

4.8 - Técnica da estreptoavidina-peroxidase para detecção de alfa-actina, vimentina, TGF- β e metaloproteinases 2, 7 ou 9 nos fragmentos de rins parafinados.

As lâminas contendo cortes parafinados de fragmentos renais cortados na espessura de 3 μ m foram desparafinadas em banhos de xilol por 15 minutos cada, hidratadas em soluções de álcoois decrescentes e submetidas a um banho em PBS ("Phosphate Buffer Saline"-pH 7,2, 0,01M) a 10%. Posteriormente fez-se a reativação antigênica com solução Trilogy[®] em panela pascal, seguido do bloqueio da peroxidase endógena adicionando-se ao banho de PBS o peróxido de hidrogênio (10 volumes diluída a 4% em PBS), por 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram cobertas com solução de bloqueio (leite em pó desnatado diluído em PBS - 12g de leite em 200 mL de PBS). Logo após, o anticorpo primário correspondente foi utilizado, como mostra a Tabela 1 em quantidade suficiente para recobrir os fragmentos, sendo as lâminas incubadas *overnight* em câmara úmida a 4°C. A seguir, adicionou-se o anticorpo secundário biotilado (anticorpo biotilado de cabra anti-coelho e anti-camundongo na diluição de 1/100 (DAKO - LSAB 2 System, Peroxidase – K0675), sendo as lâminas novamente incubadas em câmara úmida à temperatura ambiente, com tempo de incubação como mostra a tabela 1. A reação foi revelada utilizando-se solução de Diaminobenzidina (DAB) a 0,024% em PBS acrescida de solução de peróxido de hidrogênio 35 volumes a 0,16% em PBS, por 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente fez-se a lavagem das lâminas em água corrente e contra coloração com hematoxilina de Harris. As lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcoois (70 %, - álcool absoluto), diafanizadas em xilol, e montadas com Entellan[®].

Tabela 1: Especificação e tempo de reação dos anticorpos utilizados segundo padronização do laboratório de patologia das leishmanioses – LPL.

Anticorpo	Clone	Tipo	Fabricante	Tempo de incubação no anticorpo secundário
Alfa-actina	1A4	Monoclonal	Dako	1,5 horas
Vimentina	V9	Monoclonal	Dako	1,5 horas
TGF- β	SC146	Policlonal	Santa Cruz	3,0 horas
Metaloproteinase 2	36006	Monoclonal	R&D System	3,0 horas
Metaloproteinase 7	111433	Monoclonal	R&D System	3,0 horas
Metaloproteinase 9	AF911	Policlonal	R&D System	3,0 horas

4.9 - Imunofluorescência em microscopia confocal para detecção de células CD163 e/ou calprotectina (antígeno L1) nos fragmentos de rins parafinados.

Secções de 3 μ m foram obtidas de blocos de parafina representativos de cada caso. Os cortes foram desparafinizados, reidratados e submetidos a recuperação antigênica utilizando solução de Trilogy (Cell Marque, Koclin, CA, USA) através de calor úmido (panela de pressão a 125 $^{\circ}$ C) durante 20 minutos de acordo com as especificações do fabricante. As amostras foram então lavadas em solução de PBS (Phosphate Buffered Saline: PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl e 10 mM phosphate buffer solution, pH 7.4) (Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA), em seguida incubadas em PBS contendo 0.2% de Triton 100-X (Sigma-Aldrich) por mais 20 minutos e bloqueadas em PBS contendo 1% de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich) durante 30 minutos. Os cortes foram incubados por 18 horas (“overnight”) a 4 $^{\circ}$ C, com anticorpo monoclonal para o antígeno calprotectina ou antígeno L1 (1:100, clone MAC387, BIO-RAD, USA), além do anticorpo policlonal para o receptor CD163 (1:100, clone E18684, Spring, USA). Após este período as amostras foram lavadas 3 vezes durante 5 minutos em PBS e posteriormente incubadas com os anticorpos

secundários Alexa Fluor® 488 Goat Anti-rabbit IgG (1:1000, Life Technologies), Alexa Fluor® 555 Goat anti-mouse IgG (1:1000, Life Technologies), e a sonda para núcleo Hoechst 33258 (1g/mL, Life Technologies) durante 1 hora a temperatura ambiente. Após este período as amostras foram lavadas 3 vezes em PBS durante 10 minutos e montadas utilizando a solução Prolong Gold Antifade reagent (Life Technologies).

Os controles negativos foram incluídos em todas as reações apenas omitindo-se os anticorpos primários.

As imagens foram coletadas utilizando microscópio Confocal Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss, Jena, Germany) com objetiva de imersão a óleo de 40x e abertura numérica de 1.3. Em cada caso, coletou-se 30 glomérulos aleatoriamente pelo microscópio descrito para avaliação da positividade de marcação. O software Zen 2 foi utilizado para as análises de fluorescência.

4.10 - Análise semi-quantitativa das lesões renais.

As lesões renais foram descritas e classificadas com ênfase às glomerulonefrites de acordo com (CIANCIOLO, et al., 2016), considerando-se apenas as seguintes formas histológicas de glomerulonefrites: as membranoproliferativas, as membranosas (nefropatia membranosa) e as esclerosantes segmentar ou global. Quanto a intensidade, classificamos como: ausente (0), discreto, com glomerulonefrite em até 25% dos glomérulos avaliados (1), moderado com glomerulonefrite em 50% dos glomérulos avaliados (2) e intenso, com glomerulonefrite em mais de 50% dos glomérulos avaliados (3). Considerando que há mistura das diferentes formas histológicas, isto é, em um mesmo fragmento de rim podemos encontrar mais de um tipo de lesão glomerular, considerou-se todas as formas histológicas presentes em cada caso. Utilizando o critério adaptado de Rigo, et al., (2013) avaliou-se 5 campos em objetiva de 20x com no mínimo 5 glomérulos e até 2 vasos sanguíneos presentes. Para avaliação da fibrose glomerular, utilizou-se o mesmo critério histológico: ausente (0), Fibrose em até 25% dos glomérulos avaliados (1), Fibrose em até 50% dos glomérulos avaliados (2) e Fibrose em 50% ou mais dos glomérulos avaliados (3).

No caso das nefrites intersticiais, fibrose intersticial, degenerações tubulares, presença de material hialino na luz dos túbulos (cristais) além da hipertrofia ou hipotrofia tubulares e ectasia tubular, classificamos da seguinte forma: ausente (0), até 25% do interstício avaliado (1), até 50% dos interstício avaliados (2) e 50% ou mais dos interstício avaliados (3).

As lesões vasculares, especificamente as arterioloescleroses foram classificadas da seguinte forma: ausente (0) ou presente (1).

4.11 - Análise morfométrica

Os cortes histológicos corados pelo tricrômico de Masson e os cortes submetidos a todas às reações imuno-histoquímicas foram visualizados pela objetiva de 40X e digitalizadas 20 imagens aleatórias através do mesmo microscópio e microcâmera, perfazendo uma área total de 281.872 μm^2 de parênquima renal analisado em cada tipo de marcação. A área de fibrose e das marcações imuno-histoquímicas foi calculada através de algoritmos construídos no software KS300. Em cada imagem foram selecionados todos os pixels com tons de azul (tricrômico de Masson) ou marrom (marcação imuno-histoquímica positiva) para a criação de uma imagem binária, processamento digital e cálculo da área em μm^2 (PRATA et al., 2016).

Todas as análises morfométricas foram feitas através do programa KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss (Oberkochen, Germany). Para o cálculo da área glomerular, um corte histológico de rim corado pela H&E de cada caso foi visualizado através da objetiva de 40X do microscópio Olympus (Toquio, Japão) para a digitalização de 20 glomérulos aleatórios através da microcâmera Q-Color3. Todo o interstício renal foi excluído da análise utilizando ferramentas do programa. Todos os tipos de pixels dos glomérulos foram selecionados para a criação de uma imagem binária e cálculo da área em μm^2 . Utilizando as mesmas imagens, todas as células glomerulares foram contadas interativamente utilizando o mesmo programa. A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e a definição das condições de morfometria é a descrita por Caliarì (1997).

4.12 - Análise Estatística

As análises foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prisma versão 5.0. Os testes utilizados para grupos com distribuição paramétrica foram o ANOVA *oneway* seguido do pós teste de *Tukey* e/ou Test t não pareado. Para grupos com distribuição não paramétrica, utilizou-se *Kruskal-Wallis* com pós teste de *Dunns*. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Nessa secção os resultados serão apresentados de acordo com as alterações histológicas preponderantes encontradas: as glomerulonefrites (item 5.1) e as lesões tubulointersticiais (item 5.2)

5.1 – Lesões Glomerulares

Em geral, todos animais infectados apresentaram alterações histológicas compatíveis com as glomerulonefrites variando de tipo e intensidade quando comparado aos animais do grupo CC. Portanto, cães do grupo CC mostraram morfologia preservada confirmada pela integridade da cápsula de Bowman, mensângio e capilares (tufo glomerular), além da ausência de substância no espaço de Bowman (espaço urinário) (Figura 1 A-B).

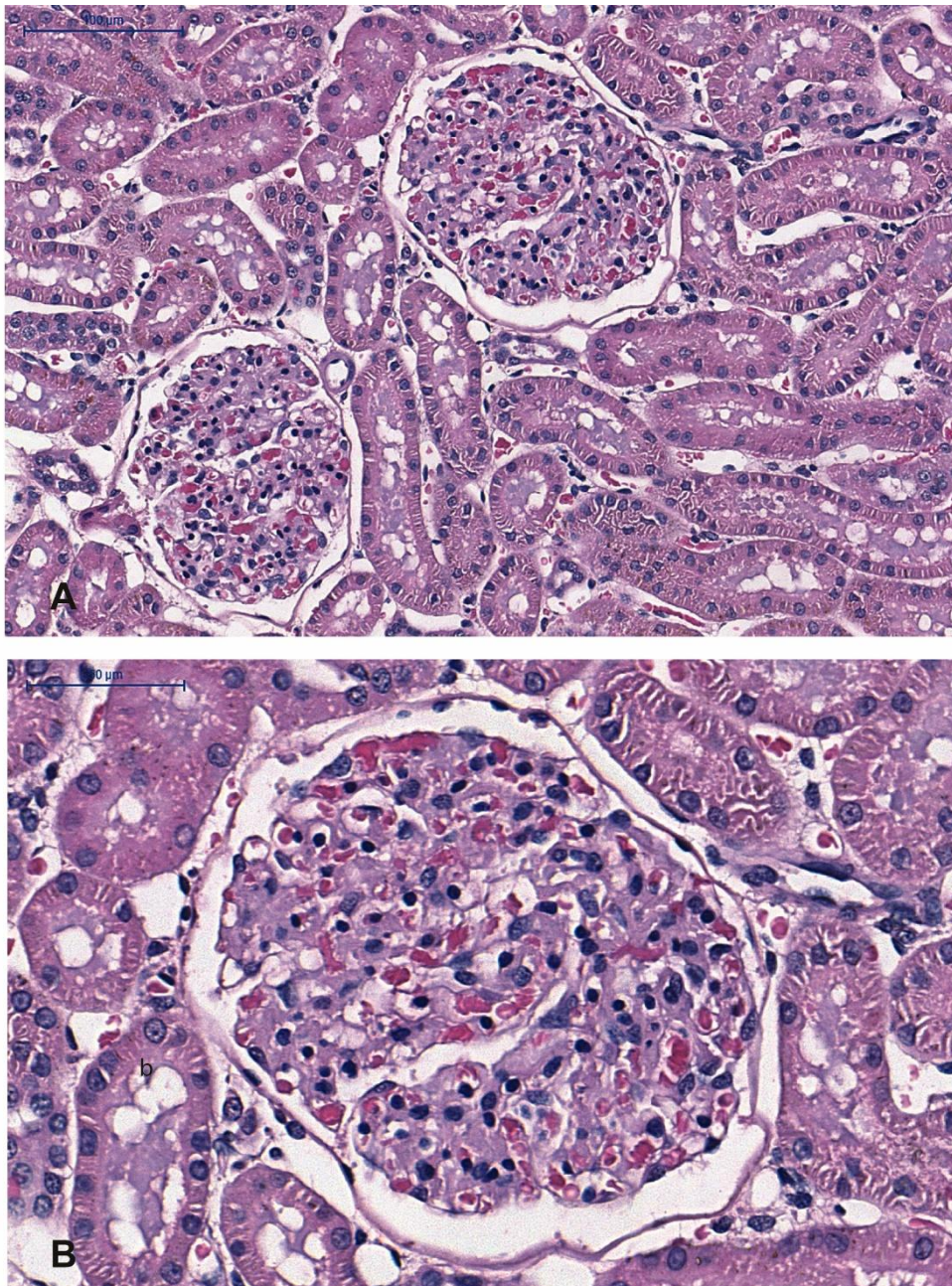


Figura 1: Corte de fragmento renal representativo do grupo controle (CC) corado em Hematoxilina e Eosina (H&E) de padrão histológico normal. A) Região cortical renal. Barra=100µm. B) Detalhe da imagem anterior exibindo glomérulo renal. Barra=50µm.

Em todos os animais infectados os principais tipos de glomerulonefrites encontradas foram as do tipo membranoproliferativo, membranosa e a esclerosante. A Tabela 2 mostra a distribuição e classificação das glomerulonefrites observadas em todas as situações experimentais. Os animais do grupo BH401 tiveram glomerulonefrites em 100 % dos casos, sendo as esclerosantes em maior proporção que as membranoproliferativas. Os animais do grupo BH400, apenas 27,2% apresentaram glomerulonefrites, e quando presentes as mais frequentes foram as do tipo membranoproliferativas seguidas do tipo nefropatia membranosa (Todos os animais Co-inoculados apresentaram glomerulonefrite do tipo nefropatia membranosa). Todos Os animais CNI, também apresentaram glomerulonefrite em 100% dos casos, mas a do tipo membranoproliferativa foi preponderante. Já os animais CC não apresentaram lesão glomerular.

Tabela 2: Distribuição e classificação das glomerulonefrites nas diferentes condições experimentais avaliadas.

Grupo	<i>n</i>	% de casos	Classificação
BH 401	5	100%	Membranoproliferativa– 100%
BH 400	11	27,2%	Membranoproliferativa – 66,6% Nefropatia Membranosa – 33,3%
Co-inoculado	5	100%	Nefropatia membranosa – 100%
CNI	61	100%	Membranoproliferativa (75%) Membranosa (25%)
CC	4	100%	Ausência de lesão glomerular

Tabela 2: Distribuição e classificação das glomerulonefrites nas diferentes condições experimentais avaliadas. Animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 (BH401), animal experimentalmente infectado com a cepa BH400 (BH400), animal experimentalmente inoculados com a cepa BH401 + *L.amazonensis* (Co-inoculado), cão naturalmente infectado (CNI) e cão controle (CC). Para análise, utilizou-se de fragmentos renais corados em Hematoxilina e eosina (HE), Ácido periódico de Schiff (PAS), Vermelho Congo, Tricrômico de Masson ou Prata metenamina de Jones, visto em microscópio óptico comum em objetiva de 20x e 40x.

Os resultados da análise histológica das colorações rotineiras pela HE e as especiais do PAS, vermelho Congo, tricromico de Masson, e a prata metenamina de Jones, serão descritos a seguir com ênfase nas glomerulonefrites seguindo a ordem citada das colorações histológicas empregadas.

Na coloração em HE, a glomerulonefrite do tipo membranoproliferativa, caracterizou-se pela presença de glomérulos expandidos com aumento do número de células mensangiais (macrófagos) e notável aumento da matriz mesangial, conferindo o reforço da lobulação dando aos glomérulos o aspecto de “folha de trevo”. Esse reforço ocorreu devido a presença de macrófagos e da matriz, mas não por células da inflamação ou hiperplasia endotelial. Outra alteração importante foi o espessamento da cápsula de Bowman mediante a hipertrofia e hiperplasia de células epiteliais parietais, fibroblastos e macrófagos da capsula (formação de crescente), não raro em direção ao tufo glomerular. Em consequência houve redução do espaço de Bowman, com o tufo glomerular tocando a mesma (sinéquia), compatível com as glomerulonefrites membranoproliferativas. (Figura 2 A-B). A glomerulonefrite do tipo membranosa foi identificada pela presença de glomérulos com diminuição do número de células mensangiais e ausência da hiper celularidade endocapilar, conferindo ao mensangio o aspecto de “alça”. Notou-se ainda a hiper hipertrofia e hiperplasia dos podócitos, esses acompanhando o folheto visceral da cápsula de Bowman. (Figura 3A -B). Em um cão experimentalmente co-inoculado, além da glomerulonefrite membranosa, observou-se uma lesão peculiar. O tufo glomerular apresentava-se expandido com hiper celularidade mesangial, mas com delicada trama capilar talvez conferindo uma lesão congênita canina. Isso foi notado em mais de 75% dos glomérulos. Ainda nesse caso e nesses mesmos glomérulos, uma deposição moderada de material basofílico, amorfo e acelular nos tufos glomerulares sugerindo áreas de calcificação distrófica foi observada (Figura 4A-C). A glomerulonefrite esclerosante foi evidenciada por glomérulos atróficos, de aspecto eosinófilo (vítreo ou hialino) e com raras células mensangiais hipertrofiadas. A cápsula de Bowman era fundida ao tufo glomerular atrófico (sinéquia) ocupando o espaço urinário característico desse tipo de lesão glomerular (Figura 5A-B).

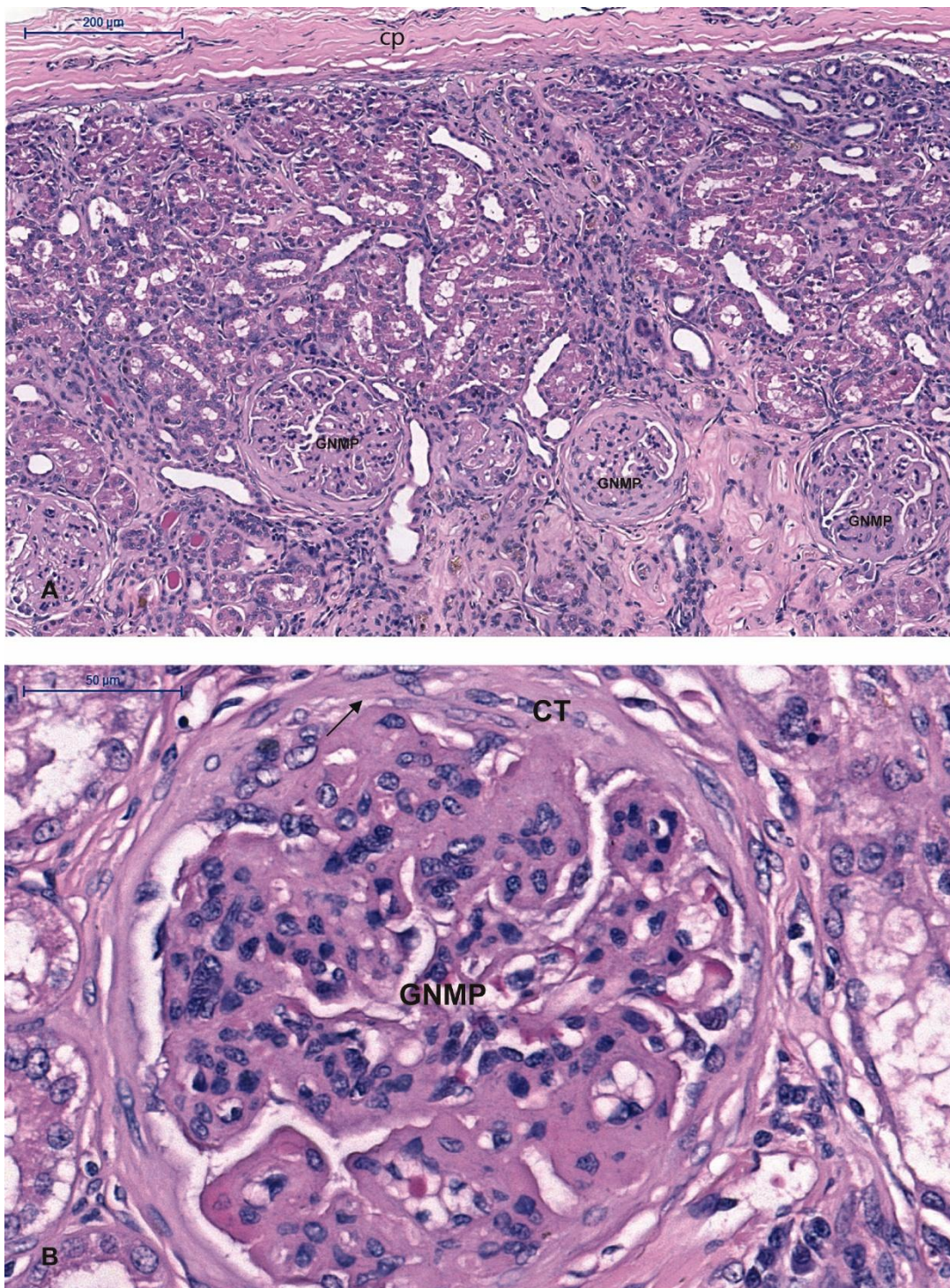


Figura 2: Corte de fragmento renal de cão com glomerulonefrite membranoproliferativa (GNMP) corado em Hematoxilina e Eosina (H&E) A) Área cortical renal exibindo intenso alargamento da cápsula (cp) além de vários glomérulos com GNMP. Barra=200µm. B) Detalhe da imagem anterior exibindo glomérulo renal com GNMP e formação de crescente (CT) e sinéquia (seta). Barra=50µm.

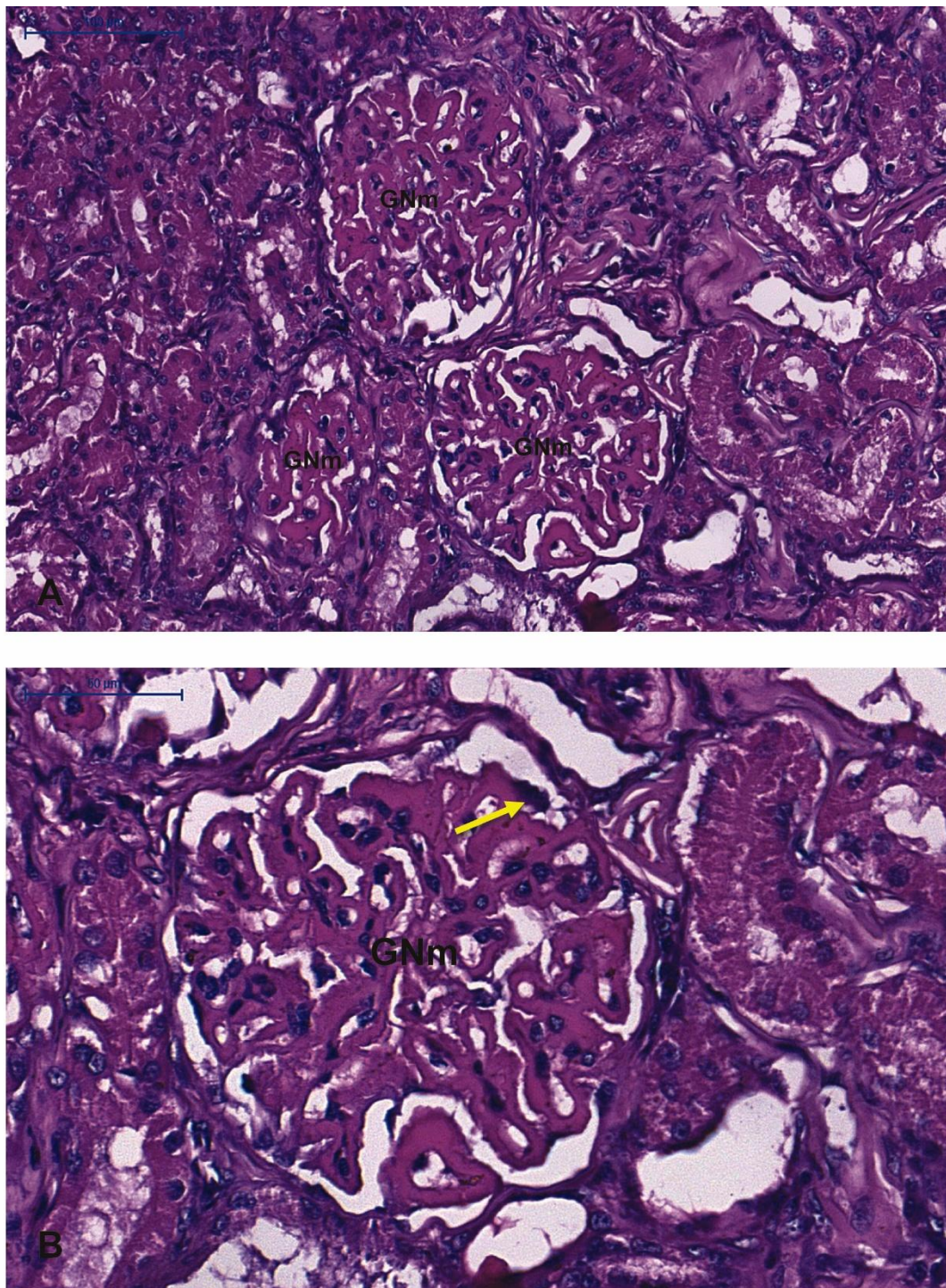


Figura 3: Corte de fragmento renal de cão com glomerulonefrite membranosa (GNm) corado em Hematoxilina e Eosina (H&E) A) Área cortical renal exibindo glomérulos com GNm. Barra=100μm. B) Detalhe da imagem anterior exibindo glomérulos com alargamento das células do folheto visceral, podócitos (seta). Barra=50μm.

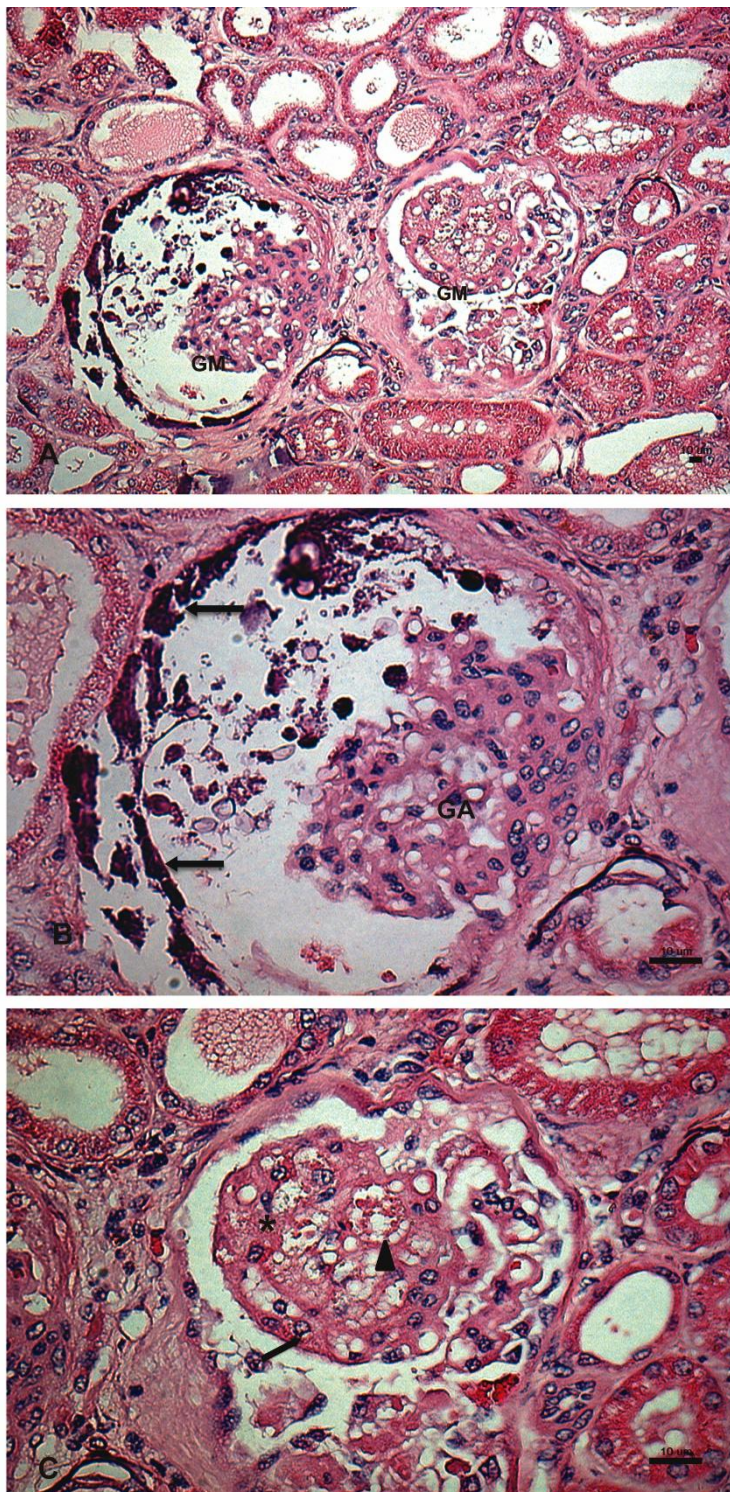


Figura 4: Corte de fragmento renal de cão com lipídose glomerular corado em Hematoxilina e Eosina (H&E)
A) Área cortical renal exibindo glomérulos renais alterados. Barra=10μm. B) Detalhe da imagem anterior exibindo calcificação (seta) com glomérulos atróficos (GA). Barra=10μm. C) Glomérulo renal alterado com lesão caracterizada pela expansão da matriz mensangial (*), hipertrofia do mensangio (seta) e depósito de material lipídico no tufo capilar (cabeça de seta). Barra=10μm.

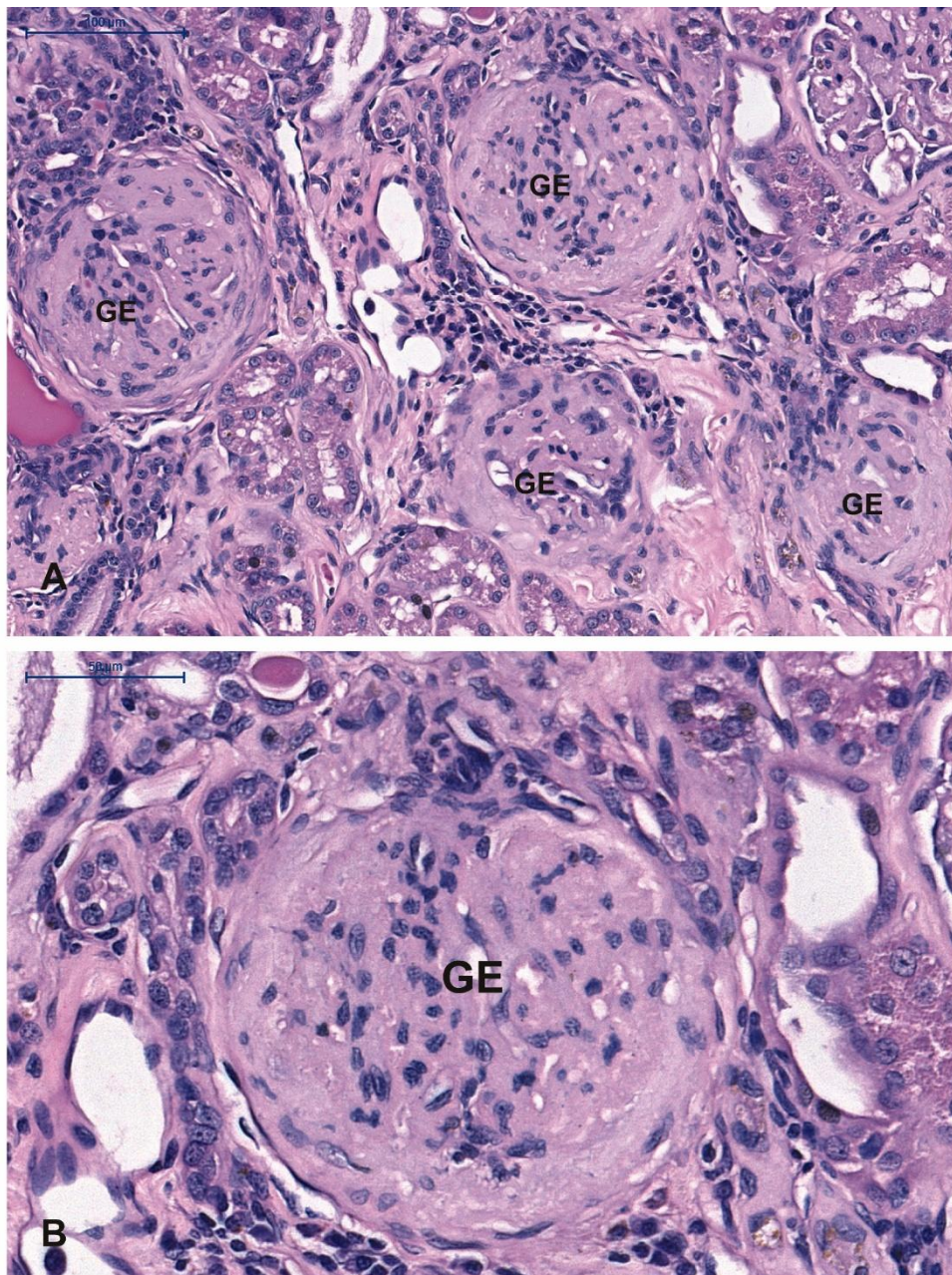


Figura 5: Corte de fragmento renal de cão com glomerulosclerose corado em Hematoxilina e Eosina (H&E)
A) Área cortical renal exibindo vários glomérulos renais esclerosados. Barra=100µm. B) Detalhe da imagem anterior exibindo glomérulos com total oclusão. Barra=50µm.

Na coloração pelo PAS, todos os cães do grupo CC apresentaram glomérulo de aspecto histológico normal com presença discreta de material glicoproteico intersticial (mesangial) distribuído uniformemente, o qual evidenciava, por vezes, a membrana basal dos vasos glomerulares (Figura 6A-B). Nos casos de glomerulonefrites membranoproliferativas observou-se no mesangio glomerular material PAS positivo, de coloração rosina e distribuição multifocal ou difusa, sugerindo deposição de glicoproteínas ácidas da matriz mesangial (Figura 7A-B). Nas glomerulonefrites membranosas houve forte marcação PAS positiva, em todos os casos, sendo o material PAS positivo distribuído de forma difusa (Figura 7C-D). Na forma esclerosante das glomerulonefrites observou-se grande área uniforme e intensa, de coloração PAS positiva, em todo glomérulo (Figura 7E).

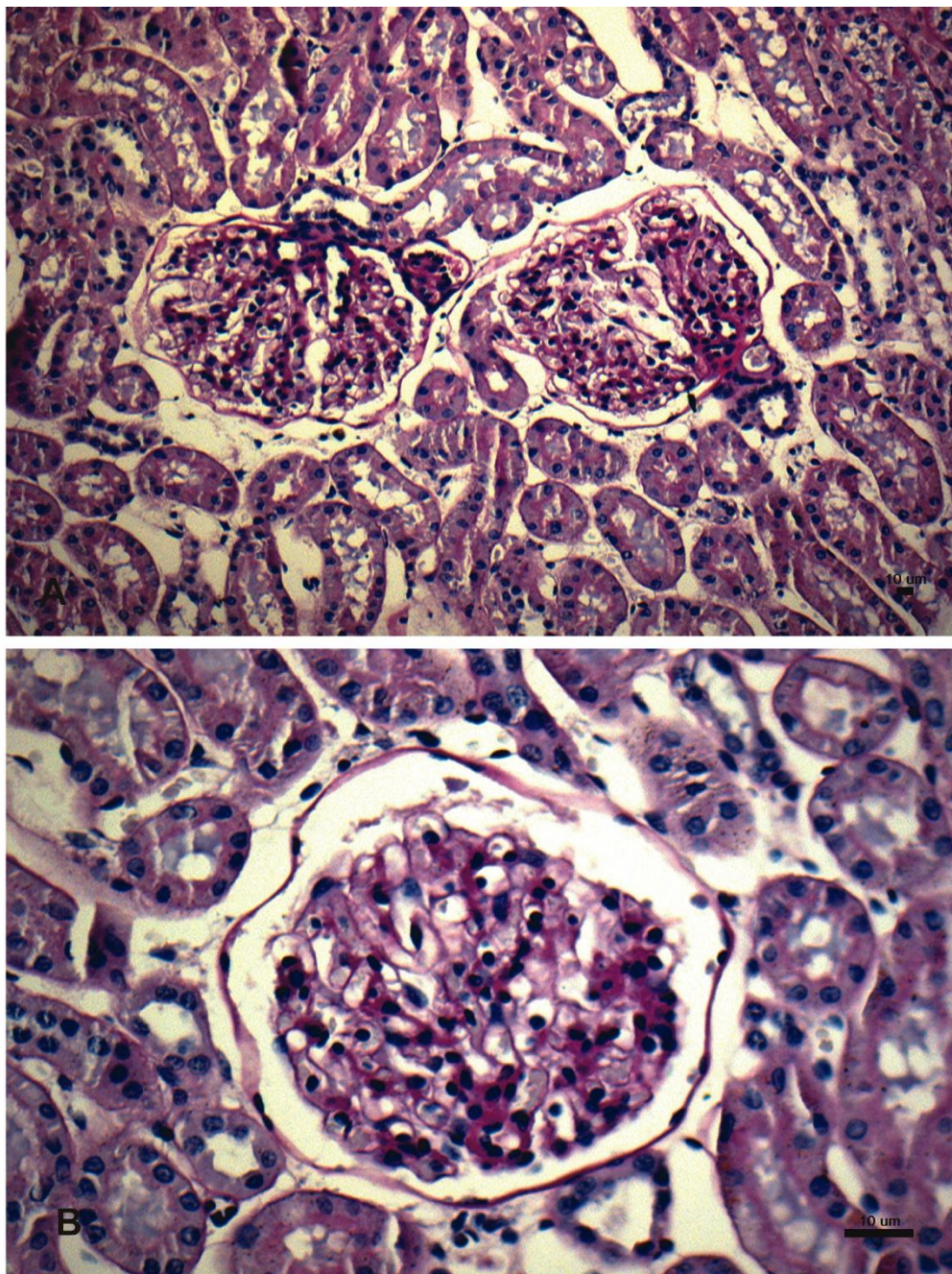


Figura 6: Corte de fragmento renal de cão do grupo controle corado pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS). A) Área cortical renal exibindo glomérulos renais de padrão histológico normal. Barra=10µm. B) Detalhe da imagem anterior exibindo glomérulo renal. Barra=10µm.

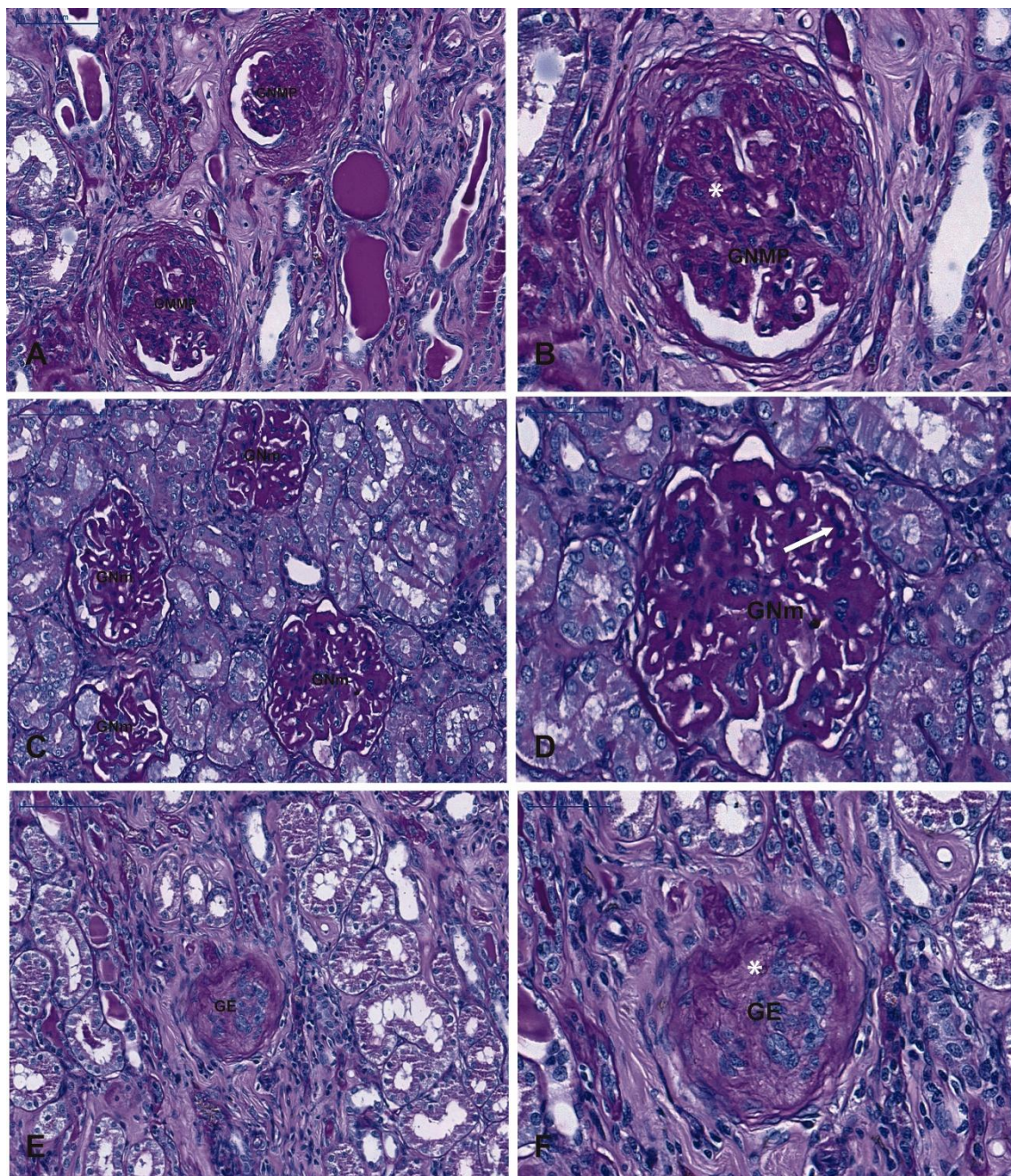


Figura 7: Corte de fragmento renal de cães nas diferentes condições experimentais corados pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS). A) Área cortical renal exibindo glomerulonefrite membranoproliferativa (GNMP). Barra=100 μ m. B) Detalhe da imagem anterior exibindo deposição de material PAS positivo(*). Barra=50 μ m. C) Área cortical renal exibindo glomerulonefrite membranosa (GNm). Barra=100 μ m. D) Detalhe da imagem anterior exibindo alargamento de podócitos (seta). Barra=50 μ m. E) Área cortical renal exibindo glomeruloesclerose (GE). Barra=100 μ m. F) Detalhe da imagem anterior exibindo deposição de material PAS positivo(*). Barra=50 μ m.

Na busca da deposição de proteína amilóide utilizou-se a coloração do vermelho Congo. Nesse trabalho não houve nenhum caso positivo para essa coloração quando comparada a amostra controle para a coloração. O amilóide quando positivo ao vermelho Congo, sob luz polarizada era amorfo, acelular e refrigente em verde musgo (congofílico) (Figura 8 A-B).

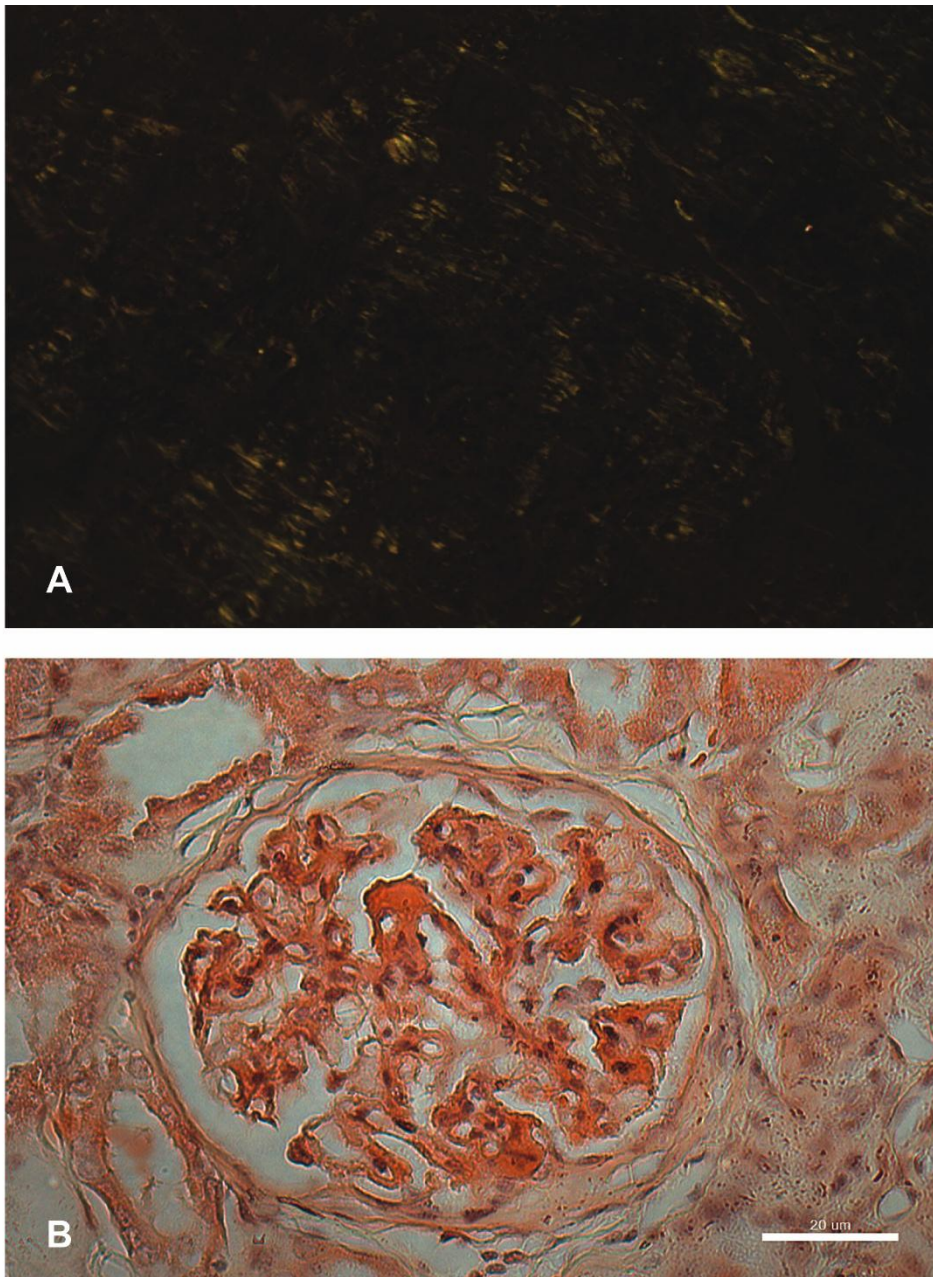


Figura 8: Corte de fragmento renal de cães corados pelo vermelho Congo. A) Lâmina controle para a reação exibindo coloração verde refrigente sob luz polarizada. B) Corte de fragmento renal representativo das situações experimentais avaliadas sem reação positiva para presença de material com caráter amiloide. Barra=20µm.

Na coloração pelo tricrômico de Masson pode-se observar no grupo CC glomérulos de aspecto histológico normal, visualizados pela cor azul com distribuição uniforme e discreta (Figura 9 A-B). Nos casos de glomerulopatia membranoproliferativa os glomérulos eram de coloração azul intenso e distribuição difusa evidenciando também a cápsula de Bowman, diferentemente do grupo anterior (Figura 9 C-D). Já nos casos de glomerulopatia membranosa a coloração azul, apesar de difusa, foi notavelmente menos intensa que a dos animais com glomerulopatia membranoproliferativa. Entretanto, o tricômico de Masson revelou importante alteração histológica sugestiva da deposição de imunocomplexos nos glomérulos afetados. É importante ressaltar que em todos os casos de nefropatia glomerular membranosa (100 % dos cães do grupo co-inoculado e alguns cães do grupo BH400e CNI), notou-se a deposição nas alças capilares de uma substância amorfa, homogênea, de tamanho variado, coloração avermelhada, e aspecto granular, sugestivo de deposição de imunocomplexos (Figura 10A-B) . Nas lesões glomerulares do tipo esclerosante notou-se forte marcação de cor azul intenso em todo glomérulo, indicando grande deposição de matriz extracelular, dando aos mesmos o aspecto de uma única estrutura (glomérulos colapsados) (Figura 10C-D). Análises semiquantitativas e morfométricas reforçam os resultados da Tabela 1 e a descrição histológica descrita anteriormente que podem ser visualizadas na TABELA 3 e no Gráfico 1.

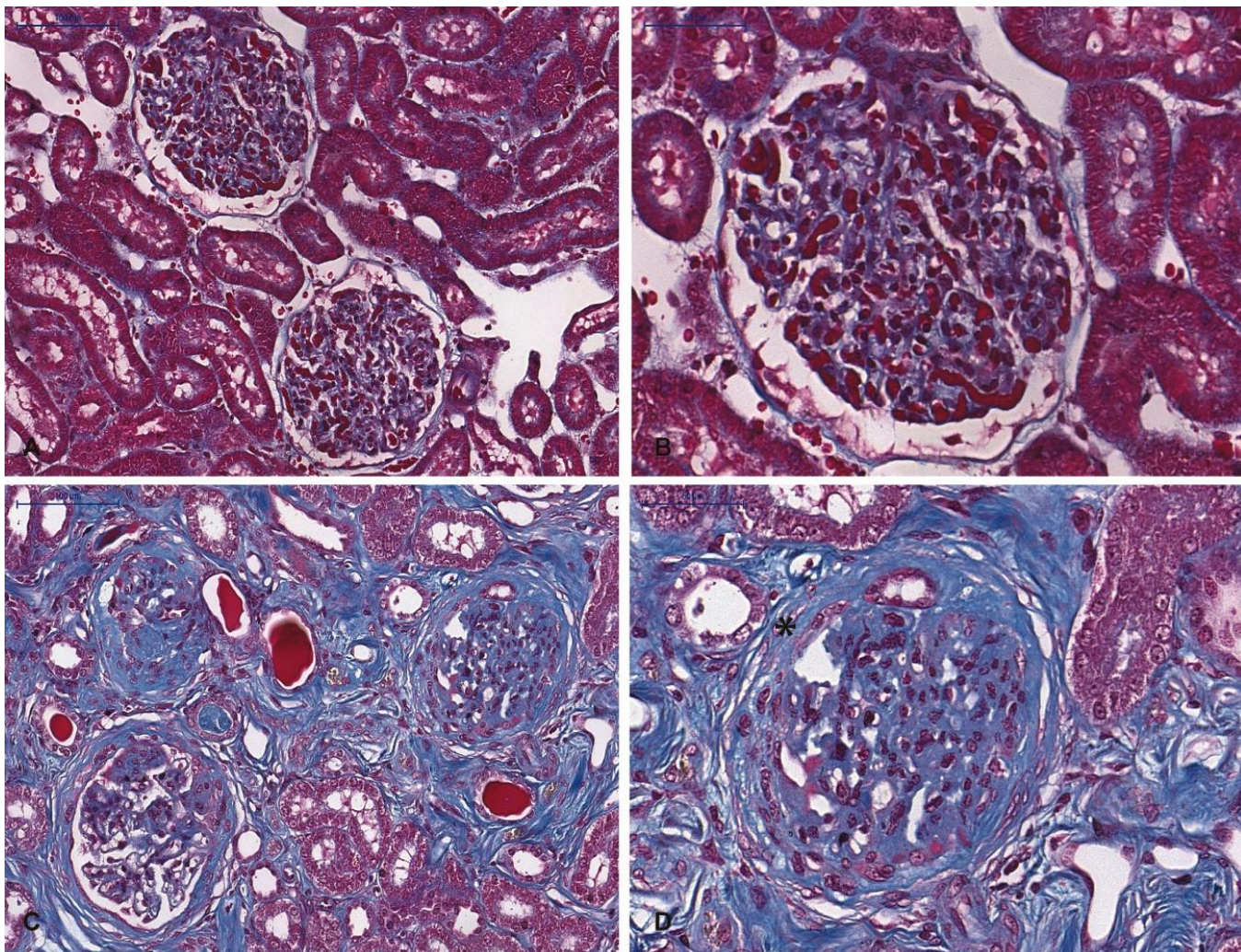


Figura 9: Corte de fragmento renal de cães corados pelo tricômico de Masson. A) Área cortical renal exibindo glomérulo de aspecto histológico normal representativo do grupo CC. Barra=100µm. B) Detalhe da imagem anterior exibindo glomérulo renal sem alteração. Barra=50µm. C) Área cortical renal de cão com glomerulonefrite membranoproliferativa. Barra=100µm. D) Detalhe da imagem anterior exibindo proliferação da matriz extracelular com alargamento da cápsula (*). Barra=50µm.

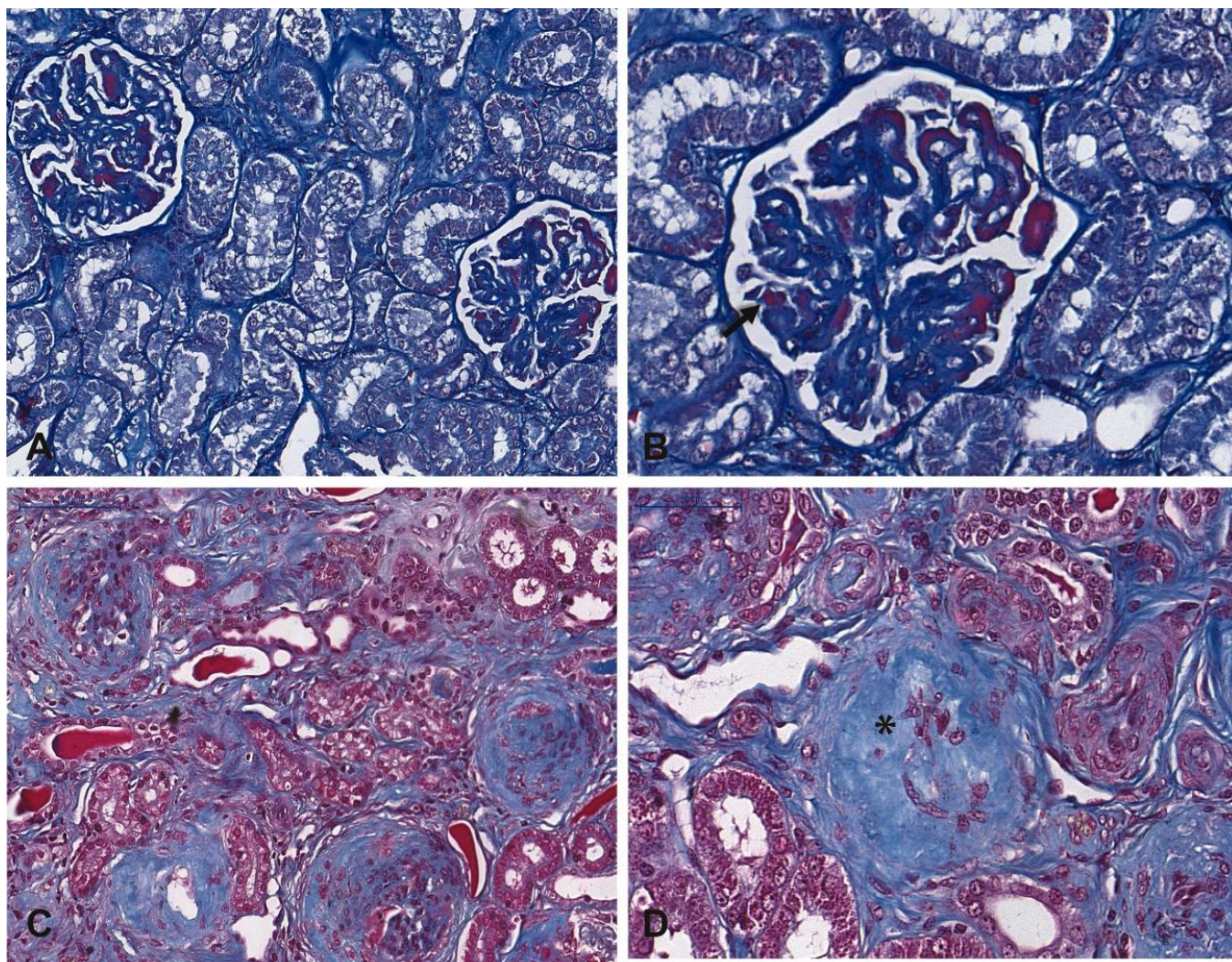


Figura 10: Corte de fragmento renal de cães corados pelo tricômico de Masson. A) Área cortical renal exibindo glomérulo de cães com glomerulonefrite membranosa. Barra=100 μ m. B) Detalhe da imagem anterior exibindo glomérulo renal com depósito eosinofílico sugestivo da presença de imunocomplexos (seta). Barra=50 μ m. C) Área cortical renal de cão com glomerulosclerose. Barra=100 μ m. D) Detalhe da imagem anterior exibindo proliferação da matriz extracelular com intensa fibrose e obliteração glomerular (*). Barra=50 μ m.

Tabela 3: Distribuição da deposição de matriz extracelular (MEC) glomerular em todas as condições experimentais avaliadas.

Grupo	<i>N</i>	% de casos
BH401	5	100%
BH400	11	0%
Co-inoculado	5	100%
CNI	61	100%
CC	4	0%

Tabela 3: Distribuição da deposição de matriz extracelular (MEC) glomerular todas as condições experimentais avaliadas. Animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 (BH401), animal experimentalmente infectado com a cepa BH400 (BH400), animal experimentalmente inoculados com a cepa BH401 + *L.amazonensis* (Co-inoculado), cão naturalmente infectado (CNI) e cão controle (CC). Para análise, utilizou-se de fragmentos renais corados em tricromico de Masson visto em microscópio óptico comum em objetiva de 20x e 40x.

GRÁFICO 1: Deposição da Matriz extracelular (MEC) glomerular em todas as condições experimentais avaliadas

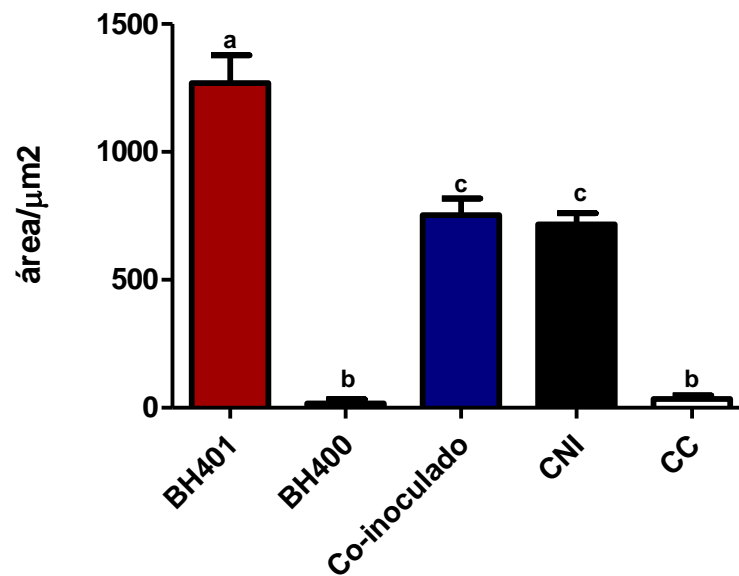


Gráfico 1: Deposição da matriz extracelular (MEC) renal avaliada em todas as condições experimentais. Animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 (BH401), animal experimentalmente infectado com a cepa BH400 (BH400), animal experimentalmente inoculados com a cepa BH401 + *L.amazonensis* (Co-inoculado), cão naturalmente infectado (CNI) e cão controle (CC). Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 5 animais na grupo BH401 e Co-inoculados, 11 animais BH400, 61 animais CNI e 4 animais CC. a *** $p < 0,001$ quando comparada ao b e c. c ** $p < 0,05$ quando comparado ao b. ANOVA “one-way” seguido do pos-teste de *Tukey*.

Para diagnóstico histológico diferencial entre as glomerulonefrites membranoproliferativas e as membranosas empregaram-se, nesse trabalho, a coloração pela prata metenamina de Jones. Nas amostras do grupo CC pode-se notar a discreta marcação de coloração negra no interior do glomérulo, mais precisamente no tufo glomerular (mesângio). Porém, como mencionado, essa marcação foi sempre discreta e mesmo uniforme em todos casos desse grupo (Figura 11A). Já nas nefropatias membranosas (presente em 100% dos casos do grupo co-inoculado e em 33,3% do grupo BH400), a prata metenamina de Jones revelou alteração patognomônica desse tipo de lesão. De fato, foi notável a presença de projeções nas alças glomerulares sobretudo no folheto visceral, essas em direção ao espaço urinário conferindo estruturas denominadas na literatura como “espículas” ou “espinhos” (Figura 11B-C). Por outro lado, no caso das glomerulopatias membranoproliferativas o aspecto foi distinto, mas também patognomônico. Em todos os casos a prata metenamina de Jones revelou o aspecto denominado na literatura de “trilho de trem”, devido a duplicação da membrana basal. (Figura 11D - E).

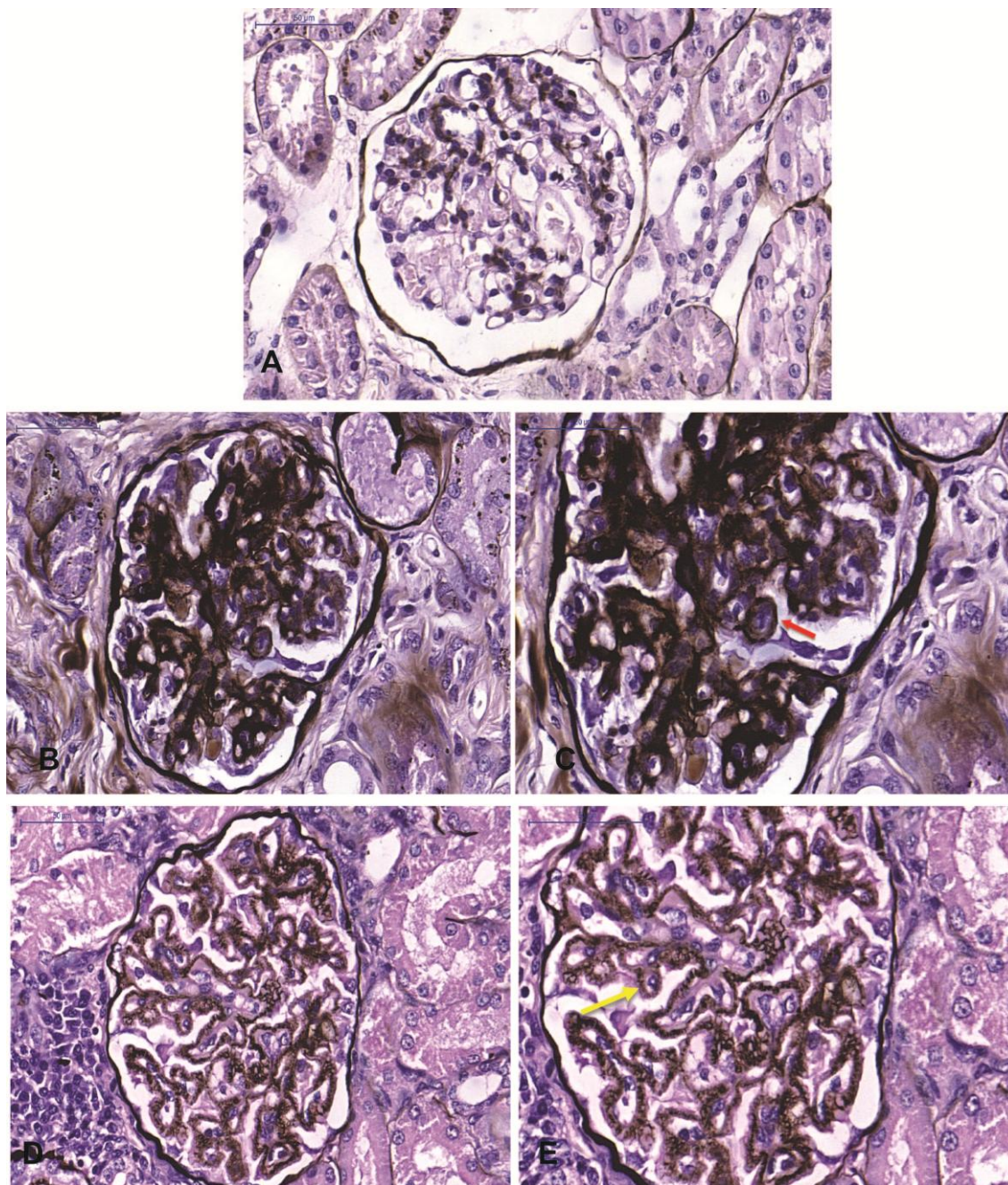


Figura 11: Corte de fragmento renal de cães corados pela prata metenamina de Jones. A) Área cortical renal exibindo glomérulo de aspecto histológico normal representativo do grupo CC. Barra=100 μ m. B) Área cortical renal exibindo glomérulo representativo das amostras com glomerulonefrite membranoproliferativa. Barra=100 μ m. C) Detalhe da imagem anterior exibindo proliferação duplicidade da membrana basal, conferindo aspecto de “trilho de trem” (seta vermelha) Barra=50 μ m. D) Área cortical renal exibindo glomérulo representativo das amostras com glomerulonefrite membranosa. Barra=100 μ m. E) Detalhe da imagem anterior exibindo proliferação da membrana basal em aspecto de “espículas” (seta amarela) Barra=50 μ m.

De forma qualitativa, segundo escore criado, observou-se que todos os animais do grupo BH401, BH400 e CNI tiveram lesões glomerulares intensas, diferente dos animais do grupo BH400, pois apenas alguns animais apresentaram lesões (Gráfico 2)

GRÁFICO 2: Escore histológico referente a presença de lesão glomerular em todas as condições experimentais avaliadas

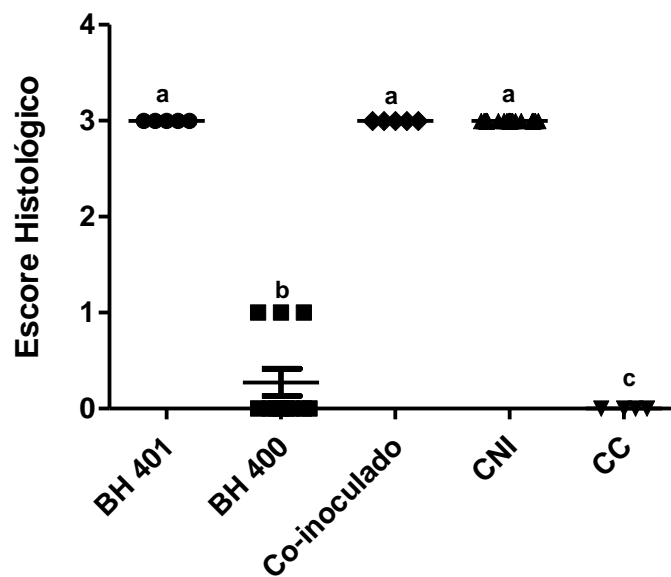


Gráfico 2: Escore histológico referente a presença e intensidade de lesão glomerular em todas as condições experimentais. Animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 (BH401), animal experimentalmente infectado com a cepa BH400 (BH400), animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 + *L.amazonensis* (Co-inoculado), cão naturalmente infectado (CNI) e cão controle (CC). Para análise, utilizou-se de fragmentos renais corados em Hematoxilina e eosina (HE), Ácido periódico de Schiff (PAS), Vermelho Congo, Tricrômico de Masson ou Prata metenamina de Jones, visto em microscópio óptico comum em objetiva de 20x e 40x. Os resultados são exibidos como mediana, com *n* de 5 animais na grupo BH401 e co-inoculados, 11 animais BH400, 61 animais CNI e 4 animais CC. a ****p* < 0,001 quando comparada ao b e c. b ****p* < 0,001 quando comparado a c. Kruskal- Wallis.

Na tentativa de correlacionar as lesões glomerulares com o aumento do número de células ou com a deposição de matriz mesangial, fez-se a contagem do número de células e a medição da área glomerular, por morfometria. Isto pode ser observado no GRÁFICO 3. Os animais do grupo BH401 tiveram aumento significativo do número de células glomerulares quando comparado a todos os demais grupos (BH400, Co-inoculado, CNI ou CC). Já os animais dos grupos BH400, Co-inoculado e CNI, tiveram aumento do número de células glomerulares quando comparado apenas ao grupo CC.

GRÁFICO 3: Número de células glomerulares renais em todas as condições experimentais avaliadas.

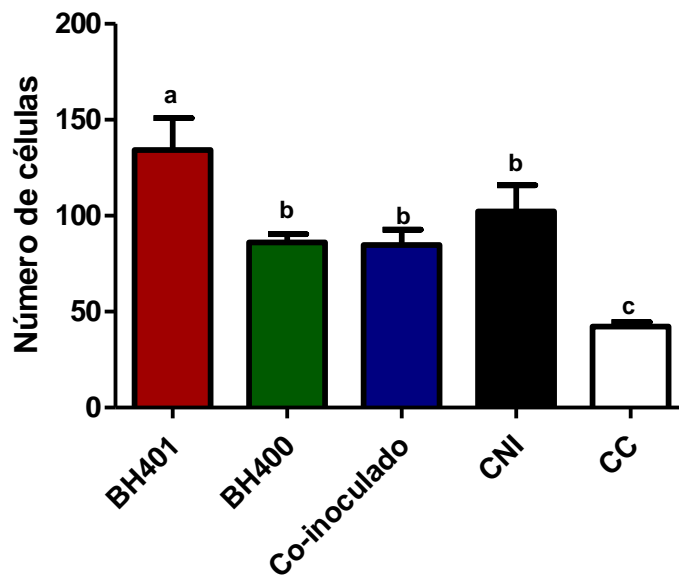


Gráfico 3: Número de células glomerulares contadas em todas as condições experimentais. Cepas BH401, Animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 (BH401), animal experimentalmente infectado com a cepa BH400 (BH400), animal experimentalmente inoculado com a cepa BH401 + *L.amazonensis* (Co-inoculado), cão naturalmente infectado (CNI) e cão controle (CC). Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 5 animais na grupo BH401 e Co-inoculados, 11 animais BH400, 61 animais CNI e 4 animais CC. $a^*p < 0,05$ quando comparada ao b e c. ANOVA “one-way” seguido do posteste de *Tukey*.

O GRÁFICO 4 representa a área glomerular avaliada de forma morfológica nos fragmentos de tecido renal corados em HE. Os animais BH401 apresentaram aumento significativo da área glomerular quando comparado aos animais dos grupos BH400, Co-inoculado, CNI ou CC. Já os animais do grupo BH400 e Co-inoculados, apresentaram aumento significativo da área glomerular quando comparado apenas ao grupo CC. Os animais do grupo CNI apresentaram aumento significativo da área glomerular quando comparado aos grupos BH400, Co-inoculado e CC.

GRÁFICO 4: Área glomerular renais em todas as situações experimentais avaliadas. BH400, BH401, Co-inoculado, CNI e CC.

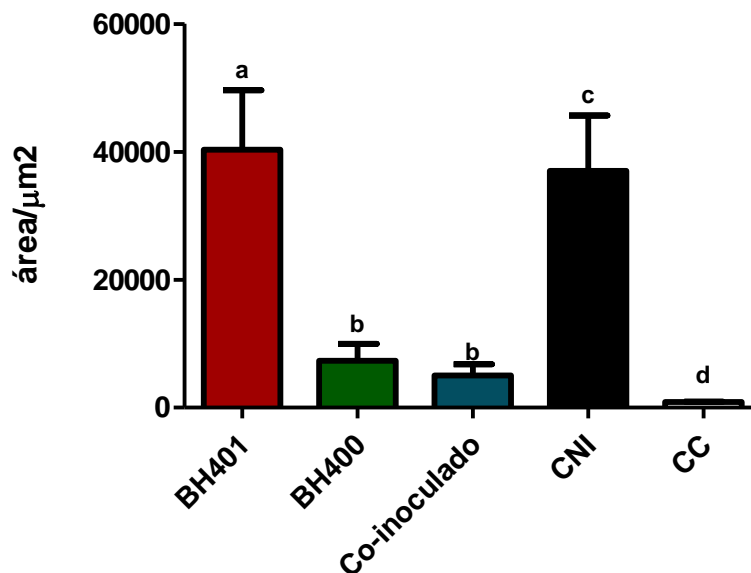


Gráfico 3: Área glomerular renal avaliada em todas as condições experimentais. Animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 (BH401), animal experimentalmente infectado com a cepa BH400 (BH400), animal experimentalmente com a cepa BH401 + *L. amazonensis* (Co-inoculado), cão naturalmente infectado (CNI) e cão controle (CC). Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 5 animais na grupo BH401 e Co-inoculados, 11 animais BH400, 61 animais CNI e 4 animais CC. a ** $p < 0,01$ quando comparada ao b e c. b e c * $p < 0,05$ quando comparado ao d. d * $p < 0,05$ quando comparado ao b e d. ANOVA “one-way” seguido do pos-teste de *Tukey*.

5.2- Lesões túbulo-intersticial renal

Em geral, os fragmentos de rins de todos os cães infectados, mostraram a nefrite intersticial crônica variando de discreta a intensa, focal ou difusa, caracterizada pelo infiltrado plasmohistiolinfocitário. Os linfócitos, na sua maioria, apresentavam citoplasma basofílico e não raro, com a presença das inclusões intracitoplasmáticas acidófilas ou hialinas, homogêneas, compatível aos corpúsculos de *Russel*.

Nessa secção descrevem-se as lesões tubulares seguidas das lesões intersticiais.

A Figura 12 representa a porção tubular renal, corada em HE. Na Figura 12(A) representativa do grupo CC nota-se presença de túbulos com epitélio preservado, sem deposição de material intra-tubular ou células inflamatórias. Já na Figura 12(B) representativa de alguns animais infectados são observados túbulos dilatados (ectásicos) com epitélio planificado e, por vezes, presente no seu interior material de aspecto hialino (cristais hialinos). Nota-se ainda, intensa acidofilia em toda porção tubular com diminuição do número de células tanto epiteliais (atrofia tubular) como intersticial. Pode-se observar também, que os túbulos estão com tamanhos diferentes e com deposição de material de aspecto granular, entretanto com núcleo central, sem perda da afinidade tintorial, sugestivo de degeneração hidrópica. Em alguns casos os capilares mostram-se dilatados e repletos de sangue (hiperemia). Na Figura 12 (C), o infiltrado inflamatório é do tipo mononuclear com distribuição multifocal e intensa com inúmeros plasmócitos e esses como os corpúsculos de *Russel*. Em alguns casos macrófagos, por vezes, formavam células gigantes multinucleadas. Quando presentes as células gigantes tinham citoplasma amplo com seus núcleos distribuídos de forma irregular caracterizando célula gigante do tipo corpo estranho.

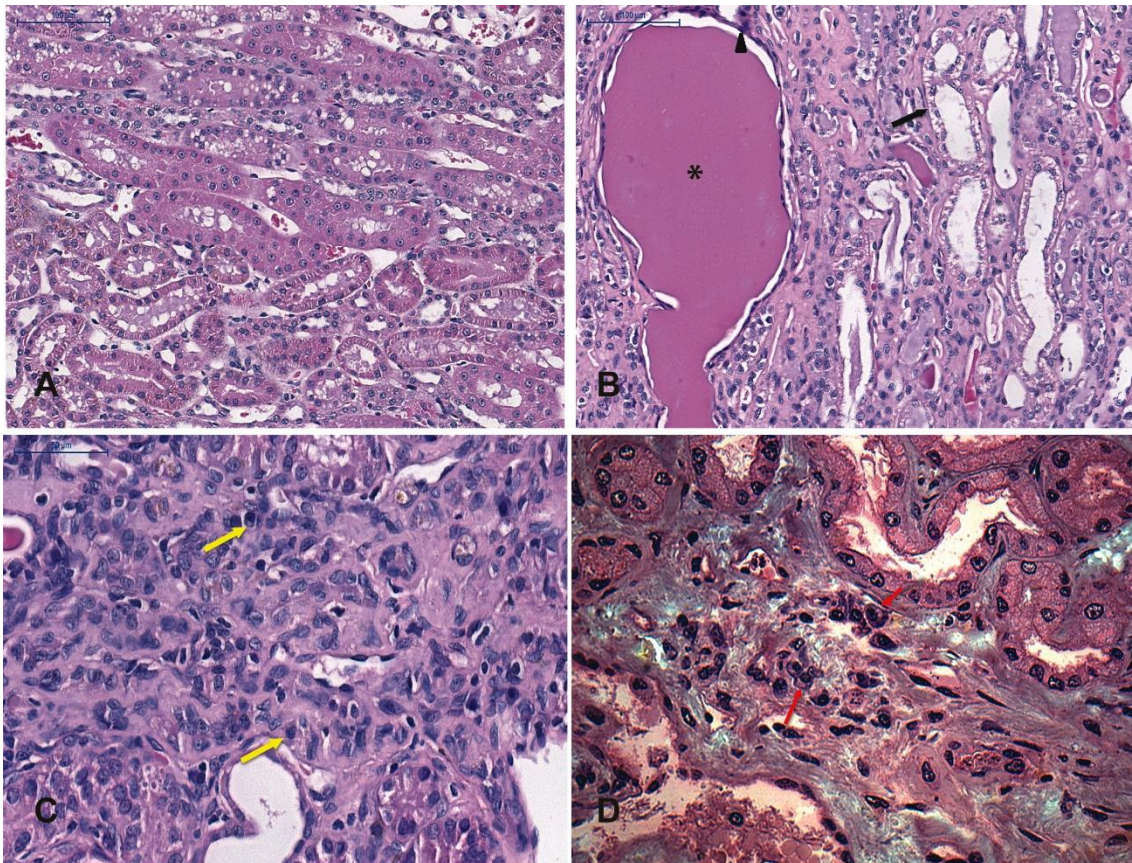


Figura 12: Região tubulo intersticial renal de cães nas diferentes condições experimentais corados pela Hematoxilina e eosina (H&E). A) Zona tubulo-intersticial renal de animais do grupo CC sem alteração histológica. Barra=100 μ m. B) Rim de cão com ectasia tubular e presença de cristal hialino no seu interior (*) exibindo epitélio tubular de aspecto planificado (cabeça da seta) onde alguns túbulos apresentam degeneração (seta preta). Barra=100 μ m. C) Rim de cão apresentado infiltrado de células do tipo mononucleares, especialmente plasmócitos (seta amarela). Bara=50 μ m. D) Maior aumento da imagem anterior exibindo células compatíveis com corpúsculo de Russel (seta vermelha). Barra=50 μ m.

A análise semi-quantitativa das lesões tubulares estão representadas no Gráfico 5, no qual podemos observar que 100% dos animais do grupo BH401, Co-inoculado ou CNI desenvolveram lesões túbulo intersticiais. No grupo BH400, somente alguns animais desenvolveram essa lesão. Já no grupo CC, como esperado, nenhum animal desenvolveu esse tipo de lesão.

GRÁFICO 5: Escore histológico referente a presença de lesão túbulo-intersticial em todas as condições experimentais avaliadas

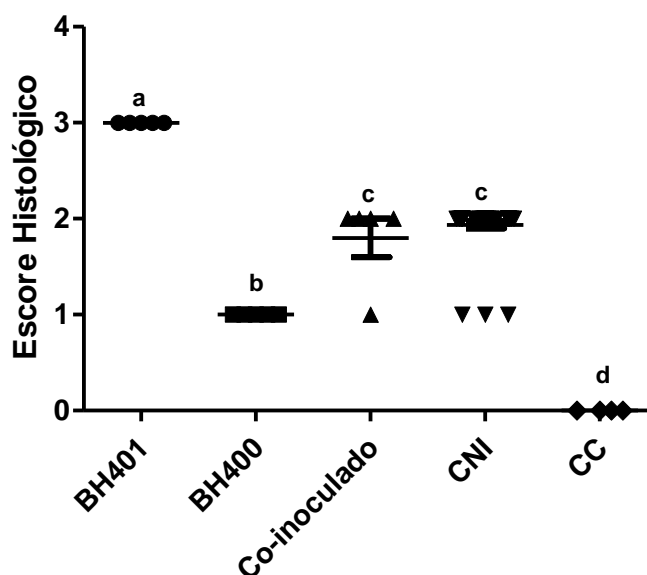


Gráfico 5: Escore histológico referente lesão túbulo-intersticial em todas as condições experimentais. Animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 (BH401), animal experimentalmente infectado com a cepa BH400 (BH400), animal experimentalmente inoculado com a cepa BH401 + *L. amazonensis* (Co-inoculado), cão naturalmente infectado (CNI) e cão controle (CC). Para análise, utilizou-se de fragmentos de tecido renal corados em Hematoxilina e eosina (HE) ou Tricrômico de Masson, visto em microscópio óptico comum em objetiva de 20x e 40x. Os resultados são exibidos como mediana, com *n* de 5 animais na grupo BH401 e Co-inoculados, 11 animais BH400, 61 animais CNI e 4 animais CC. a ****p* < 0,001 quanto comparada ao b e c. b ****p* < 0,001 quando comparado ao grupo b ou d. Kruskal-Wallis.

Concomitante com as lesões tubulares alguns animais infectados mostraram alterações da matriz extracelular intersticial em todo o parênquima renal, cortical e medular de forma difusa. A coloração pelo tricômico de Masson, como mostrada na FIGURA 13(A-B), evidenciou a deposição de matriz intersticial pela coloração azul. Após análise morfométrica os animais do grupo BH401 foram os mais afetados seguidos dos animais Co-inoculados e os CNI (GRÁFICO 6).

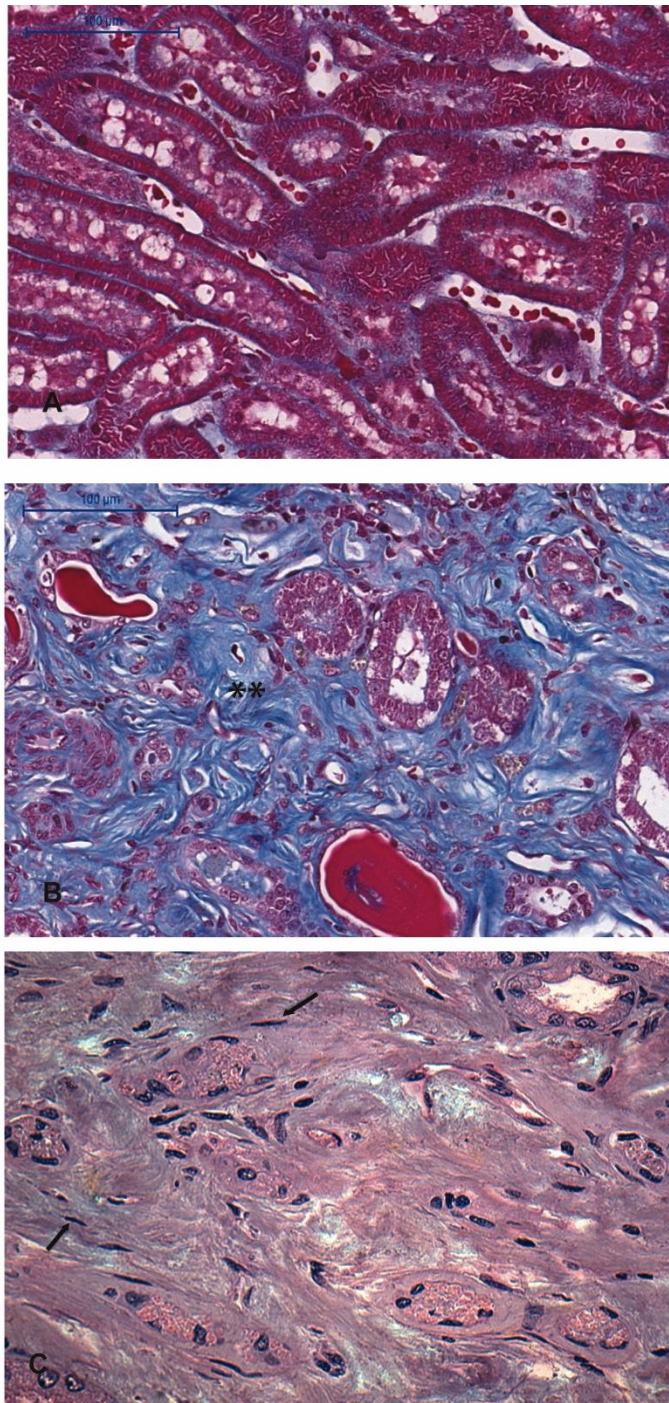


Figura 13: Parênquima renal dos cães nas diferentes condições experimentais corados em tricrômico de Masson, ou hematoxilina e eosina (H&E). A) Parênquima renal normal representativo de cães do grupo controle ou BH400 Barra= 100μm. Tricrômico de Masson. B) Parênquima renal representativo dos cães do grupo BH401 evidenciando intensa fibrose (**). Barra=100μm. Tricrômico de Marsson. C) Parênquima renal exibindo fivroblastos (seta). Barra=100μm. (H&E).

GRÁFICO 6: Deposição da Matriz extracelular (MEC) túbulo-intersticial em todas as condições experimentais avaliadas.

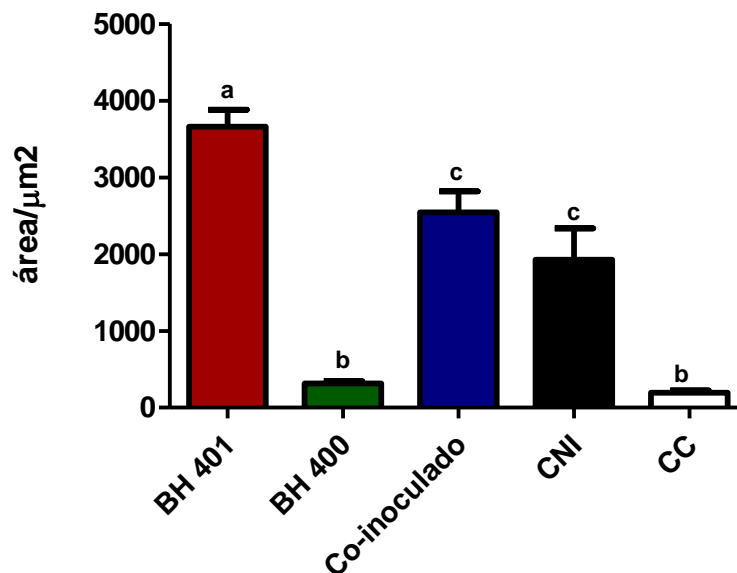


Gráfico 6: Deposição da matriz extracelular (MEC) renal de forma túbulo-intersticiais avaliada em todas as condições experimentais. Animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 (BH401), animal experimentalmente infectado com a cepa BH400 (BH400), animal experimentalmente Co-inoculado com a cepa BH401 + *L.amazonensis* (Co-inoculado), cão naturalmente infectado (CNI) e cão controle (CC). Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 5 animais na grupo BH401 e Co-inoculados, 11 animais BH400, 61 animais CNI e 4 animais CC. a *** $p < 0,001$ quando comparada as marcações b e c. c ** $p < 0,05$ quando comparado ao b. ANOVA “one-way” seguido do pos-teste de *Tukey*.

Assim, correlacionamos todos os resultados descritos com os grupos estudados na tentativa de se agrupar as lesões tubulares as intersticiais especialmente fibrose (Tabela 4). Nos animais BH401 100% destes apresentaram lesões túbulo intersticiais como presença intensa de cilindro hialinos (100%), ectasia tubular (100%), atrofia de túbulos (100%), nefrite intersticial (100%) além de aumento da deposição de matriz extracelular (100%). No grupo de animais BH400, apenas 27,2% tiveram lesões tubulares, entre elas, hiperemia (100%), nefrite (66,6%) além de aumento na deposição da matriz extracelular (66,6%). No grupo Co-inoculado, 100% dos animais desenvolveram lesões túbulo-intersticiais, igual ao grupo BH401, no entanto, as lesões foram: presença de cilindros hialinos, nefrite intersticial e aumento da matriz extracelular (100%), calcificações (20%) ectasia tubular com áreas atróficas (66,6%). Nos animais CNI, 100% destes também desenvolveram lesões túbulo-intersticiais, como nefrite intersticial e aumento da deposição da matriz extracelular (100%), presença de cilindros hialinos (60%), além de calcificações (20%). Nos animais do grupo CC, não foram encontradas lesões túbulo-intersticiais.

Tabela 4: Distribuição e classificação das lesões túbulo-intersticiais nas diferentes condições experimentais.

Grupo	N	% de casos	Classificação
BH 401	5	100%	Cilindros (100%) Fibrose (100%) Nefrite (100%) Ectasia tubular com áreas atróficas (100%)
BH 400	11	27,2%	Hiperemia (100%) Fibrose (66,6%) Nefrite (66,6%)
Co-inoculado	5	100%	Cilindros (100%) Fibrose (100%) Nefrite (100%) Calcificação (20%) Ectasia tubular com áreas atróficas (60%)
CNI	61	100%	Cilindros (60%) Nefrite (100%) Fibrose (100%) Ectasia tubular com áreas atróficas (20%)
CC	4	0%	Ausência de lesão

Tabela 4: Distribuição e classificação das lesões túbulo-intersticiais em todas as condições experimentais avaliadas. Animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 (BH401), animal experimentalmente infectado com a cepa BH400 (BH400), animal experimentalmente Co-inoculado com a cepa BH401 + *L.amazonensis* (Co-inoculado), cão naturalmente infectado (CNI) e cão controle (CC). Para análise, utilizou-se de fragmentos de tecido renal corados em HE ou tricromico de Masson visto em microscópio óptico comum em objetiva de 20x e 40x.

5.3- Lesões vasculares arteriolares

A lesão fundamental observada foi a arteriosclerose do tipo hiperplásica caracterizada histologicamente pela hipertrofia e hiperplasia de células musculares lisas da túnica média. A Figura 14 representa arteríolas, coradas em HE ou tricrômico de Masson. A Figura 14(A e B) mostra a preservação da camada íntima, média e adventícia tanto em coloração de HE quanto em tricrômico de Masson. Já na Figura 14(C e D) são observadas hipertrofia e hiperplasia de células musculares lisas da camada média vistas em HE, além da formação de fibras musculares hipertróficas ou hiperplásicas na camada média observados em azul devido coloração pelo tricrômico de Masson. Não raro apresentavam formações em aspecto de “drusa de cebola”, sugestivos de arteriosclerose hiperplásica.

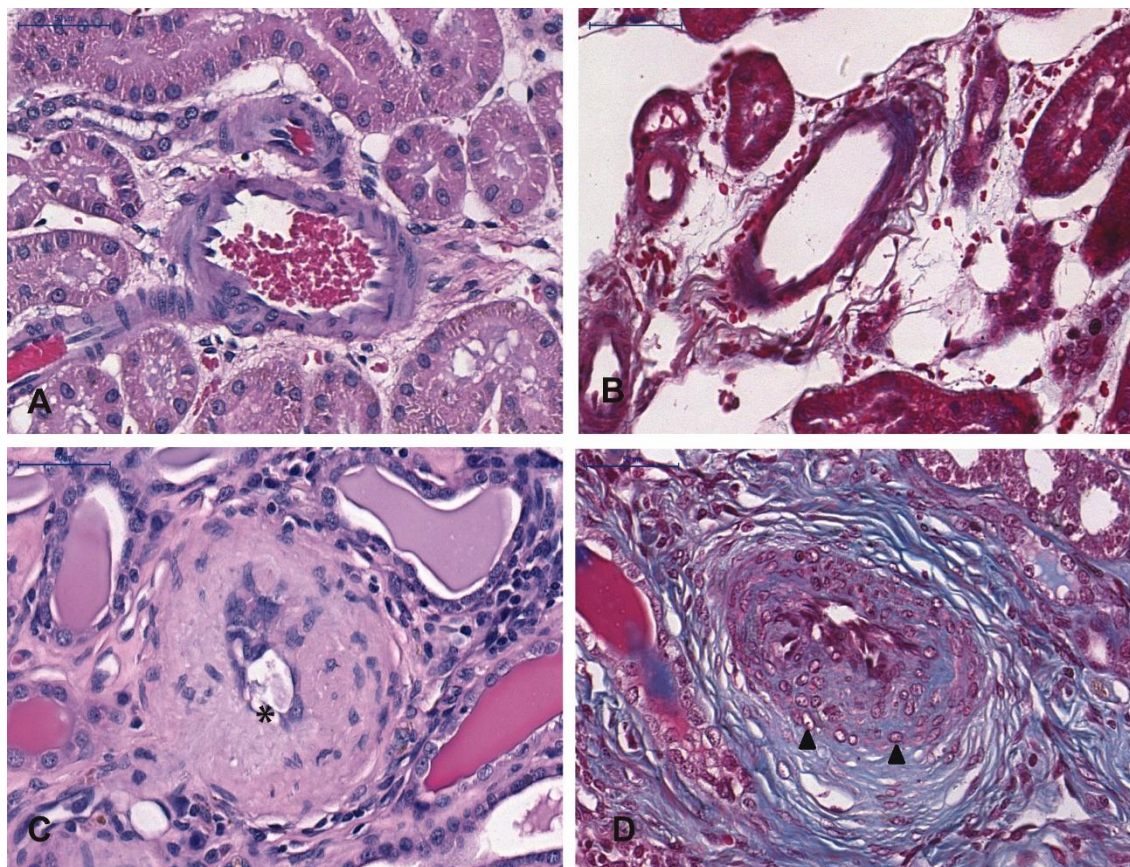


Figura 14: Região cortical renal dos cães nas diferentes condições experimentais corados pela Hematoxilina e eosina (H&E) ou tricrômico de Masson, exibindo vasos - arteríolas. A) Arteriola de animais do grupo CC sem alteração histológica. (H&E). Barra=50µm. B) Arteriola de animais do grupo CC sem alteração histológica. Barra=100µm. Tricrômico de Masson. C) Imagem representativa da arteriola dos animais dos grupos BH401, Co-inoculado ou CNI, exibindo hipertrofia da camada média com redução do lúmen vascular (*). Barra=50µm. (H&E). D) Imagem representativa de arteriola dos animais dos grupos BH401, Co-inoculado ou CNI, exibindo hipertrofia da camada de média (cabeça da seta). Barra=100µm. Tricrômico de Masson.

O GRÁFICO 7, representa o escore histológico das lesões vasculares arteriolares, onde neste podemos observar que 100% dos animais dos grupo BH401, Co-inoculado ou CNI desenvolveram lesões vasculares, diferente do que ocorre nos grupos BH400 ou no grupo CC, onde nenhum animal desses grupos desenvolveram lesões arteriolares, especialmente arteriolesclerose hiperplásica.

GRÁFICO 7: Escore histológico referente a presença de lesão vascular nas diferentes condições experimentais avaliadas.

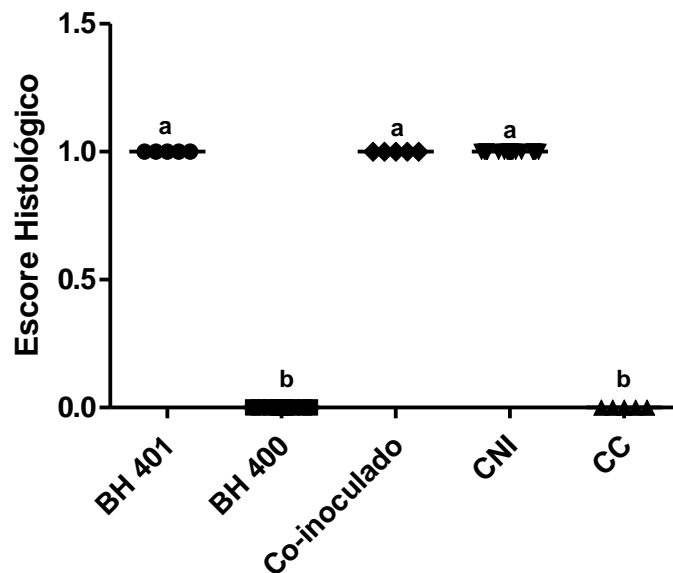


Gráfico 7: Escore histológico referente a presença de lesão vascular em todas as condições experimentais avaliadas. Cepas BH401 (Grupo Experimentalmente infectado com a cepa BH401), BH400 (Grupo Experimentalmente infectado com a cepa BH400), (Grupo Co-inoculado com *L. infantum* cepa BH401 + *L. amazonensis* cepa PH8), CNI (cão naturalmente infectado) e CC (cão controle). Para análise, utilizou-se de fragmentos de tecido renal corados em Hematoxilina e eosina (HE) ou Tricrômico de Masson, visto em microscópio óptico comum em objetiva de 20x e 40x. Os resultados são exibidos como mediana, com *n* de 5 animais na grupo BH401 e Co-inoculados, 11 animais BH400, 61 animais CNI e 4 animais CC. a ****p*< 0,001 quanto comparada ao b. Kruskal- Wallis.

5.4- Parasitismo tecidual renal

Para evidenciar o parasitismo tecidual utilizou-se a reação imuno-histoquímica para pesquisa das formas amastigotas de *Leishmania*, essas são evidenciadas em coloração marron-acastanhada. A FIGURA 15(A-B) representa formas amastigotas encontradas no parênquima renal nos grupos experimentais BH401, Co-inoculados ou CNI sendo que a marcação ocorre preferencialmente em regiões de nefrite intersticial.

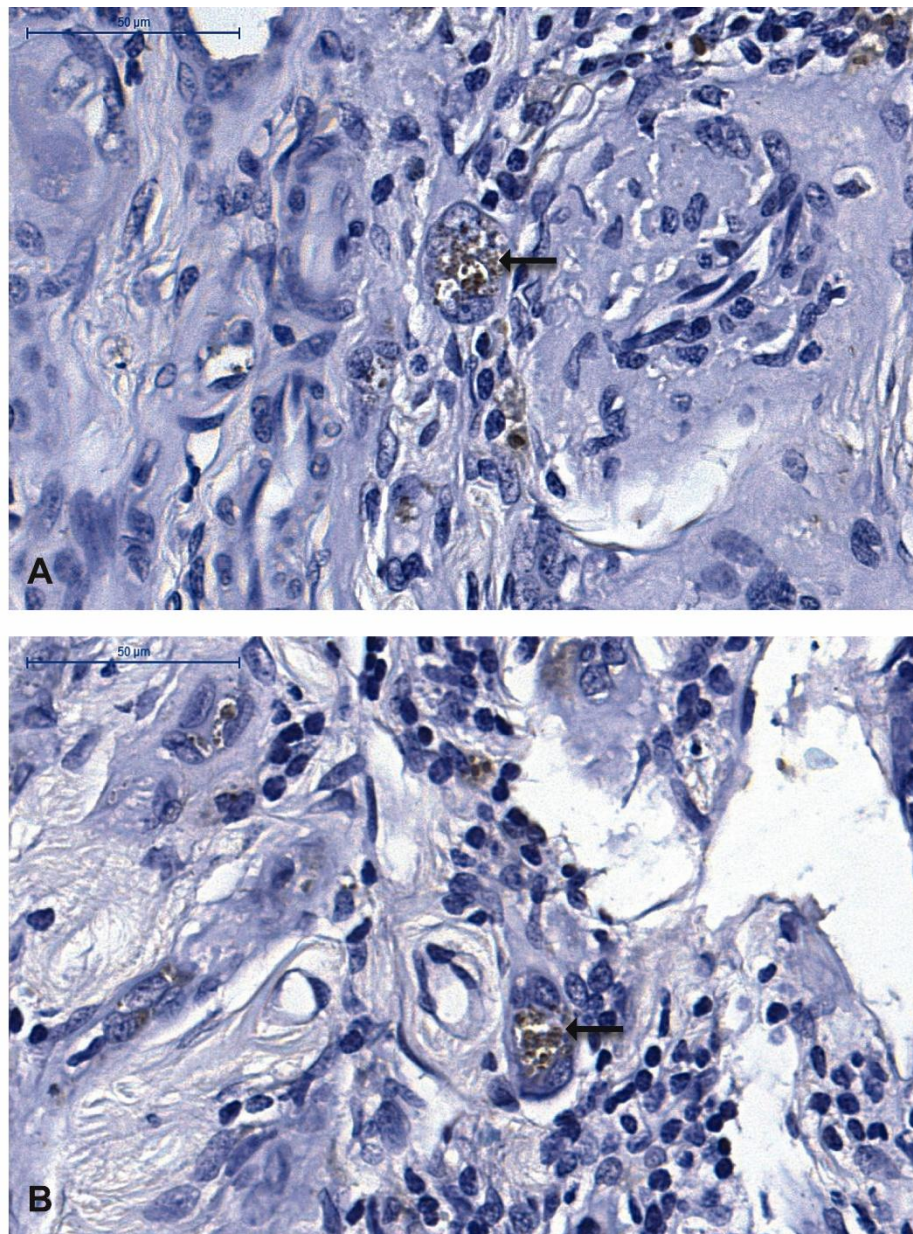


Figura 15: Corte representativo de fragmento renal em reação imuno-histoquímica para detecção de formas amastigotas de leishmania contra-corados em hematoxilina. A, B) Região túbulo-intersticial renal exibindo formas amastigota de leishmania marcadas em marron-acastanhado (seta). Barra=100µm.

5.5-Imuno-histoquímica na avaliação da presença de dois marcadores celulares mesenquimais: alfa-actina (α -actina) e vimentina

Considerando que a alteração da matriz extracelular foi uma lesão presente tanto nos glomérulos quanto no interstício renal, buscamos por imuno-histoquímica (IHQ) avaliar a presença de marcadores mesenquimais (miofibroblastos), como a alfa-actina de músculo liso (α -actina) e vimentina, buscando discutir alguns mecanismos da fibropoese.

As marcações celulares de alfa-actina e vimentina mostraram padrão semelhante com positividade em todo o parênquima renal. Na cortical essa positividade fazia-se preferencialmente ao redor dos glomérulos (cápsula de *Bowman*), lamina basal das células epiteliais dos túbulos proximais e distais de forma linear e em menor intensidade nas células intersticiais. Na medular as marcações foram semelhantes, isto é, acompanhando a membrana basal dos túbulos e por vezes corando células intersticiais de aspecto filiformes (miofibroblastos) É importante ressaltar as diferenças da intensidade do grupo BH401 em relação aos outros grupos de animais infectados e controle, pois ambas as marcações de alfa-actina e vimentina eram notoriamente mais intensas, tanto na cortical e medular, seguindo as áreas de fibrose propriamente ditas. Esses resultados foram confirmados pelos resultados da morfometria e serão mostrados a seguir.

Nas figuras 16 (A-B), representativas para o grupo CC, mostram marcações basais para alfa-actina, com marcação glomerular e túbulo-intersticial. Já na Figuras 16 (C-D), representativas para o grupo BH401 observam-se marcação glomerular e túbulo-intersticial, de forma difusa, mas acentuada, preferencialmente na cápsula de Bowman, mesângio e áreas túbulo-intersticiais acompanhando o processo de fibrose. Nos grupos Co-inoculados e CNI, as marcações para alfa-actina foram semelhantes às do grupo BH401, porém de menor intensidade. (Figuras 16 E-H). Os dados morfométricos para alfa-actina estão representados no GRÁFICO 8.

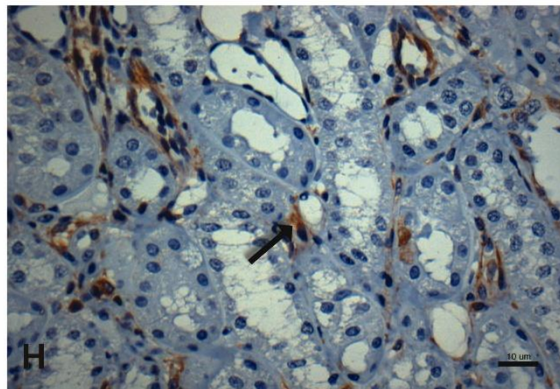
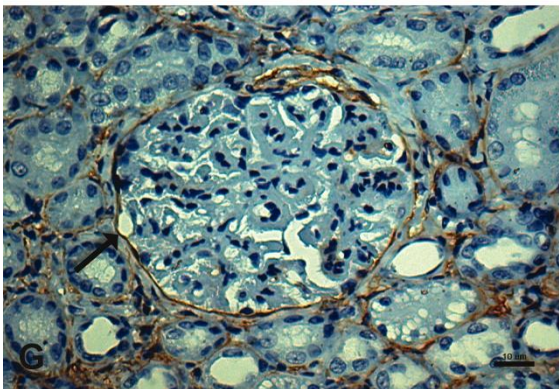
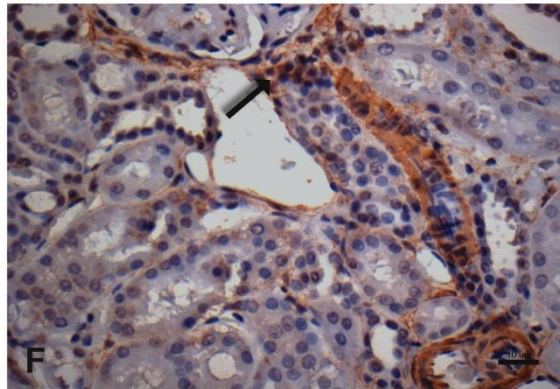
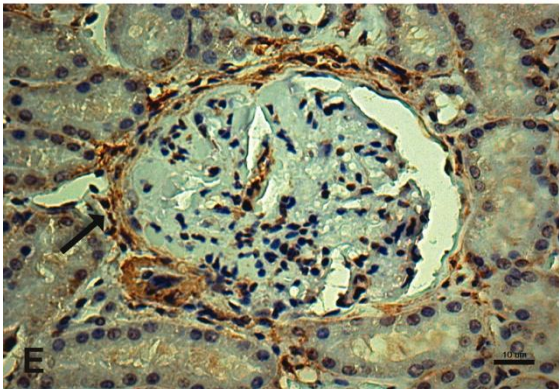
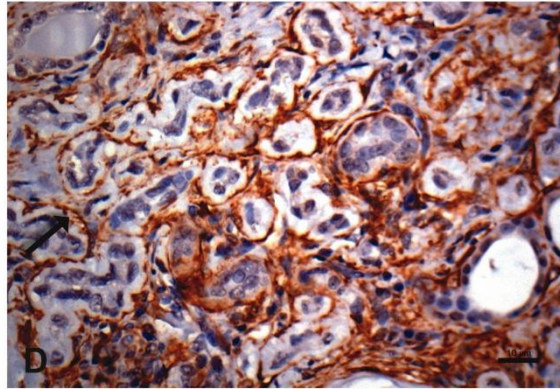
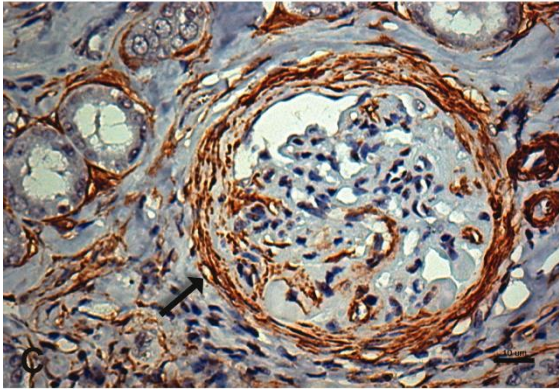
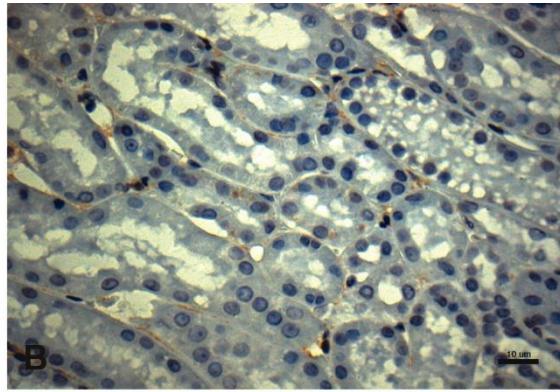
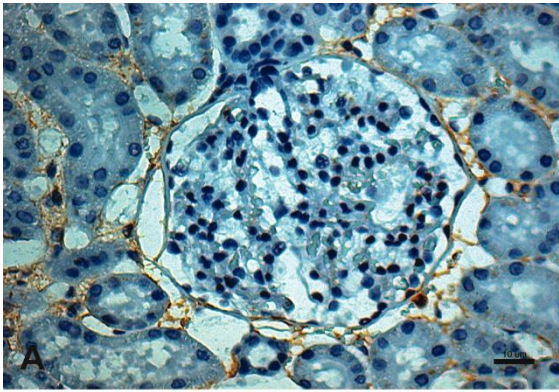


Figura 16: Corte de fragmento renal de cães em reação imuno-histoquímica para detecção de α -actina contra-corados pela Hematoxilina nas diferentes condições experimentais. A) Glomérulo renal de animais do grupo CC. Barra=10 μ m. B) Zona túbulo-intersticial renal de animais do grupo CC. Barra=10 μ m. C) Glomérulo renal de animais do grupo BH401 com intensa marcação capsular (seta). Barra=10 μ m. D) Zona túbulo-intersticial renal de animais do grupo BH401 com intensa marcação tubular (seta). Barra=10 μ m. E) Glomérulo renal de animais do grupo Co-inoculado com moderada marcação glomerular (seta). Barra=10 μ m. F) Zona túbulo-intersticial renal de animais do grupo Co-inoculado com moderada marcação tubular (seta). Barra=10 μ m. G) Glomérulo renal de animais do grupo CNI com marcação semelhante ao grupo Co-inoculado (seta). Barra=10 μ m. H) Zona túbulo-intersticial renal de animais do grupo CNI com marcação semelhante ao grupo Co-inoculado (seta). Barra=10 μ m.

GRÁFICO 8: Quantificação da marcação imuno-histoquímica para alfa-actina em todas as diferentes condições experimentais avaliadas.

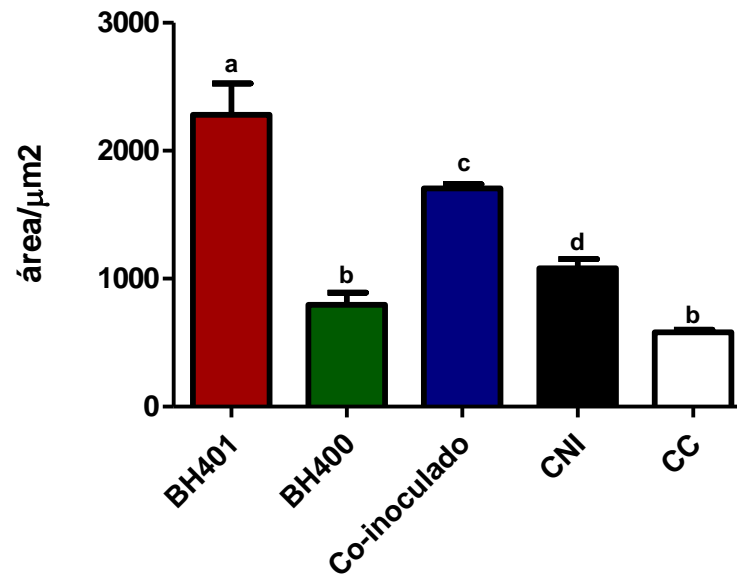


Grafico 8: Reação imuno-histoquímica para marcação de alfa-actina em todas as condições experimentais. Animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 (BH401), animal experimentalmente infectado com a cepa BH400 (BH400), animal experimentalmente inoculado com a cepa BH401 + *L. amazonensis* (Co-inoculado), cão naturalmente infectado (CNI) e cão controle (CC). Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 5 animais na grupo BH401 e Co-inoculados, 11 animais BH400, 61 animais CNI e 4 animais CC. a $***p < 0,001$ quando comparada as marcações b, c ou d. c $**p < 0,05$ quando comparado ao b ou d. d $**p < 0,05$ quando comparado ao d. ANOVA "one-way" seguido do pos-teste de Tukey.

A Figura 17 representa o parênquima renal, em reação imunohistoquímica para marcação de vimentina. Essa proteína é identificada na coloração marron-acastanhada, devido revelação pelo cromógeno DAB com contra-coloração pela hematoxilina de Harris. As figuras 17 (A-B), representativas do grupo CC, mostram as marcações basais para vimentina de distribuição focal e discreta ou mesmo ausentes. Já nas Figuras 17 (C-D), representativas do grupo BH401, observa-se marcações de forma difusa e acentuada na maioria dos glomérulos e em todo o interstício da cortical e medular acompanhado o processo de fibrose. As figuras 17 (E-F), representativas do grupo CNI, revelam marcações de distribuição multifocal, mas de menor intensidade que a do grupo BH401. Vale ressaltar que o grupo Co-inoculado mostrou maior intensidade quando comparado ao grupo CNI sendo semelhante ao grupo BH401. De fato a análise morfométrica confirma essa avaliação histológica. Além disso, o grupo BH400 revelou igual intensidade de marcações para vimentina quando comparado ao grupo CC (Gráfico 9).

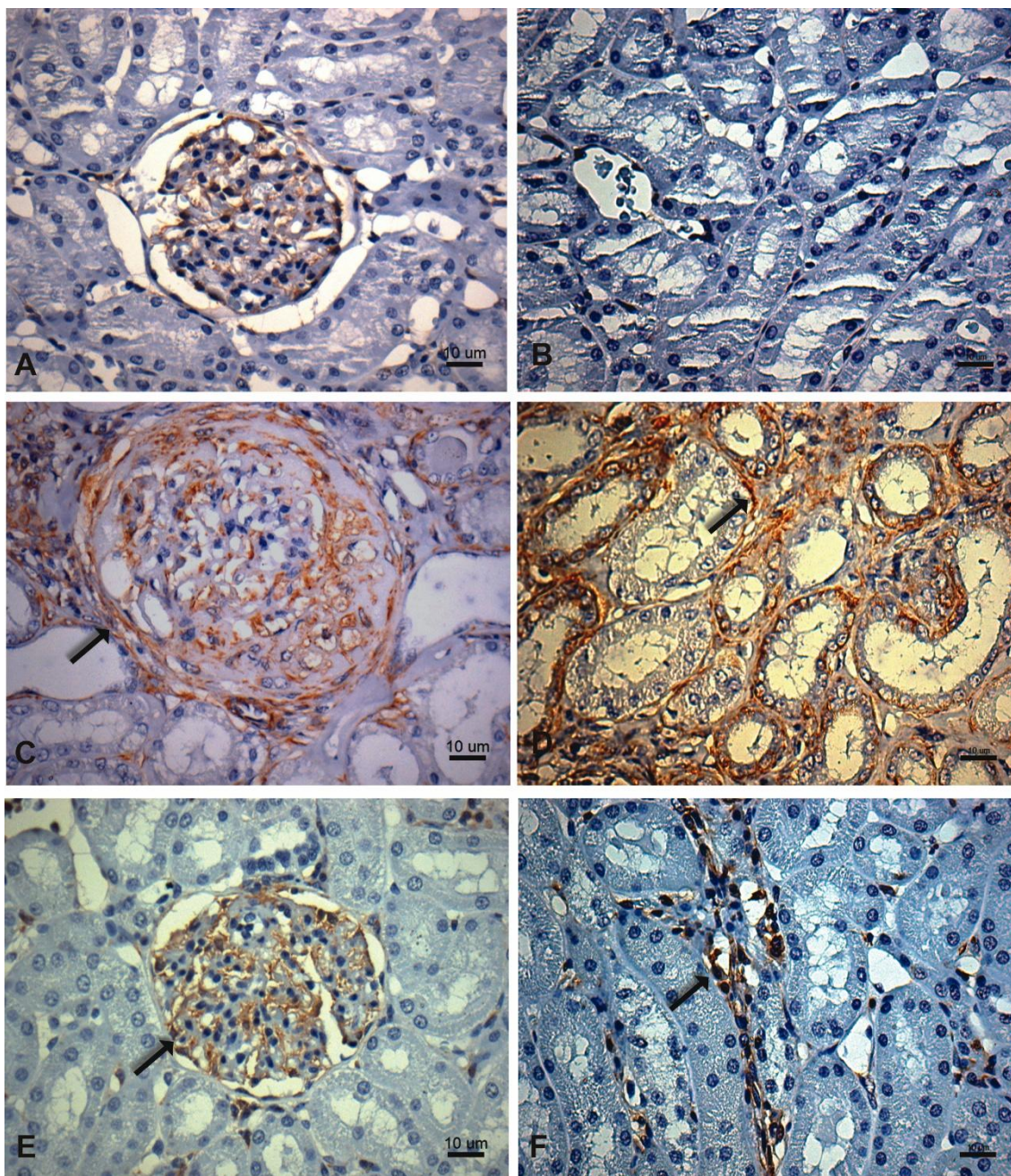


Figura 17: Corte de fragmento renal de cães nas diferentes condições experimentais em reação imuno-histoquímica para detecção de vimentina contra-corados pela Hematoxilina. A) Glomérulo renal de animais do grupo CC com ausência de marcação. Barra=10 μ m. B) Zona túbulo-intersticial renal de animais do grupo CC com ausência de marcação. Barra=10 μ m. C) Glomérulo renal de animais do grupo BH401 com intensa marcação capsular (seta). Barra=10 μ m. D) Zona túbulo-intersticial renal de animais do grupo BH401 com intensa marcação (seta). Barra=1 μ m. E) Glomérulo renal de animais do grupo CNI com moderada marcação glomerular (seta). Barra=10 μ m. F) Zona túbulo-intersticial renal de animais do grupo CNI com moderada marcação (seta). Barra=10 μ m.

GRÁFICO 9: Quantificação da marcação imuno-histoquímica para vimentina nas diferentes condições experimentais avaliadas.

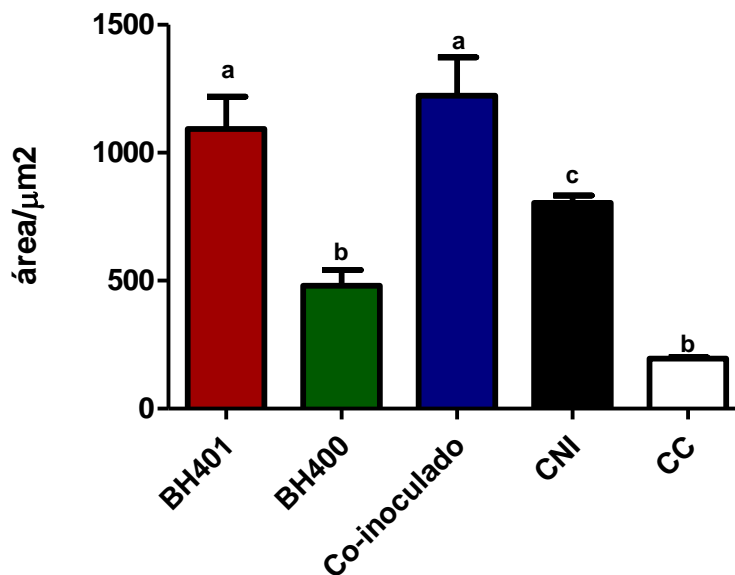


Gráfico 9: Reação imuno-histoquímica para a marcação da vimentina em todas as condições experimentais avaliadas. Animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 (BH401), animal experimentalmente infectado com a cepa BH400 (BH400), animal experimentalmente inoculado com a cepa BH401 + *L.amazonensis* (Co-inoculado), cão naturalmente infectado (CNI) e cão controle (CC). Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 5 animais na grupo BH401 e Co-inoculados, 11 animais BH400, 61 animais CNI e 4 animais CC. a *** $p < 0,001$ quando comparada as marcações b ou c. c ** $p < 0,01$ quando comparado ao b ou d. ANOVA “one-way” seguido do pos-teste de Tukey.

5.6 - Imuno-fluorescência na avaliação de marcadores de macrófagos glomerulares (CD163 e calprotectina – antígeno L1)

Para todos os animais (de todos os grupos) as marcações celulares para CD163 e calprotectina (antígeno L1), nos glomérulos renais, foram semelhantes, as marcações quando presentes eram no tufo glomerular. Porém houve diferenças na distribuição das células positivas entre os diferentes grupos. Das amostras renais do grupo BH401 analisadas, ambos os antígenos CD163 e L1, foram os mais frequentes quando comparados aos demais grupos (Gráfico 10). Todavia, no gráfico 10, é importante observar três fatos: (1) que as células duplo marcadas são sempre em menor frequência; (2) os grupos BH401, Co-inoculado e CNI a proporção das células positivas são semelhantes; (3) os grupos BH400 e CC mostraram distribuição semelhante e significativamente menores que os demais grupos.

GRÁFICO 10: Quantificação da marcação de células CD163 ou Calprotectina (antígeno L1) por imuno-fluorescência nas diferentes condições experimentais avaliadas.

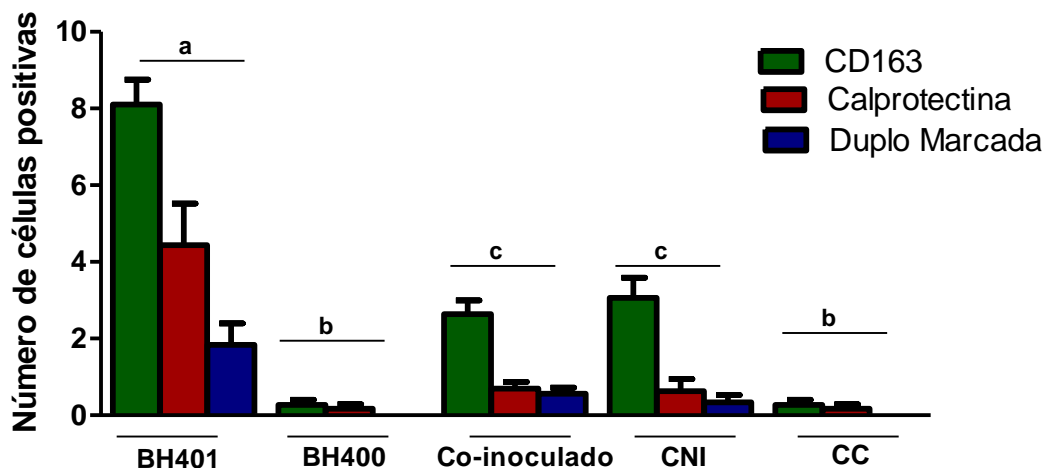


Gráfico 10: Número de células marcadas CD163 ou calprotectina (antígeno L1) nas diferentes condições experimentais. Animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 (BH401), animal experimentalmente infectado com a cepa BH400 (BH400), animal experimentalmente Co-inoculado com a cepa BH401 + *L.amazonensis* (Co-inoculado), cão naturalmente infectado (CNI) e cão controle (CC). Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 5 animais na grupo BH401 e co-inoculados, 11 animais BH400, 61 animais CNI e 4 animais CC. a *** $p < 0,001$ quando comparada as marcações b ou c. c ** $p < 0,01$ quando comparado ao b. ANOVA "one-way" seguido do pos-teste de *Tukey*.

A Figura 18 representa a marcação no glomérulo, pela reação de imunofluorescência e examinada em microscopia confocal para marcação de células CD163 ou calprotectina – L1 positiva, evidenciada em coloração verde (CD163) ou vermelha (calprotectina – L1), além de coloração em azul para o núcleo das células. Células duplo marcadas também foram observadas em algumas condições experimentais (BH401, Co-inoculado e CNI).

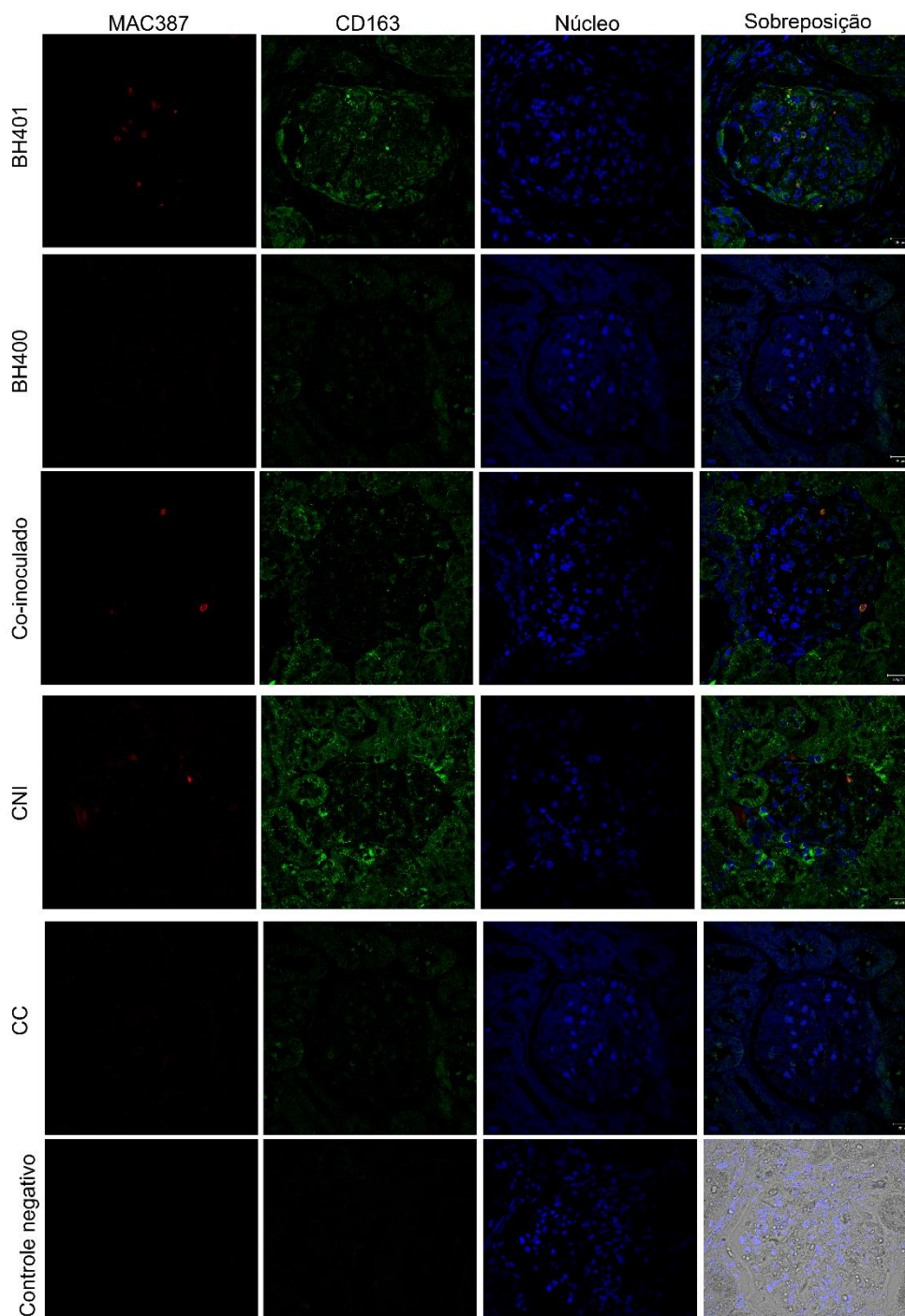


Figura 18: Reação de imuno-fluorescência para marcação de células CD163 ou calprotectina (antígeno L1) – MAC 387 nas diferentes condições experimentais. Animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 (BH401), animal experimentalmente infectado com a cepa BH400 (BH400), animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 + *L.amazonensis* (Co-inoculado), cão naturalmente infectado (CNI) e cão controle (CC). As imagens foram coletadas utilizando microscópio Confocal Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss, Jena, Germany) com objetiva de imersão a óleo de 40x e abertura numérica de 1.3.

5.7-Imuno-histoquímica para a citocina TGF- β

As marcações para o TGF- β , de amostras de rim, independentemente dos grupos a qual pertenciam, foram predominantemente nos glomérulos e túbulos proximais sobretudo no folheto visceral e lamina basal, respectivamente. Entretanto, nos animais com nefrite intersticial crônica pode-se verificar também algumas células positivas, mas sempre de forma discreta.

A FIGURA 19 representa a marcação glomerular e tubular, em reação imuno-histoquímica para detecção do TGF- β que se apresenta em coloração marrom-acastanhada, devido revelação pelo cromógeno DAB com contra-coloração pela hematoxilina de Harris. Notam-se nas Figuras 19 (A-B), representando o grupo CC, marcações glomerulares e tubulares de forma discreta, sendo linear nos glomérulos acompanhando o folheto visceral. Nas Figuras 19 (C-D), representando o grupo BH401, observa-se o mesmo padrão de marcação, porém muito mais intensa que o grupo CC. As Figuras 19 (E-F), representando o grupos Co-inoculado, mostram marcação moderada. De acordo com os resultados morfométricos plotados no GRÁFICO 11 esses achados podem ser confirmados. Além disso, de acordo com o Gráfico 11, pode-se também verificar dois fatos importantes: (1) os resultados do TGF- β dos cães do grupo CNI foram semelhantes ao grupo Co-inoculado; (2) enquanto cães infectados com a cepa BH400 tem perfil semelhante ao do grupo CC.

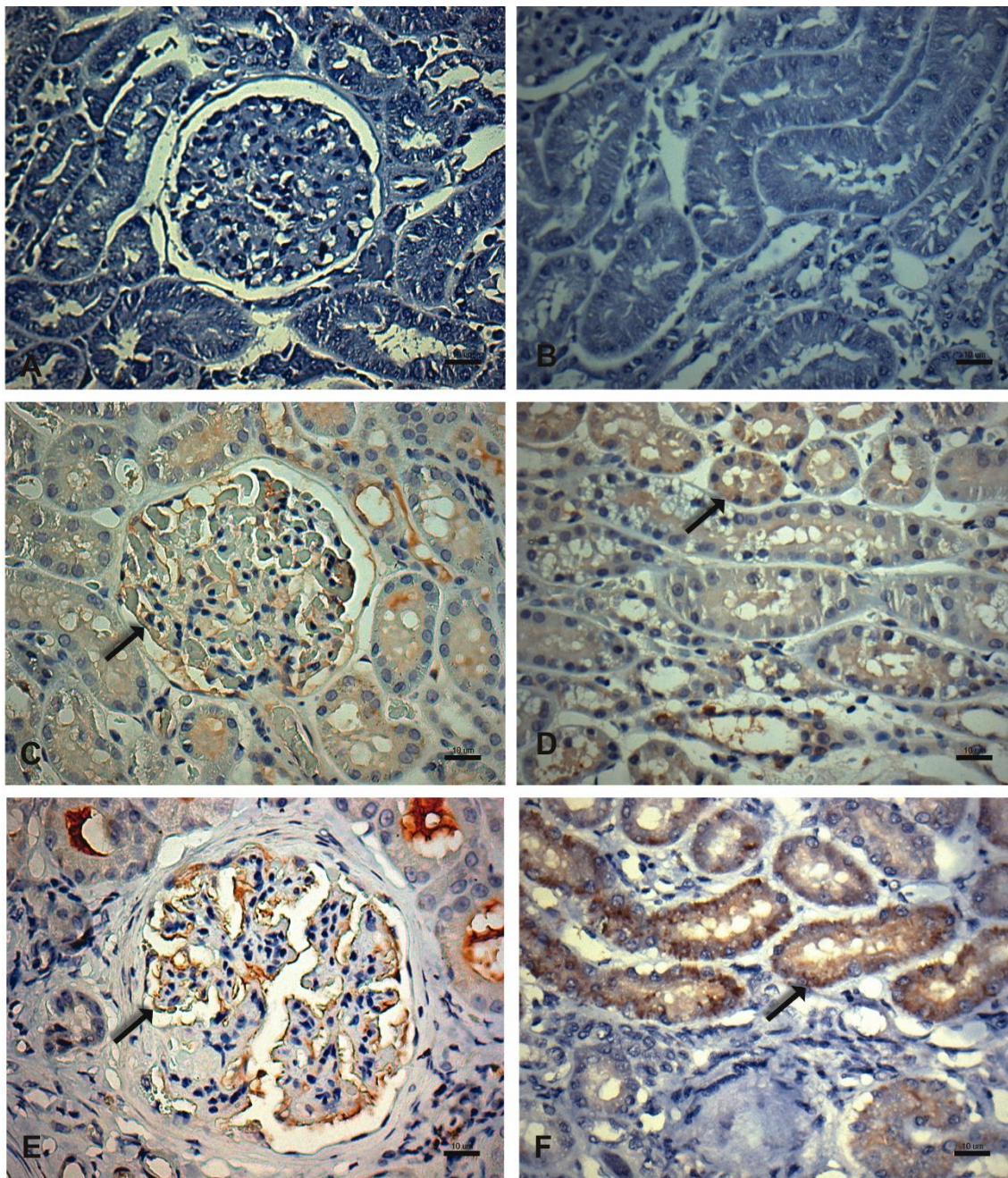


Figura 19: Corte de fragmento renal de cães nas diferentes condições experimentais em reação imunohistoquímica para detecção do TGF- β contra-corados pela Hematoxilina. A) Glomérulo renal de animais do grupo CC com ausência de marcação. Barra=10 μ m. B) Zona túbulo-intersticial renal de animais do grupo CC com ausência de marcação. Barra=10 μ m. C) Glomérulo renal de animais do grupo Co-inoculado com moderada marcação (seta). Barra=10 μ m. D) Zona túbulo-intersticial renal de animais do grupo Co-inoculado com moderada marcação (seta). Barra=10 μ m. E) Glomérulo renal de animais do grupo BH401 com intensa marcação glomerular (seta). Barra=10 μ m. F) Zona túbulo-intersticial renal de animais do grupo BH401 com intensa marcação (seta). Barra=10 μ m.

GRÁFICO 11: Quantificação da marcação imuno-histoquímica para o TGF- β nas diferentes condições experimentais.

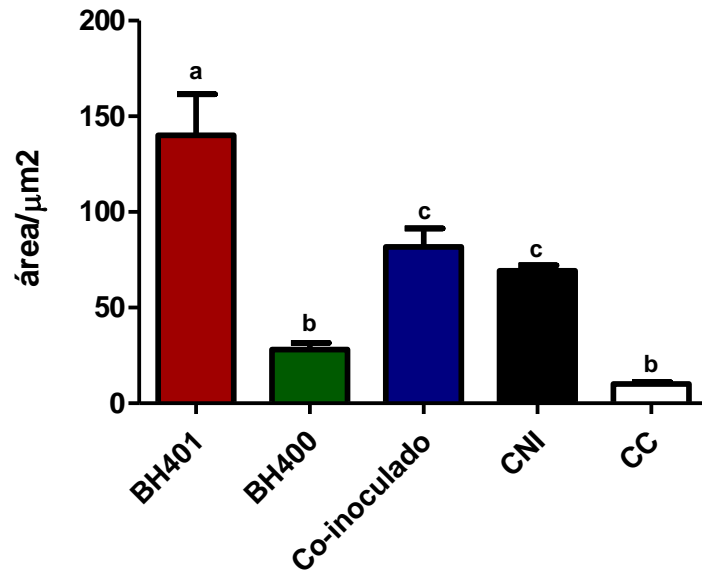


Gráfico 11: Quantificação da marcação imuno-histoquímica para o TGF- β nas diferentes condições experimentais. Animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 (BH401), animal experimentalmente infectado com a cepa BH400 (BH400), animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 + *L.amazonensis* (Co-inoculado), cão naturalmente infectado (CNI) e cão controle (CC). Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 5 animais na grupo BH401 e co-inoculados, 11 animais BH400, 61 animais CNI e 4 animais CC. a *** $p < 0,001$ quando comparada as marcações b ou c. c ** $p < 0,01$ quando comparado ao b. ANOVA "one-way" seguido do pos-teste de *Tukey*.

5.8-Imuno-histoquímica para as enzimas da família das metaloproteinases dos tipos 2, 7 e 9

Em geral, as marcações para as metaloproteinases (MMPs) do tipo 2 (MMP-2), do tipo 7 (MMP-7) e do tipo 9 (MMP-9), independentemente dos grupos a que pertenciam as amostras examinadas, foram predominantemente nos túbulos proximais. Nas lâminas com nefrite intersticial crônica pode-se verificar também algumas células tubulares positivas próximas ao infiltrado inflamatório. Já a frequência das marcações foi sempre mais intensa nos grupos BH401 e Co-inoculados. A marcação da MMP-2 no grupo BH400 foi significativamente menor quando comparada aos grupos CNI ou CC, entretanto, isto não se repete nas demais marcações para essas enzimas. Interessante notar também que não houve aumento de expressão das MMPs quando avaliado o grupo CNI. Resultado esse mostrado nos GRÁFICOS 12, 13 e 14 respectivamente.

GRÁFICO 12: Quantificação da marcação para MMP 2 em reação imuno-histoquímica em todas as condições experimentais avaliadas.

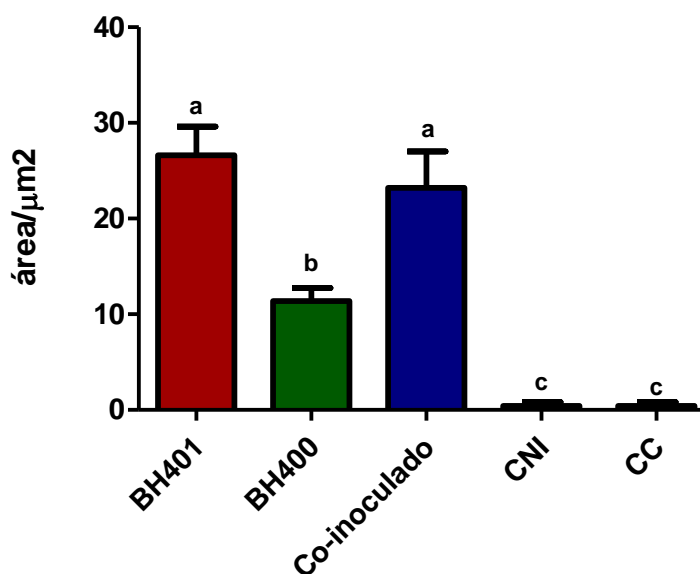


Gráfico 12: Quantificação da marcação para MMP-2 em reação imuno-histoquímica em todas as condições experimentais. Animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 (BH401), animal experimentalmente infectado com a cepa BH400 (BH400), animal experimentalmente infectados com a cepa BH401 + *L.amazonensis* (Co-inoculado), cão naturalmente infectado (CNI) e cão controle (CC). Os resultados são exibidos como média ± erro padrão da média, com *n* de 5 animais na grupo BH401 e Co-inoculados, 11 animais BH400, 61 animais CNI e 4 animais CC. a ****p* < 0,001 quando comparada as marcações b ou c. b ***p* < 0,01 quando comparado ao c. ANOVA “one-way” seguido do pos-teste de *Tukey*.

GRÁFICO 13: Quantificação da marcação para MMP 7 em reação imuno-histoquímica em todas as situações experimentais avaliadas.

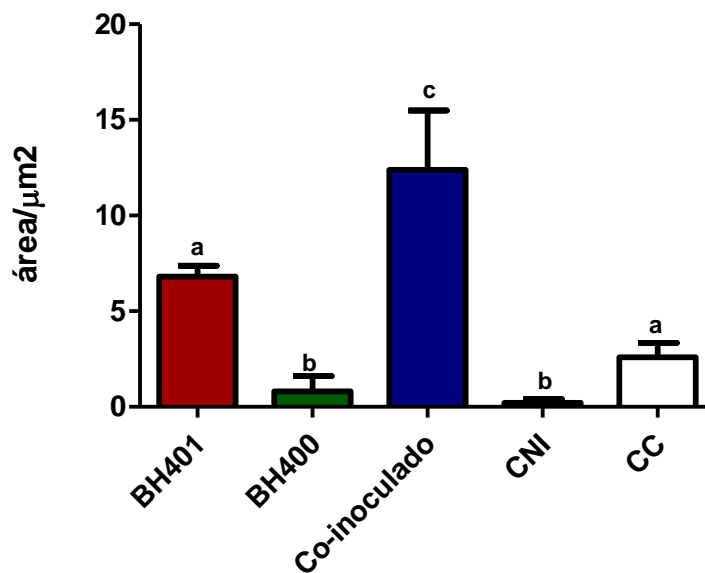


Gráfico 13: Quantificação da marcação para MMP-7 em reação imuno-histoquímica em todas as situações experimentais. Animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 (BH401), animal experimentalmente infectado com a cepa BH400 (BH400), animal experimentalmente infectados com a cepa BH401 + *L.amazonensis* (Co-inoculado), cão naturalmente infectado (CNI) e cão controle (CC). Os resultados são exibidos como média ± erro padrão da média, com *n* de 5 animais na grupo BH401 e Co-inoculados, 11 animais BH400, 61 animais CNI e 4 animais CC. a **p* < 0,05 quando comparada as marcações do c. c ***p* < 0,01 quando comparado ao a ou c. ANOVA “one-way” seguido do pos-teste de Tukey.

GRÁFICO 14: Quantificação da marcação para MMP 9 em reação imuno-histoquímica em todas as situações experimentais avaliadas.

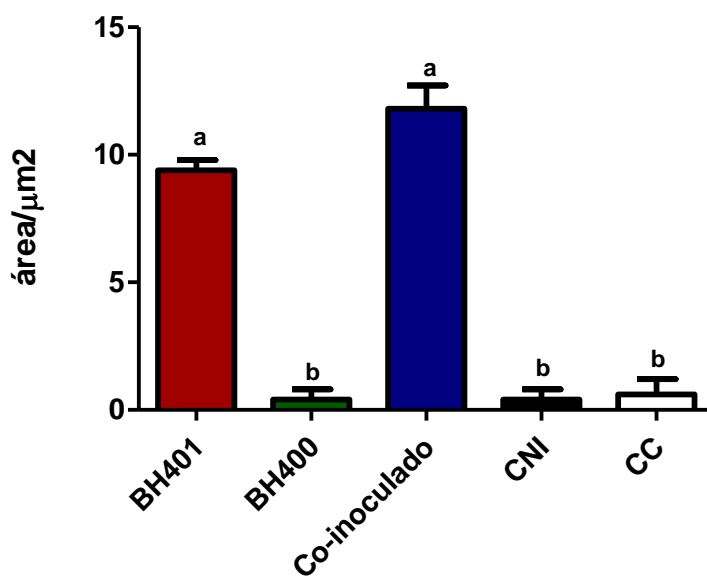


Gráfico 14: Quantificação da marcação para MMP-9 em reação imuno-histoquímica em todas as situações experimentais. Animal experimentalmente infectado com a cepa BH401 (BH401), animal experimentalmente infectado com a cepa BH400 (BH400), animal experimentalmente infectados com a cepa BH401 + *L.amazonensis* (Co-inoculado), cão naturalmente infectado (CNI) e cão controle (CC). Os resultados são exibidos como média ± erro padrão da média, com *n* de 5 animais na grupo BH401 e Co-inoculados, 11 animais BH400, 61 animais CNI e 4 animais CC. a ****p* < 0,0001 quando comparada as marcações do b. ANOVA “one-way” seguido do pos-teste de Tukey.

Na Figura 20 (A-F) mostra as marcações tubulares das MMPs através da reação imuno-histoquímica, evidenciada em coloração marrom-acastanhada, devido revelação pelo cromógeno DAB com contra-coloração pela hematoxilina de Harris. Como o padrão de marcação foi o mesmo para as MMP-2, MMP-7 e MMP-9, as figuras apresentadas a seguir serão representativas. Por exemplo, a Figura 20 (A-B), representando o grupo CC, a marcação tubular para MMP-2 foi de forma focal e discreta. Já a Figura 20 (C-D), representativa do grupo BH401, a marcação tubular de MMP-2 foi multifocal e discreta. No grupo BH400, Figuras 20 (E-F), mostram as marcações foram menos intensas que as do grupo BH401.

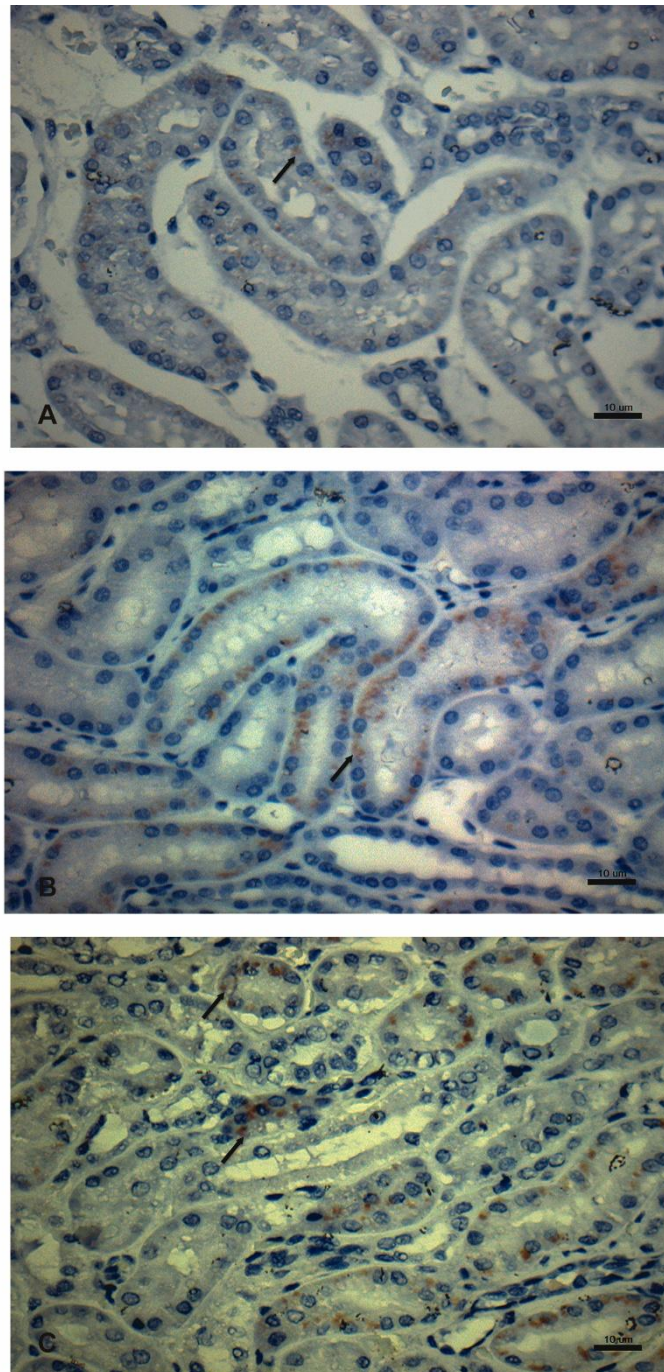


Figura 20: Corte de fragmento renal de cães nas diferentes condições experimentais em reação imunohistoquímica para detecção da Metaloproteinase 2 (MMP-2) contra-corados pela Hematoxilina. A) Zona túbulo intersticial renal de animais do grupo CC com discreta marcação. Barra=10µm. B) Zona túbulo-intersticial renal de animais do grupo BH400 com moderada de marcação. Barra=10µm. C) Zona túbulo-intersticial renal de animais do grupo BH401 com intensa marcação (seta). Barra=10µm.

DISCUSSÃO

6.DISSCUSSÃO

As lesões mais frequentes na LVC são aquelas relacionadas as diversas formas de glomerulonefrites. De acordo com a literatura podem ser descritas ou classificadas, em ordem de importância e frequência, da seguinte maneira: (1) Glomerulonefrite Membranoproliferativa (GNMP), também chamada de mesângiocapilar; (2) Glomerulonefrite Mesangioproliferativa (GNMSP); (3) Glomeruloesclerose Segmentar e Focal (GESF); (4) Glomerulonefrite Crescêntica; (5) Glomerulonefrite Membranosa (GNM) ou nefrite membranosa; (6) Glomerulonefrite Esclerosante (GE) (COSTA et al. 2003; GOTO et al. 2004; COSTA et al. 2008; COSTA et al. 2010; ARESU et al. 2012; LAI et al. 2015; CIANCIOLO et al. 2016). Neste trabalho os principais tipos histológicos encontrados nos animais infectados foram as GNMP, GNMm e GE. Entretanto, a frequência das lesões foram distintas entre os grupos. As GNMP foram mais frequentes nos grupos BH401 (75%) e CNI (75%). As GNMm ocorreram em todos os animais do grupo Co-inoculados e em alguns animais do grupo BH400 (33,3%). As GE, por sua vez, apareceram apenas nos animais do grupo BH401 (100%).

Os mecanismos das glomerulonefrites na LVC estão relacionados as hipersensibilidades do tipo III, isto é, aquelas mediadas pela deposição de imunocomplexos nas membranas basais. Isso estaria diretamente relacionado às altas concentrações de imunoglobulinas séricas na LVC são descritas tanto nos animais naturalmente infectados por *L. infantum* (GEORGE, et al., 1976; MARCUSSEN, et al., 1989; TAFURI, et al., 1989; NIETO, et al., 1992; COSTA, et al., 2000; GOTO, et al., 2004; ARESU, et al., 2008; COSTA, et al., 2010; ARESU, et al., 2012), quanto nos animais experimentalmente infectados com *L. infantum* (TAFURI, al., 1989; GENARO, 1993) ou *L. donovani* (KEENAN et al. 1984). Imunoglobulinas da classe G (IgG) e Imunoglobulinas da classe M (IgM) são as mais encontradas juntamente com os fragmentos do componente 3 do complemento (C3) (COSTA et al. 2003; ARESU et al. 2012). Adicionalmente, Costa et al. (2010) mostraram o papel das células TCD4+ na patogenia das glomerulonefrites mediante mecanismos de inibição do processo de apoptose das células mesangiais, mas Aresu et al. (2012) acrescentaram que os

mecanismos da hipersensibilidade do tipo III parecem coexistir com a presença dos linfócitos TCD4+. Os autores encontraram complexos antígeno-anticorpo em todas as biópsias renais obtidas de 15 cães naturalmente infectados com *L. infantum* na Itália. Dados não mostrados como a dosagem de creatinina sérica e a reação de imunofluorescência para o componente C3 do complemento corroboram com a gravidade das lesões glomerulares encontradas nos rins de animais experimentalmente infectados com a cepa BH401 e naqueles Co-inoculados. Todos os animais destes dois grupos exibiram altos valores de creatinina sérica além da presença de IgM, IgG (fração lambda e Kappa), C3 e ainda o fragmento C1q do complemento nos glomérulos.

Os resultados histológicos quantitativos (morfométricos) mostraram maior celularidade com conseqüente expansão da área glomerular nos animais dos grupos CNI, BH401 e os Co-inoculados em relação aos animais CC e BH400. Isso sugere que o padrão histológico de glomerulonefrite instalada nos cães poderia ser conseqüência de alterações da matriz mesangial pelo aumento da celularidade no mesângio ou da matriz. De acordo com Sethi et al (2012) o aumento da celularidade mesangial observada nas glomerulonefrites induzidas por *Leishmania* embora devido principalmente a proliferação das próprias células mesangiais, também pode ser provocado por células inflamatórias no local. Para avaliar o aumento da celularidade mesangial foi feito, por meio da imunofluorescência em microscopia confocal, a caracterização de macrófagos inflamatórios mediante uso de anticorpos anti-antígeno da calprotectina (antígeno L1), e os anti-receptores *scavenger* (CD163).

A calprotectina (L1), mostrou ser um importante marcador de inflamação presente em células que estão chegando ao sítio inflamatório, especialmente monócitos/macrófagos os quais produzem altos níveis de IL-1 β , estando essas células associadas a uma resposta imune do tipo TH1 (PINELLI et al. 1994; SOLANO-GALLEGO et al. 2016). De fato, a composição celular do glomerulo em relação a esse marcador mostrou a maior positividade nos animais infectados pela cepa BH401 indicando, talvez, uma maior virulência dessa cepa em relação aos demais grupos experimentais. Em outros trabalhos, utilizando modelo murino, a calprotectina foi relacionada à suscetibilidade na infecção por *L. major* (SUNDERKOTTER et al. 1999; STEINBRINK et al. 2000; GOTO et al. 2007) e a indução de células mielóides no evento de formação dos granulomas hepáticos

(YANG et al. 1997). Por outro lado, na pele, Goto et al. (2007) demonstraram que os macrófagos expressaram essa proteína em animais BALB/c deficientes em linfócitos T e B e experimentalmente infectados por *L. major*.

O CD163 é um receptor do tipo *scavenger* que foi identificado como um indicador da gravidade de várias doenças inflamatórias e infecciosas como nas *Leishmanioses* (LI et al., 2015). A maior frequência de células CD163 positivas encontradas no glomérulo renal dos animais do grupo BH401 quando comparados aos demais grupos. Sugere assim, seguindo a ideia de Li et al. (2015) que isso poderia indicar a maior gravidade da infecção causada por essa cepa. Reforçando essa hipótese outros estudos demonstraram que a infecção por *L. amazonensis* e dois isolados de *L. infantum* induzem aumento na expressão de CD163 em monócitos/macrófagos, sugerindo essas células como fonte de produção da forma solúvel de CD163 (sCD163) durante a LVC. Segundo Jun et al. (2015), macrófagos CD163 positivos estimulados *in vitro* com antígenos de *Leishmania* produzem preferencialmente TNF- α , IL-4 e TGF $-\beta$. Sabe-se ainda que o aumento da expressão de CD163 durante a infecção com espécies de *M. leprae* ou *Leishmania*, provavelmente modulam a resposta imune para uma resposta TH2, responsável pelas apresentações clínicas mais graves dessas doenças (MOSSER, 2003; LI et al., 2015). No presente trabalho houve uma correlação positiva entre a razão da celularidade e área glomerular além da distribuição nos glomerulos das células L1 e/ou CD163 positivas nos grupos que mais apresentaram glomerulonefrites, especialmente o grupo BH401.

Outras alterações histológicas encontradas nesse trabalho foram a nefrite intersticial crônica com infiltrado de células mononucleares, ora difuso ou ora focal ou ambos, (plasmócitos, macrófagos e linfócitos), a dilatação dos túbulos renais contendo, por vezes, cilindros hialinos; degeneração albuminosa ou gordurosa (esteatose) das células dos túbulos renais; arteríolas com hialinose discreta (PAS positiva) na parede subintimal. Estas alterações estão de acordo com os achados de EFSTRATIADIS, et. al., 2006, ALEX, et.al., 2008; COSTA et al. 2013; RIGO et.al., 2013; ESCH et al. 2015).

A nefrite intersticial observada parece similar à descrita por todos os autores citados exceto pela presença marcante de parasitos intracelulares no interstício, bem documentada por Marcussen et al (1989). Esse fato levou os autores a considerar os parasitos como os responsáveis pela nefrite intersticial, ao

contrário da glomerulonefrite, que envolve a deposição de imunocomplexos, os quais podem chegar ao sítio pelos vasos sanguíneos ou então serem plantados *in situ*. Dos animais que apresentaram nefrite intersticial, todos esses tinham formas amastigotas de *Leishmania* nas amostras de rim, exceto naqueles infectados com a cepa BH400, sugerindo que o parasitismo ou enzimas liberadas pelo parasito, contribuem para a evolução e agravamento dessa lesão no órgão (COSTA et al. 2008). A presença de formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* foi visualizada por imuno-histoquímica, e observada em todos os grupos experimentais, exceto naquele infectado com a cepa BH400 e os cães CC. Quando presentes estas eram sempre associados ao exsudado intersticial (nefrite) e nunca aos glomérulos, conforme achados de SLAPPENDEL, (1988), TAFURI, et. al., (1999), COSTA, et.al., (2003), SANCHES, et.al., (2004) e FERNANDES, et.al., (2008).

No caso das lesões vasculares, os grupos BH401 e Co-inoculados apresentaram arteriosclerose do tipo hiperplásica. Esse dano caracterizado pela resposta do músculo liso, levando ao espessamento da parede apresenta múltiplas causas, entre elas, a hipóxia. Um dos mecanismos clássicos envolve a ação da angiotensina 2 (RODRIGUES-ITURBE, et. al., 2005). Este, é um peptídeo vasoativo o qual age nos seus receptores vasculares (endotélio) AT1 ou AT2 ativando a proteína Gq a qual ira culminar com a ativação da proteína quinase do tipo A (PKA). Esta via de sinalização eleva os níveis de cálcio citoplasmático ativando proteínas mitogênicas como a Ras, que gera a hiperplasia vascular e estimula a vasoconstrição periférica. Tudo isso acentua a hipóxia que porventura esteja instalada, agravando as lesões não só vasculares como as tubulares (RODRIGUES-ITURBE, et al., 2010).

Fibrose é uma resposta fisiopatológica dos tecidos após injúria aguda ou crônica podendo ser definida como excesso de deposição de tecido conjuntivo, principalmente o colágeno (tipo I e III), componentes da matriz extracelular não colagênica como a fibronectina, osteopondina, laminina e elastina. Essa deposição pode ser tão intensa levando a subversão da arquitetura tecidual e mesmo endurecimento e retração dos tecidos e órgãos acometidos. Em consequência o órgão reduz de tamanho, sofre deformações, por vezes apresentando macroscopicamente nodulações ou estrias de coloração brancacento-amareladas na superfície e que se aprofundam ao corte (WYNN,

2008). Fibroblastos são células mesenquimais produtoras de colágeno, que uma vez ativadas transformam-se nos chamados miofibroblastos. Segundo Duffield (2014) o termo miofibroblasto deriva dos mecanismos da cicatrização de feridas cutâneas (cirúrgicas) nas quais essas células passam a expressar moléculas intracitoplasmáticas contrateis características de células musculares lisas como alfa-actina de musculo liso, vimentina e desmina. Outro mecanismo descrito seria a transição epitélio mesenquima (TEM). Em condições de estresse e lesão, as células tubulares epiteliais renais são ativadas e sofrem alterações fenotípicas, tais como, produção de citocinas fibrogênicas e de novas proteínas como α -actina (α -SMA), adquirindo, dessa forma, características de miofibroblastos e participam na produção de componentes da MEC (VALKOVA, 2002; LEPREUX et al., 2006; AGHA, 2017).

O grupo BH401 apresentou notável processo de fibrose acometendo todo o parênquima renal (cortical e medular). Todos os animais desse grupo apresentaram esclerose glomerular acompanhada de intensa fibrose tubulointersticial. Pela técnica do tricrômico de Masson essa fibrose foi significativamente maior quando comparada aos outros grupos indicando talvez maior virulência dessa cepa. Como já discutido anteriormente em nenhum dos trabalhos de patologia da LVC aqui estudados, essas lesões são descritas.

São vários os marcadores bioquímicos e moleculares utilizados para caracterização de miofibroblastos (marcadores mesenquimais). Aqui se utilizou a alfa-actina (α -smooth muscle actin - α -SMA) e a vimentina (Kisseleva e Brenner, 2008). Novamente foi o grupo BH401 o mais marcante para a visualização da expressão de alfa-actina. Essa expressão era homogênea ao longo das membranas basais tubulares, mas sempre marcantes quando comparadas aos outros grupos. Já a expressão de vimentina foi marcante tanto no grupo BH401 quanto no grupo Co-inoculado reforçando a ideia da maior patogenicidade da cepa BH401.

Um dos mecanismos de ativação dos fibroblastos em miofibroblastos, se faz pela ação de citocinas como o fator de crescimento transformador β (TGF- β 1). O TGF- β 1 exerce papel central no desenvolvimento da fibrose (AKAGI, et. al., 1996; VALKOVA, 2002; ZHOU, et. al. 2012; DUFFIELD, et. al., 2014; VEGA, et. al., 2016). TGF- β estimula a fibrose não só através dos seus efeitos diretos sobre

os fibroblastos, mas adicionalmente, induzindo a produção de outras moléculas como Notch (BIELESZ, et. al., 2010), CTGF (YANG, et. Al., 2011) ou PDGF- β (VENKATACHALAM, et. al., 2010). Além disso, o TGF- β relaciona-se com a ativação de outras citocinas como a osteopontina (OPN) nas células epiteliais lesadas levando a um processo inflamatório focal caracterizado pela migração de neutrófilos, células mononucleares e macrófagos (ROCK, et. al., 2010). Células dendríticas residentes adotam um fenótipo pró-inflamatório e ativavam as células T, contribuindo para a fibrose (SNELGROVE, et. al., 2012). Esses fatores tomados em conjunto iniciam a proliferação de fibroblastos intersticiais em miofibroblastos retroalimentando positivamente o processo de fibrose. Como consequência da lesão tubular, os capilares peritubulares podem ser privados de fatores de sobrevivência, principalmente o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) levando à hipóxia, que irá contribuir para a inflamação e fibrose (VENKATACHALAM, et. al., 2010). O grupo BH401 apresentou expressão significativamente maior de TGF- β 1 quando comparado ao demais grupos. De fato, houve intensas marcações em áreas de fibrose glomerular e intersticial de todos os animais desse grupo. Importante ressaltar que esses animais foram os únicos a apresentarem esclerose glomerular acompanhada de intensas alterações tubulares. Seguindo do grupo BH401, os grupos Co-inoculados e CNI, apresentaram também marcações intensas e de forma difusa mas de menor intensidade.

As lesões fibróticas glomerulares parecem ser diferentes das tubulointersticiais (GEWIN 2017). Nos glomérulos as proteínas de matriz extracelular se depositam caracterizando uma hialinose denominada glomerulosclerose (GE), enquanto que na porção tubulointersticial essas proteínas substituem túbulos (cicatriz fibrótica) com lesões regressivas. Na LVC pode-se considerar duas situações que poderiam causar esse processo fibrótico: (1) complexos antígeno anticorpo circulantes são capazes de induzir inflamações glomerulares por ativação da via clássica do complemento evoluindo para a GE. Isso promoveria alterações da filtração glomerular, aumentando os níveis de albumina no filtrado glomerular, um dos mecanismos promotores de lesões tubulares, em especial os túbulos proximais (MOSSER, 2003; KAISLING et al. 2013); (2) perturbações da matriz intersticial intertubular pela chegada de parasitos no interior de monócitos ou células dendríticas circulantes infectadas

(ROMANO et al. 2017) promovendo inflamação. Autores como Alexandre-Pires et al. (2006), Silva et al. (2013) e Madeira et al. (2016) demonstraram a associação entre as alterações da MEC e infecção por *Leishmania*. Macrófagos parasitados e ativados desencadeiam processo inflamatório crônico (ESCH et al. 2015) capaz de alterar a fisiologia dos pericitos, células tronco mesenquimais (originariam fibrócitos), fibroblastos residentes, monócitos originários da medula óssea (fibrócitos) e células endoteliais (AGHA et al. 2017). Segundo Humphreys (2018) todas essas células teriam potencial de iniciar e manter a deposição colagênica frente a persistência do estímulo. Outro mecanismo também descrito na gênese da fibrose é a transição epitélio mesenquima (TEM). Todavia, de acordo com vários trabalhos como os de LeBleu et al. (2013), Sato & Yanagita (2017) e Humphreys (2018), TEM representaria apenas 5% de todo o processo fibrótico no rim. Dessa forma, o resultado da presença da alfa actina e vimentina parece mesmo estar relacionado a caracterização dos miofibroblastos oriundos de diversas células. Outro ponto importante de discussão na literatura seria a interdependência ou não dos processos fibróticos glomerulares e tubulointersticiais. Gewin (2017) discute a progressão das lesões glomerulares no sentido de promover lesões tubulares regressivas mediante presença de albumina livre (proveniente do filtrado glomerular alterado), não ligada a lipídeos. Segundo Rodrigues-Iturbe (2010) essa proteinúria ativaria os genes que sintetizam receptores denominados Megalina para a albumina, toxica para as células epiteliais tubulares. Assim, as lesões tubulares também contribuiriam para a nefrite intersticial, sitio inflamatório em que ocorre várias vias de sinalização intracelular, como a do NLRP3 (Nucleotídeos ligados a domínios ricos em leucina do tipo 3), amplificadora da resposta inflamatória. Outros mecanismos inflamatórios que merecem menção são as lesões peritubulares renais por imunocomplexos ou ainda a presença de imunocomplexos na lamina basal do epitélio tubular (ESCH, et. al., 2015). Por fim, Humphreys (2018) questiona a nefrite intersticial como causa ou consequência da fibrose renal.

As metaloproteinases (MMPs) são uma grande família de enzimas, secretadas de forma inativa, que também estão relacionadas ao remodelamento da matriz extracelular (MEC). Essas enzimas não apenas degradam a MEC (GIANNANDREA, et. al., 2014), como também induzem sua síntese por ativação dos fibroblastos (miofibroblastos) ou TEM (ZHAO et al. 2013). Além disso, a

atividade catalítica das MMPs pode ser silenciada pelos quatro inibidores teciduais das MMPs denominadas TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4; entre outros mecanismos, como endocitose, modificações oxidativas e outros inibidores (RA E PARKS, 2007). O grupo BH401 e Co-inoculados, aqueles que apresentaram fibroses intensas, revelaram marcação tecidual das MMP-2 e MMP-9 significativamente maior quando comparadas aos demais grupos. Sendo a MMP-2 relacionada a atividade anti-fibrótica, quando ativa, e possuindo grande marcação em cães os quais possuíam os rins fibróticos, esse achado pode estar relacionado ao fato de que a isoforma da enzima que nosso anticorpo se liga, o tem especificidade para a forma inativa da enzima. O mesmo ocorreu em relação a MMP-9 que tem atividade pró-fibrótica quando ativa. No entanto o anticorpo utilizado também se liga a forma inativa dessa enzima. Já em relação a MMP-7, esta praticamente não parece ser investigada com a mesma frequência que as MMP-2 e MMP-9 no rim. O anticorpo aqui empregado tem especificidade de ligação para as duas isoformas da enzima, ativa e inativa.

De acordo com a literatura cães são excelentes modelos para estudos da leishmaniose visceral humana, pois desenvolvem aspectos clínicos e anatomopatológicos semelhantes (MELENEY et al., 1925; TRYPHONAS et al. 1977; VERESS et al 1977; ABRANCHES et al., 1991; MORENO E ALVAR 2008; POOT et al. 2005; ABBEHUSEN et al. 2017). De acordo com Moreno e Alvar (2002), os estudos das infecções experimentais caninas enfrentam desafios importantes como a variabilidade da resposta de cada animal, isto é, um mesmo inóculo preparado para um determinado grupo de cães pode promover diferentes formas clínicas da doença. Portanto, alguns animais podem desenvolver a doença manifesta (sintomáticos), outros podem permanecer assintomáticos (infectados saudáveis) ou apresentarem sinais clínicos transientes ou mesmo com cura espontânea evidenciando resistência natural (SOLANO-GALLEGO et al, 2000 e 2011, MARTÍNEZ-ORELLANA 2017).

Dentro dessa ideia há um consenso na literatura de que a resposta imune celular elicitada por protozoários do gênero *Leishmania* seria fundamental para a remissão da infecção (PINELLI et al. 1994; MORENO E ALVAR 2002; HOSEIN et al. 2017). Cães naturalmente infectados em áreas endêmicas, apesar de na sua maioria serem infectados saudáveis (SOLANO-GALLEGO et al. 2011), estão expostos a vários outros fatores que interferem na resposta imune humoral ou

adaptativa e conseqüentemente na patogênese da doença (MIRÓ et al. 2008). Então, a busca de protocolos experimentais caninos que reproduzam aspectos clínicos, imunológicos e anatomopatológicos de forma homogênea ao longo da infecção é uma realidade e esforço de vários grupos de pesquisa. Alguns fatores, por exemplo, que desafiam esses protocolos são: (1) diferentes doses e vias do inóculo com a presença ou não da saliva do inseto; (2) fases e virulência dos parasitos (promastigotas e amastigotas) mantidas em laboratório “in vitro” e “in vivo”; (3) raça dos animais. (MORENO E ALVAR et al. 2002). Diferentes vias de inoculação, como a via intravenosa, subcutânea e intradérmica foram empregadas nos diferentes protocolos encontrados na literatura. Porém, a via intravenosa parece ser mesmo a preferencial, pois seria a melhor maneira de se obter cães sintomáticos em um período pre-patente mais curto, e tornando os ensaios clínicos mais viáveis economicamente (NIETO et al. 1999; RHALEM et al. 1999; RIERA et al. 1999; CAMPINO et al. 2000). Como discutido por Abbehusen et al. (2017) a via ideal e mais natural possível seria a intradérmica por meio do uso de insetos vetores (flebotomíneos), mas isso infere em manter uma robusta colônia de flebotomíneos em laboratório o que muitas vezes é inviável. Além disso, de acordo com esses autores e também outros, como Paranhos-Silva et al. (2003) e Costa et al. (2003), a saliva dos flebotomíneos não parece potencializar ou modular o curso da infecção experimental de forma significativa nos cães. Infecções com formas amastigotas ou promastigotas de *Leishmania* parecem não interferir muito no curso da infecção quando se considera a via intravenosa. De fato, taxas médias de 86% de infecção são descritas utilizando formas amastigotas (ABRANCHES et al. 1991, BINHAZIM et al. 1993; CAMPINO 2000; LEANDRO 2001; OLIVEIRA et al. 1993; RHALEM et al. 1999) muito semelhantes as taxas médias de infecção de 90% quando se utiliza as formas promastigotas (ABRANCHES et al., 1991; MARTINEZ-MORENO 1995, NIETO et al., 1999, RIERA et al., 1999, CAMPINO et al., 2000; SANTOS-GOMES et al. 2002, MOLANO et al., 2003). Doses de inóculo de 5×10^7 formas promastigotas de *Leishmania*, por via endovenosa, promovem 100% de sucesso para a infecção experimental em cães da raça Beagle de acordo com vários autores (MORENO et al. 1993; VALLADARES et al. 1998; POOT et al. 2005; RODRIGUEZ-CORTES 2007). Protocolo semelhante foi realizado nesse trabalho.

Então, conforme mencionado na justificativa e considerando a literatura consultada, protocolos para desenvolvimento da LVC experimental não exploram a anatomopatológica renal em detalhes. (GEORGE, et al., 1976; MARCUSSEN, et al., 1989; NIETO, et al., 1992; COSTA, et al., 2000 e 2003; ARESU, et al., 2008; COSTA, et al., 2010; FERNÁNDEZ-COTRINA et al. 2013; HERNANDEZ et al. 2015; ABBEHUSEN et al. 2017). A cepa BH401 foi a que causou lesões renais mais intensas que os animais do grupo CNI reproduzindo também lesões em outros órgãos. Embora não descritos ou representados aqui, já foram realizadas análises histológicas, parasitológicas e imuno-histoquímicas, desses vários órgãos, como o fígado, baço, linfonodos cervicais, pulmão, medula óssea costal, pele e todo o tubo gastrointestinal (TGI) foram realizados. Todos os animais infectados com a cepa BH401 revelaram as lesões clássicas da LVC descritas: (1) Fígado: hepatite crônica granulomatosa com granulomas tanto nos lóbulos hepáticos (intra lobulares) como nos espaços porta os quais apresentavam células gigantes do tipo corpo estranho ou células epitelióides. Não raro, esses granulomas continham pigmentos de hemossiderina em seu interior os quais foram revelados pelo azul da Prússia; (2) Baço: esplenite capsular crônica com hipertrofia da polpa vermelha caracterizada pela intensa proliferação de macrófagos além da presença de inúmeros plasmócitos. Presença de granulomas na polpa vermelha constituídos principalmente por células epitelióides e macrófagos repletos de formas amastigotas no seu interior. Atrofia da polpa branca em especial na região peri-arteriolar. Exuberância do sistema trabecular da polpa vermelha e espessamento notável da capsula; (3) Linfonodos: linfadenite capsular crônica com notável espessamento, hipertrofia e hiperplasia dos cordões e seios medulares com infiltrado inflamatório rico em plasmócitos e macrófagos, esses repletos de formas amastigotas no seu interior. Reatividade dos centros germinativos da região cortical; (4) Pulmão, pneumonite intersticial crônica com múltiplas áreas de fibrose; (5) Medula óssea: hipertrofia e hiperplasia das trabéculas ósseas além e de células de origem mielóide, presença da emperipoiose em células da linhagem mielóide; (6) Pele, inflamação crônica não granulomatosa difusa nas camadas papilar e reticular da derme e focal ao redor de vasos e anexos da epiderme; (7) TGI, hipertrofia e hiperplasia das células da lamina própria (macrófagos e plasmócitos,

principalmente) a partir do estomago até o reto. Parasitismo intenso especialmente no colón e reto de todos os animais.

Confirmando então os achados anatomopatológicos descritos foi realizado ainda Imuno-histoquímica (IHQ) para os mesmos marcadores da fibrose renal para todos esses órgãos citados. Os resultados confirmam a fibrose sistêmica descrita por Silva et. al. (2013) com marcações intensas para alfa-actina, vimentina e TGF-beta em todos os órgãos, reafirmando assim a intensa virulência dessa cepa em gerar fibrose sistêmica em modelo experimental de LVC.

CONCLUSÃO

7.CONCLUSÃO

1- A fibrose renal foi achado comum tanto em cães naturalmente infectados ou experimentalmente infectados;

2- A infecção experimental pela cepa BH401 foi satisfatória ao induzir as lesões clássicas da LVC e especial a fibrose renal;

3- A cepa BH401 foi a que causou lesões renais mais intensas quando comparadas ao grupo CNI, sendo esta uma excelente cepa para auxílio no estudo dos mecanismos de fibrose renal na LVC.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ABBEHUSEN M. M. C, et. al. Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Sci Rep.** 21;7:15914, 2017.

ABRANCHES, P. et. al. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.** 13:537-50. 1991.

ABREU-SILVA, A. L. et al. Extracellular matrix alterations in experimental murine *Leishmania (L.) amazonensis* infection. **Parasitology**, v. 128, n. Pt 4, p. 385-90. 2004.

AGHA, E. E.. et. al. Mesenchymal Stem Cells in Fibrotic Disease. **Cell Stem Cell.** 21, August 3. 2017

AGU, W. E. et. al. Proliferative glomerulonephritis in experimental *Leishmania donovani* infection of the golden hamster. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** 4, 353-368. 1981.

AKAGI, Y. et. al. Inhibition of TGF- β 1 expression bu antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix aceumulation in experimental glomerulonephritis. **Cytokine Grown Factor Rev.** 17: 148-155. 1996.

ALEX, S. et. al. Nephrotic syndrome complicating chronic visceral leishmaniasis: re-emergence in patients with AIDS. **Clin Nephrol.** 70: 65-8. 2008.

ALEXANDRE-PIRES, G. et. al. Leishmaniosis—A Report About the Microvascular and Cellular Architecture of the Infected Spleen in *Canis familiaris*. **Microscopy Research And Technique** 69:227–235. 2006.

ANDRADE, W. et al. Isolation and characterization of rat skeletal muscle proteoglycan decorin and comparison with the human fibroblast decorin. **Comp Biochem Physiol B**, v. 100, n. 3, p. 565-70, 1991.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. [Some new aspects of the kala-azar pathology. (Morphologic study of 13 autopsy cases)]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 8, n. 6, p. 259-66. 1966.

ARESU, L. et. al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) of tubular renal cell in canine glomerulonephritis. **Virchows archive**. 451:937-942. 2007.

ARESU, et al. Immunofluorescence staining for the detection of immunoglobulins and complement (C3) in dogs with renal disease. **Vet Rec**, v. 163, n. 23, p. 679-82. 2008.

ARESU, L. et. al. Light and electron microscopic analysis of consecutive renal biopsy specimens from Leishmania soropositive dogs. **Vet. Path.** 50:753-760. 2012.

BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.44, p.536-46, 1991.

BENALI, S. L. et. al. Epithelial mesenchymal transition in the progression of renal disease in dogs. **Histology and histopathology**. 29: 1409-1414. 2014.

BIELESZ, B. Epithelial notch signaling regulates interstitial fibrosis development in the kidneys of mice and humans, *J. Clin. Invest.* 120: 4040–4054. 2010.

BINHAZIM A. A. et. al. Determination of virulence and pathogenesis of a canine strain of *Leishmania leishmania infantum* in hamsters and dogs. **Am J Vet Res.** 54:113-21, 1993.

BITTENCOURT, A. L. et al. Tegumentary leishmaniasis in childhood. **Pediatr Dermatol.** 13(6):455-63.1996.

BOGLIOLO, L. et. al. Nova contribuição ao conhecimento da anatomia patológica da leishmaniose visceral. A propósito de um caso brasileiro e com especial referência a fibrose hepática leishmaniótica. **O Hospital** 3, 101-110. 1956.

BONGIOVANNI, L. et. al. Epithelial to-mesenchymal transition: immunohistochemical investigation of related molecules in canine cutaneous epithelial tumours. **Vet. Dermatol.** 24: 195-203. 2013

CASTRO, R. S. et. al. Hepatic fibropoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum* treated with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol. **Vet. Paras.** 250: 22-29. 2018.

CALIARI M.V. 1997. **Principios de Morfometria Digital: KS300 Para Iniciantes**. Belo Horizonte: Editora UFMG.

CAMPINO, L. et. al. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniasis. **Vet Parasitol.** 92:269-75, 2000.

CERVANTES-ARIAS, A. et. al. Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental mechanism underlting the cancer phenotype. **Vet. Comp. Oncol.** 11: 169-184. 2013

CIANCIOLO, R. E. et. al. World small animal veterinary association renal pathology initiative: classificaction of glomerular diseases in dog. **Veterinary Pathology.** 53: 113 – 135. 2016.

CORBETT, C. E. et. al. Regression of diffuse intralobular liver fibrosis associated with visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 49, 616-624. 1993.

COSTA F. A. et. al. CD4(+) T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, 33:1455-1458. 2000.

COSTA, F. A. et al. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Vet Pathol**, v. 40, n. 6, p. 677-84. 2003.

COSTA M.M. et. al. Cervical, Mandibular, and Parotid Lymph Nodes of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*: A Histopathologic and Immunohistochemistry Study and Its Correlation with Facial Skin Lesions. **Vet Pathol.** V. 45: 613-6, 2008.

COSTA, F. A. et al. T cells, adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis. **BMC Infect Dis**, v. 10, p. 112. 2010.

DEANE, L. M. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. Hospital 47, 75–87. 1955.

DE BRITO, T. et. al. Glomerular involvement in human kala-azar. A light, immunofluorescent, and electron microscopic study based on kidney biopsies. **Am J Trop Med Hyg**, 24:9-18. 1975.

DU, R. et. al. Matrix metalloproteinase-2 regulates vascular patterning and growth affecting tumor cell survival and invasion in GBM. **Neuro Oncol**. 10: 254–264. 2008.

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

DUFFIELD, J. S. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. **The Journal of clinical investigation**. 124: 2299-2306. 2014

EFSTRATIADIS, G. et. al. Renal involvement in a patient with visceral leishmaniasis. **Nephrol Dial Transplant**. 21(1):235-6. 2006.

ESCH, K. J. et. al. Activation of autophagy and nucleotide-binding domain leucine-rich repeat – Containing-like receptor family, pyrin domain-containing 3 inflammasome during *Leishmania infantum*- associated glomerulonephritis. **The American journal of pathology**. Vol.185. 2015.

FERNÁNDEZ-COTRINA J, et. al. Experimental model for reproduction of canine visceral leishmaniosis by *Leishmania infantum*. **Vet Parasitol**. 18;192(1-3):118–28, 2013.

FERNANDES A. P. et. al. Protective immunity against challenge with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**. 29; 26(46):5888-95. 2008.

FRIEDMAN, S.L. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. **Nature clinical practice** 1, 98-105. 2004.

GEORGE, et al. Canine leishmaniasis with amyloidosis. **Vet Pathol**, v. 13, n. 5, p. 365-73, 1976.

GENARO, O. **Leishmaniose Visceral Canina Experimental**.202 (Doutorado). Instituto de Ciencias Biologicas, UFMG, Belo Horizonte. 1993.

GEWIN, L. S. Renal Fibrosis: primacy of the proximal tubule. **Matrix biology**. 1431: 1-15. 2017.

GIANNANDREA, M. et. al. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. **Disease Models & Mechanisms**. 7: 193-203. 2014.

GHOSH, A. et al. Isolation of a laminin-binding protein from the protozoan parasite *Leishmania donovani* that may mediate cell adhesion. **The Biochemical journal**, v. 337 (Pt 3), p. 551-8. 1999.

GONÇALVES, R. et al. Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a histopathological and morphometric study. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 45, n. 3, p. 153-8, May-Jun 2003.

GOTO, H. et. al. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**.37(4):615-23. 2004.

GOTO, Y. et al. Accumulation of macrophages expressing MRP8 and MRP14 in skin lesions during *Leishmania major* infection in BALB/c and RAG-2 knockout mice. **Parasitol Int**, v. 56, n. 3, p. 231-4, 2007.

GRIMALDI, G. & TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical microbiology reviews** 6, 230–50. 1993.

GRIMALDI, G. et. al. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **The American journal of tropical medicine and hygiene** 41, 687–725. 1989.

GIUNCHETTI, R. C. et. al. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of comparative pathology** 135, 100-107. 2006.

GILL, S. E. and PARKS, W. C. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 40, 1334-1347. 2008.

HERNÁNDEZ, L. et. al. Course of experimental infection of canine leishmaniosis: follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques. **Vet parasitol.** 207:149-55, 2015.

HUMPHREYS, B. D. et. al. Face tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myfibroblasts in kidney fibrosis. **Am. J. Pathol.** 176: 85-97. 2010.

HUMPHREYS, B.D. Mechanisms of Renal Fibrosis. **Annu Rev Physiol.** 80: 309-326. 2018.

HOSEIN S. et. al. Transcription of Toll-Like Receptors 2, 3, 4 and 9, FoxP3 and Th17 Cytokines in a Susceptible Experimental Model of Canine *Leishmania infantum* Infection. **PLoS One.** 14;10: e0140325, 2017.

KAISLING, B. et. al. Renal epithelial injury and fibrosis. **Biochim. Biophys. Acta** 1832: 931–939. 2013.

KEENAN, C. M. et. al. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology. **Vet Pathol.**, 21(1): p. 80-6. 1984.

KOUTINAS A. F., KOUTINAS C.K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Vet. Pathol.** 51:525–539. 2014.

KISSELEVA, T., BRENNER, D.A. Mechanisms of fibrogenesis. **Experimental biology and medicine.** Maywood, N.J 233, 109-122. 2008.

JUN L. et. al. Significance of CD163-Positive Macrophages in Proliferative Glomerulonephritis. Clinical investigation. V. 350, N. 5. 2015.

LAI, W. L. et. al. Membranous nephropathy: A review on the pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Journal of Formosan Medical Association**. 114: 102-111. 2015.

LAINSON, et. al. Leishmaniasis in brazil: XVII. Enzymic characterization of a *leishmania* from the armadillo, *dasybus novemcinctus* (edentata), from Pará state. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 76, 810–811. 1982.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 421-4,.1987.

LEANDRO C. et. al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. **Vet Immunol Immunopathol**. 79:273-84, 2001.

LEBLEU, V. S. et. al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. **Nat. Med**. 19, 1047–1053. 2013.

LI, J. et. al. Significance of CD163-Positive Macrophages in Proliferative Glomerulonephritis. **The American journal of the medical sciences** 350, 387–92. 2015.

LIMA, W. G. et. al. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta tropica** 92, 43-53. 2004.

LIU, Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. . **JASN**. 21: 212-222. 2010

MADEIRA, I. M. V. M. et. al. Immunohistochemical study of hepatic fibropoiesis associated with canine visceral leishmaniasis. **Int. J. Exp. Pathol**. 97, 139–149. 2016.

MANGOUD, A. M. et. al. Histopathological studies of Syrian golden hamsters experimentally infected with *Leishmania D. infantum*. **J Egypt Soc Parasitol.** 27:689-702. 1997.

MACK, M. et. al. Origen of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis. *Kidney international.* 2014.

MANICONE, A. M. and MCGUIRE, J. K. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. **Semin. Cell Dev. Biol.** 19, 34-41. 2008.

MARCUSSEN, N. et. al. Interstitial nephritis and glomerulonephritis in visceral leishmaniasis in a dog. A case report. **APMIS**, 97:1137-1140.1989.

MARTINEZ-MORENO, A. et. al. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. and immunopat.** 48: 209-220. 1995.

MARTÍNEZ-ORELLANA, P. et. al. The inflammatory cytokine effect of Pam3CSK4 TLR2 agonist alone or in combination with *Leishmania infantum* antigen on ex-vivo whole blood from sick and resistant dogs. **Parasit Vectors.** 10:123. 2017.

MAURICIO, I. L. et. al.. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology today**, v. 16, n. 5, p. 188-9, 2000.

MELENEY, H. E. The Histopathology of Kala-Azar in the Hamster, Monkey, and *Man.* **Am J Pathol.** (1): 147-168. 1925a.

MELO, F. et. al. Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **The American journal of tropical medicine and hygiene** 79, 198-204. 2008.

MELO, F. et. al. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **International journal of experimental pathology** 90, 538-548. 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral Grave Normas e Condutas Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília – DF, 2006

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA 2.^a edição atualizada Série A. Normas e Manuais Técnicos, 2007.

MIRÓ G. et. al. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends Parasitol.** 24(8):371-7. 2008.

MOLANO I. et. al. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. **Vet Immunol Immunopathol.** 92:1-13, 2003.

MORENO J, ALVAR J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol.** 18(9):399-405. 2002.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of leukocyte biology** 73, 209–12. 2003

NIETO, C. G. et. al. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. **Vet Parasitol**, 45:33-47. 1992.

NIETO C. G. et. al. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol.** 67:117-30, 1999.

NOSEWORTHY, J. H. et. al. Multiple sclerosis. **N. Engl. J. Med.** 343: 938–952. 2000.

OLIVEIRA, A. V. et. al. Mesangial proliferative glomerulonephritis associated with progressive amyloid deposition in hamsters experimentally infected with *Leishmania donovani*. **Am J. Pathol.**, 120:256-262. 1985.

OLIVEIRA, G.G.S. et. al. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J.**, 88: 243-248, 1993.

ORTIZ, M. et. al. Glomerulonephritis and cryoglobulinemia: first manifestation of visceral leishmaniasis. **Clin Nephrol.** 83: 370-7. 2015.

PATHAK, S. et. al. IL-1b is overexpressed and aberrantly regulated in corticosteroid nonresponders with autoimmune inner ear disease. **J. Immunol.** 186: 1870–1879. 2011.

PARANHOS-SILVA M. et. al. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. **Vet Parasitol.** 114:97-111; 2003.

PARKS, W. C. et. al. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.** 4, 617-629. 2004.

PINELLI, E. et. al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect-Immun**, 62: 229-235, 1994.

PRATA, L. O. et. al. ACE2 activator associated with physical exercise potentiates the reduction of pulmonary fibrosis. **Exp Biol Med.** 0: 1–142016;

PRIANTI, M. G. et. al.. (*Leishmania*) *chagasi*-infected mice as a model for the study of glomerular lesions in visceral leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res.** Jun;40(6):819-23. 2007

POOT, J. et. al. Detailed analysis of an experimental challenge model for *Leishmania infantum* (JPC strain) in dogs. **Vet Parasitol.** 10;130:41-53. 2005.

RA, H. J. and Parks, W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biol.** 26, 587-596. 2007.

RHALEM, A. et. al. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Vet Parasitol.** 81:173-84, 1999.

REQUENA, J. M. et. al. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. **Vet Immunol Immunopathol.** 76:269-81. 2000.

RIERA, C. et. al. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. **Vet Parasitol.** 84:33-47, 1999.

RIGO, R. S. et. al. Renal Histopathological findings in dogs with visceral leishmaniasis. **Rev. Int. Med. Trop. São Paulo.** 113-116, 2013.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. et. al. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. **Int J Parasitol.** 37(6):683-93. 2007.

RODRIGUES-ITURBE, B. et. al. Tubulointerstitial damage and progression of renal failure. **Kidney int.** 68: 82-86. 2005.

RODRIGUES-ITURBE, B. et. al. The role of tubulointerstitial inflammation in the progression of chronic renal failure. **Nephron Clin. Pract.** 116: 81-88. 2010.

ROCK, K. et. al., The sterile inflammation response. **Annu Rev. Immunol.** 28: 321-242. 2010.

ROMANO, A. et. al. Divergente roler for Ly6C+ CCR2+ CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intraphagosomal pathogen *Leishmania major*. **Plos pathogens**. 2017

ROSS, R. Further Notes on Leishman's Bodies. **Br Med J**, v. 2, n. 2239, p. 1401. 1903.

SBATELLA, D. et. al. Human matrix metalloproteinases: An ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. *Molecular Aspects of Medicine* 33: 119–208. 2012.

SANTOS-GOMES G. M. et. al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet Immunol Immunopathol.** 88:21-30, 2002.

SACKS, D. et. al. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interaction in leishmaniasis. **Annu.Rev. Microbiol.** v.55, pg.453–483, 2001.

SANCHEZ, M. A. et al. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg**, v.70, n.6, Jun, p.618-24. 2004.

SARTORI, A. et. al. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. **Parasite Immunol.** 9: 93-103. 1987.

SAVAN, R. et al. Structural conservation of interferon gamma among vertebrates. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20(2):115-24. 2009

SETHI, S.; FERVENZA, F. C. Membranoproliferative glomerulonephritis--a new look at an old entity. **N Engl J Med**, v. 366, n. 12, p. 1119-31. 2012.

SHERLOCK I. A. , et. al. Preliminary results of a project about the ecology of *Phlebotomus* vectors of cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia. **Rev Soc Bras Med Trop.** 29(2):207-14. 1996.

SILVA, L. C. et. al. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. **Int. J. Exp. Path.** 94, 133–143. 2013.

SILVEIRA, F. T. et. al. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 99, 239–251. 2004.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. **Vet Q**, v. 10, n. 1, p. 1-16. 1988.

SOLANO-GALLEGO L. et. al. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Vet Parasitol.** 10:37-45; 2000.

SOLANO-GALLEGO L. et.al. Group. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasit Vectors.** 20;4:86, 2011.

SOLANO-GALELO, L. *Leishmania infantum*-specific production of IFN- γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. **Parasites & Vectors** 9:317. 2016.

SOUZA, C. C. et. al. A potencial link among antioxidant enzymes, histopathology and trace elements in canine visceral leishmaniasis. **Int. J. Pathol.** 95: 260 -270. 2014.

SNELGROVE, S. et. al. Renal dendritic cells adopt a pro-inflammatory phenotype in obstructive uropathy to activate T cells but do not directly contribute to fibrosis, **Am. J. Pathol.** 180: 91–103. 2012.

STEINBRINK, K. et al. Ineffective elimination of *Leishmania major* by inflammatory (MRP14-positive) subtype of monocytic cells. **Immunobiology** 202, 442–59. 2000.

SUNDERKÖTTER, et. al. Alpha-MSH reduces vasculitis in the local Shwartzman reaction. ***Annals of the New York Academy of Sciences*** 885, 414–8. 1999.

TAFURI, W. L. et. al. Estudo ao microscópio óptico e eletrônico de rim de cães natural e experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. ***Rev Inst Med Trop Sao Paulo***. 31:139-45. 1989.

TAFURI, W. L. et. al. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. ***Rev Inst Med Trop Sao Paulo*** 38, 81-89. 1996

TAFURI, W. L. et. al. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. ***Veterinary parasitology*** 96, 203-212. 2001.

TAKAMIYA, Y. et. al. Experimental diabetic nephropathy is accelerated in matrix metalloproteinase-2 knockout mice. ***Nephrol. Dial. Transplant.*** 28, 55-62. 2013.

TOLEZANO, J. E. et. al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, ***Brazil.Vet.Parasitol.*** v.149, p.280-284, 2007.

TRYPHOMAS, L. et. al. Visceral leishmaniasis in a dog: clinical hematological and pathological observations. ***Canad. J. comp. Med.***, 41: 1-12, 1977.

YANG, Y. et al. Determination of passive-sampled sulphur dioxide in ambient air as sulphate ion by flow injection analysis with an in-line reaction column. ***Talanta*** 45, 445–50. 1997.

YANG, L. et. al. Pathophysiology of acute kidney injury to chronic kidney disease: maladaptive repair. ***Contrib. Nephrol.*** 174 149–155. 2011.

VALKOVA, M. Hepatic fibrogenesis. ***Bratisl Lek Listy***, v. 103, n. 2, p. 76-85, 2002.

VALLADARES J. E. et. al. Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Vet Parasitol.** 75(1):33-40, 1998.

VAN DEN STEEN, P. E. et. al. Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP- 2/LIX and modulate their physiological activities. **Eur. J. Biochem.** 270, 3739-3749. 2003.

VENKATACHALAM, M. et. al. Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease, **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** 298 F1078–F1094. 2010.

VEGA, G. et. al. the cellular and signaling conducted by TGF- β contributing to renal fibrosis. **Cytocine.** 88: 115-125. 2016.

VERESS, B. et. al.. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. **Immunol.**, 33: 605-610, 1977

WEISINGER, J. R. et. al. Clinical and histological kidney involvement in human kala-azar. **Am J Trop Med Hyg**, 27:357-359. 1978.

WYNN, T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **The Journal of pathology** 214, 199-210. 2008.

ZITTA, K. et. al. Interleukin-1beta regulates cell proliferation and activity of extracellular matrix remodelling enzymes in cultured primary pig heart cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 399, 542–547. 2010.

ZHAO, H. et. al. Matriz metalloproteinases contribute to kidney fibrosis in chonic kidney diseases. **World Journal of nephrology.** 2: 84-89. 2013.

ZHOU, et. al., Interactions between beta-catenin and transforming growth factor beta signaling pathways mediate epithelial mesenchymal transition and are dependent of the transcriptional co-activator cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP). **J. Bio. Mem.** 287:7026-7038. 2012.

ANEXOS

9.ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO ADRIANO FRANCISCO ALVES

Realizou-se, no dia 20 de abril de 2018, às 09:00 horas, Sala de Reuniões Departamento de Patologia Geral, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ESTUDO HISTOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO RENAL COM ENFASE A FIBROPOESE*, apresentada por ADRIANO FRANCISCO ALVES, número de registro 2016662802, graduado no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Wagner Luiz Tafuri - Orientador (UFMG), Prof(a) Helida Monteiro de Andrade (Co-orientadora) UFMG, Prof(a). Eduardo Alves Bambirra (UFMG), Prof(a). Washington Luis Conrado dos Santos (UFBA), Prof(a). Wanderson Geraldo de Lima (UFOP), Prof(a). Marilene Suzan Marques Michalick (UFMG).

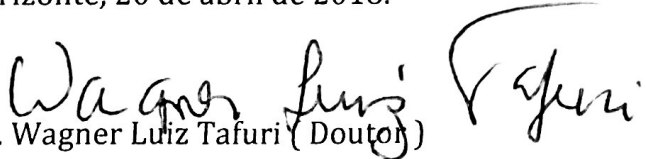
A Comissão considerou a tese:

Aprovada


Reprovada

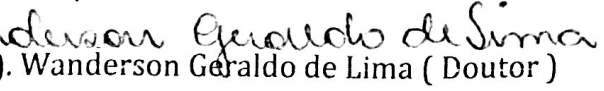
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

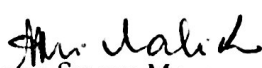
Belo Horizonte, 20 de abril de 2018.

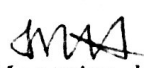

Prof(a). Wagner Luiz Tafuri (Doutor)


Prof(a). Eduardo Alves Bambirra (Doutor)


Prof(a). Washington Luis Conrado dos Santos (Doutor)


Prof(a). Wanderson Geraldo de Lima (Doutor)


Prof(a). Marilene Suzan Marques Michalick (Doutora)


Prof(a) Helida Monteiro de Andrade (Doutora)

Manuscript Number:

Title: Histological renal study of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*

Article Type: Research paper

Keywords: canine visceral leishmaniasis; kidney; glomerulonephritis; BH401 strain.

Corresponding Author: Professor Wagner Luiz Tafuri, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Minas Gerais

First Author: Adriano F Alves

Order of Authors: Adriano F Alves; Ramon A Pereira; Daniel C Dias; Pedro P Teles; Helida M Andrade; Stanley A Araujo; Wagner Luiz Tafuri, PhD

Abstract: SUMMARY

Our aim was to assess renal histopathology in dogs naturally and experimentally infected with known strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*. Samples were divided into three groups: 62 naturally infected with *L. infantum*, classified as symptomatic dogs; 17 dogs experimentally infected with two distinct strains of *L. infantum* (6 dogs with BH401 and 11 dogs with strain BH400); and four dogs uninfected controls. Samples were stained with Hematoxylin-Eosin to routine histology, Congo red to visualize amyloid protein deposits, periodic acid-Schiff (PAS) to identify glomerular basal membrane anomalies, Masson's trichrome for collagen deposits, and Jones' methenamine silver to reveal membranous glomerulonephropathy. Immunohistochemistry was used to identify *Leishmania* amastigotes. The most common lesions were membranoproliferative glomerulonephritis (82%), membranous nephropathy (18%) and interstitial nephritis, which was found in 100% of dogs naturally and experimentally infected with *L. infantum* strain BH401. The BH401 strain of *L. infantum* may lead to kidney disease that has been described in visceral leishmaniasis in both dogs and humans.

Histological renal study of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*

TO WHOM IT MAY CONCERN

We the declare that this is an academic study without any conflict of inters. Our aim was to assess renal histopathology in dogs naturally and experimentally infected with known strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*. We investigate the virulence of two distinct strains of *L. infantum* regarding the renal pathology in comparision to naturally infected dogs and controls. The most common lesions were membranoproliferative glomerulonephritis (82%), membranous nephropathy (18%) and interstitial nephritis, which was found in 100% of dogs naturally and experimentally infected with *L. infantum* strain BH401. The BH401 strain of *L. infantum* may lead to kidney disease that has been described in visceral leishmaniasis in both dogs and humans.

AUTHORS AFFILIATIONS

Adriano Francisco Alves: *Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.* E-mail: adrianofalves@gmail.com

Ramon de Alencar Pereira: *Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.* E-mail: ramon2alencar@gmail.com

Daniel do Carmo Dias: *Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.* E-mail: danieldiasc@gmail.com

Pedro Paulo de Abreu Teles: *Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.* E-mail: pedroabreu.vet@gmail.com

Helida Monteiro Andrade: *Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.* E-mail: helidandrade@gmail.com

Stanley Almeida de Araújo: *Departamento de Anatomia Patológica, Departamento de Ciências Biológicas (DCBI), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brasil.* E-mail: stanleyaa@gmail.com

Wagner Luiz Tafuri: *Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.* E-mail: wagnertafuri@gmail.com

Correspondence: Wagner L. Tafuri, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

E-mail: wagnertafuri@gmail.com

1 **Histological renal study of dogs naturally and experimentally infected**
2 **with *Leishmania (Leishmania) infantum***

3

4 Adriano Francisco Alves*, Ramon de Alencar Pereira*, Daniel do Carmo Dias*,
5 Pedro Paulo de Abreu Teles*, Helida Monteiro Andrade.†, Stanley Almeida de
6 Araújo‡ and Wagner Luiz Tafuri*.

7

8 * *Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade*
9 *Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil* †

10 *Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade*
11 *Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil* and ‡

12 *Departamento de Anatomia Patológica, Departamento de Ciências Biológicas*
13 *(DCBI), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brasil*

14

15

16

17

18 **Correspondence:** Wagner L. Tafuri, Departamento de Patologia Geral, Instituto de
19 Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo
20 Horizonte, Minas Gerais, Brasil

21 E-mail: wagnertafuri@gmail.com

22

23

24

25 **SUMMARY**

26 Our aim was to assess renal histopathology in dogs naturally and experimentally
27 infected with known strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*. Samples were
28 divided into three groups: 62 naturally infected with *L. infantum*, classified as
29 symptomatic dogs; 17 dogs experimentally infected with two distinct strains of *L.*
30 *infantum* (6 dogs with BH401 and 11 dogs with strain BH400); and four dogs
31 uninfected controls. Samples were stained with Hematoxylin-Eosin to routine
32 histology, Congo red to visualize amyloid protein deposits, periodic acid-Schiff
33 (PAS) to identify glomerular basal membrane anomalies, Masson's trichrome for
34 collagen deposits, and Jones' methenamine silver to reveal membranous
35 glomerulonephropathy. Immunohistochemistry was used to identify *Leishmania*
36 amastigotes. The most common lesions were membranoproliferative
37 glomerulonephritis (82%), membranous nephropathy (18%) and interstitial nephritis,
38 which was found in 100% of dogs naturally and experimentally infected with *L.*
39 *infantum* strain BH401. The BH401 strain of *L. infantum* may lead to kidney disease
40 that has been described in visceral leishmaniasis in both dogs and humans.

41

42 **Keywords**

43 canine visceral leishmaniasis, kidney, glomerulonephritis, BH401 strain

44

45 **Introduction**

46 Visceral leishmaniasis (VL) is a frequent cause of renal damage that progresses to
47 chronic disease in humans (De Brito *et al.* 1975; Weisinger *et al.* 1978; Dutra *et al.*
48 1985; Ortiz *et al.* 2015), in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania)*
49 *infantum* (George *et al.* 1976; Marcussen *et al.* 1989; Mancianti *et al.* 1989; Tafuri *et*
50 *al.* 1989; Poli *et al.* 1991; Nieto *et al.* 1992; Costa *et al.* 2003; Aresu *et al.* 2007; Rigo
51 *et al.* 2013); in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* (Tafuri *et al.*
52 1989) and *Leishmania donovani* (Keenan *et al.* 1984); in hamsters *Mesocricetus*
53 *auratus* (Agu *et al.* 1981; Oliveira *et al.* 1985; Sartori *et al.* 1987; Mangout *et al.* 1997;
54 Requena *et al.* 2000); and in mice infected with *L. infantum* (Prianti *et al.* 2007). In
55 both natural and experimental infections with visceral leishmaniasis, authors describe
56 irregular increase in thickness of the glomerular basal membrane and swelling of the
57 mesangial matrix, signs of chronic glomerulonephritis in humans and dogs.

58 Canine visceral leishmaniasis (CVL) is associated with a high prevalence of
59 chronic renal disease (Costa *et al.* 2003), but clinical signs of dysfunction appear only
60 with extensive tissue injury (Ciaramella *et al.* 1997; Aresu *et al.* 2010; Cianciolo *et al.*
61 2016). Azotemia, typical of renal failure, is an uncommon laboratory finding evident
62 only when the majority of nephrons are dysfunctional, late in disease progression
63 (Plevraki *et al.* 2006). On the other hand, anatomical studies have shown broad
64 variation in lesions attributable to visceral leishmaniasis, but, in general, the
65 pathogenesis of canine renal disease has been considered to be a multifactorial
66 process related to immune complex deposition as a consequence of antigen
67 persistence and circulating immune complexes (Costa *et al.* 2003; Aresu *et al.* 2007).
68 This process triggers the activation of the complement system (C3 cleavage), which
69 leads to acute injury to the glomerular capillaries and mesangium. Costa *et al.* (2000,

70 2010) described the role of CD4⁺ T lymphocytes and adhesion molecules in the
71 pathogenesis of glomerulonephritis.

72 Cianciolo et al. (2016) proposed a classification for canine glomerular diseases
73 using light microscopy, immunofluorescence, and electron microscopy of 89 kidney
74 biopsies obtained from dogs with a history of proteinuria. Authors considered 114
75 histological parameters, classifying them as: (1) membranoproliferative
76 glomerulonephritis (MPGN), (2) membranous glomerulonephritis (MGN), (3) focal
77 segmental glomerulonephritis (FSGN), and (4) sclerosing glomerulonephritis. Chronic
78 interstitial nephritis is also a frequently seen lesion in CVL. This is characterized by
79 multifocal or diffuse infiltration of plasma-like cells (Aresu et al. 2012).

80 The aim of this study was to analyze and characterize glomerulonephritis and
81 interstitial nephritis in dogs naturally and experimentally infected with two distinct
82 strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*.

83

84 **Materials and methods**

85 *Naturally infected dogs*

86 We analyzed renal samples obtained from 62 mixed-breed mature dogs of both
87 sexes, naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*. All dogs were
88 obtained from the Zoonosis Control Center of the municipalities of Ribeirão das
89 Neves and Santa Luzia (Belo Horizonte Metropolitan area), Minas Gerais State,
90 Brazil. Assessment was made by serological tests, indirect immunofluorescence
91 antibody test (IFAT) (Titer, 1:40 dilution), and enzyme linked immunosorbent assay
92 (ELISA) (optical density, 100; 1:400 dilution). Previous work of our group using dogs
93 obtained from the metropolitan area of Belo Horizonte demonstrated the presence of
94 *L. infantum* using polymerase chain reaction (PCR) (Amorim et al., 2011). All dogs

95 were clinical classified as symptomatic animals in according to Solano-Gallego *et al.*
96 (2009), considering clinical signs such as lymphadenopathy, skin lesions, weight loss,
97 and hepatosplenomegaly.

98

99 *Parasites for experimental infection*

100 Promastigotes of *L. (L.) infantum* MCAN/BR/2002/BH401 (BH401) and *L. (L.)*
101 *infantum* MCAN/BR/2000/BH400 (BH400) strains isolated from spleen of infected
102 hamsters were cultured at 25°C in α -Mem medium (Cultilab) supplemented with 10%
103 (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Cultilab), 0.4 g/L NaHCO₃, 4 g/L HEPES,
104 200 U/mL penicillin (Cultilab), and 100 μ g/mL streptomycin (Cultilab), pH 7.4. Culture
105 conditions were identical for the strains (exponential growth phase 7-10 days,
106 temperature, parasite concentration, and medium) (Pires *et al.* 2013).

107

108 *Experimentally Infected dogs*

109 Animals were maintained under conditions designed to prevent spread of *Leishmania*
110 infection, after approval of experimental design and conditions by the local public
111 health authorities. The kennel was sprayed with pyrethroid insecticide and grounds
112 were secured with stainless steel fencing, as recommended by Brazilian Ministry of
113 Health. Dogs were monitored by veterinarians throughout the experiment, and the
114 invasive procedures were performed following the rules of ethical procedures in
115 animal experimentation and biosafety.

116 All dogs were negative for the presence of *Leishmania* antibodies by indirect
117 immunofluorescence (IFI titers <1:40) and ELISA. Assays were performed using
118 negative and positive control sera. In ELISA, cut-off values were determined as
119 average optical densities plus two standard deviations of that obtained from negative

120 sera (de Amorim *et al.* 2010). These dogs were obtained from seventeen 3-month-
121 old beagles of both sexes purchased from the kennel Tad's Henriques, Colombo,
122 Paraná, Brazil, a non-endemic geographic area for visceral leishmaniasis. The dogs
123 were kept in ICB kennels with feed and water *ad libitum* and vaccinated for rabies,
124 distemper, hepatitis/adenovirus type 2, leptospirosis, and parvovirus. Prior to
125 experimental infection, blood samples were collected for serological evaluation, and
126 no animals showed detectable levels of anti-*Leishmania* antibodies.

127 The dogs were divided into two groups: Group BH401 consisted of six dogs
128 infected with *L. infantum* strain MCAN/BR/2002/BH401 (strain BH401), and Group
129 BH400 consisted of 11 infected dogs with *L. infantum* strain MCAN/BR/2000/BH400.
130 All dogs were infected intravenously with 1×10^7 promastigotes/mL of *Leishmania*
131 suspended in PBS. Seroconversion was evident 90 days' post-infection, when the
132 infection was also confirmed by parasitological exam.

133

134 *Controls*

135

136 We analysed 3-month-old Beagle dogs of both sexes, purchased from the Kennel
137 Tad's Henriques, Colombo, Paraná, Brazil, a non-endemic geographic area of
138 visceral leishmaniasis. The dogs were kept in ICB kennels with feed and water *ad*
139 *libitum* and vaccinated (rabies, distemper, hepatitis / adenovirus type 2, leptospirosis
140 and parvovirus). These animals served as sentinels in the kennel having all of them
141 PCR negative for *Leishmania* DNA. The euthanasia of these animals occurred along
142 with that of the BH401 group.

143

144

145

146 *Ethics*

147 The study was submitted to and approved by the CETEA/UFMG (Ethics Committee
148 on Animal Experimentation/Federal University of Minas Gerais), protocol 198/2014.
149 All procedures involving animals were conducted according to the guidelines of the
150 Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

151

152 *Histology*

153 Paraffinized 3-4 μm renal tissue sections stained with hematoxylin and eosin were
154 analyzed from all infected dogs and controls. All slides were subsequently stained by
155 periodic acid-Schiff (PAS), Masson's trichrome and Jones' methenamine silver, to
156 characterize hyaline mesangial deposition, collagen deposits, nuclear cell
157 proliferation, the glomerulonephritis classification, respectively. Slides with 6-8 μm
158 renal tissue sections were stained with Congo red for amyloidosis study. Slides were
159 examined under an Olympus polarized light microscope (BX 41) at 200 x resolution.

160

161 *Histomorphometrics*

162 All morphometric analyzes were performed using the KS300 program contained in
163 the Carl Zeiss image analyzer (Oberkochen, Germany). For the calculation of the
164 glomerular area, a histological section of the H & E-stained kidney of each case was
165 visualized through the 40X objective of the Olympus microscope (Tokyo, Japan) for
166 the scanning of 20 random glomeruli through the Q-Color3 microchamber. The entire
167 renal interstitium was excluded from the analysis using program tools. All types of
168 glomerular pixels were selected to create a binary image and calculate the area in
169 μm^2 . Using the same images, all glomerular cells were counted interactively using

170 the same program. The methodology used for the microscopic imaging,
171 segmentation of images and the definition of morphometry conditions is described by
172 Caliari (1997).

173

174 *Detection of amastigote forms of Leishmania*

175 Deparaffinized slides of kidney tissue fragments were hydrated and incubated with
176 4% hydrogen peroxide (30 vv) in 0.01 M phosphate buffered saline (PBS; pH 7.2) to
177 block endogenous peroxidase activity, followed by incubation with normal goat serum
178 (1:50 PBS dilution) to block non-specific immunoglobulin absorption. For *Leishmania*
179 detection we used heterologous hyperimmune serum from dogs naturally infected
180 with *L. (L.) infantum* (IFAT titer >1:40) (Tafari *et al.* 2004). This canine serum was
181 applied as primary antibody and diluted to 1:50 (0.01 M PBS). Slides were incubated
182 in a humid chamber at 4°C for 18-22 h, washed with PBS, incubated with biotinylated
183 goat anti-mouse and anti-rabbit Ig (Dako, Carpinteria, CA, 192 USA; LSAB2 kit),
184 washed in PBS, and incubated with streptavidin-peroxidase complex (Dako; LSAB2
185 kit) for 20 min at room temperature. Slides were treated with 0.024%
186 diaminobenzidine (Sigma) and 0.16% hydrogen peroxidase (30 vv), dehydrated,
187 cleared, counterstained with Harris's hematoxylin, and mounted with cover slips. This
188 immunohistochemistry method was carried out using a secondary antibody not
189 specific to canine immunoglobulin, providing a cross-immune reaction as an
190 alternative method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded
191 canine tissue previously described by Tafari *et al.* (2014).

192

193 *Statistical analysis*

194 The analyzes were carried out using the program Graphpad Prisma 5.0. The tests
195 used were for groups with oneway parametric distribution ANOVA followed by post
196 Tukey test and / or unpaired Test t. For groups with non-parametric distribution
197 Kruskal-Wallis with Dunns post test. The differences were considered significant
198 when $p \leq 0.05$.

199

200 **Results**

201 *Histology*

202 All infected animals revealed glomerulonephritis, ranging from mild to intense,
203 with enlargement of the glomeruli or increased cellularity (hypertrophied and/or
204 hyperplastic endothelial cells, proliferation of mesangial macrophages, or presence of
205 inflammatory cells in the mesangium matrix) with reinforcement of the glomerular
206 lobule (clover leaf form) and excessive dilatation of the capillary loops with
207 duplication of the glomerular basement membrane. Following the histological
208 classification of Cianciolo (2016), three types of glomerulonephritis were recognised:
209 membranoproliferative, glomerulosclerosis, and membranous nephropathy. The most
210 common lesions were the membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN) and
211 membranous nephropathy (MmGN). Glomerulosclerosis was found only in the
212 BH401 group (Table 1).

213 Dogs experimentally infected with *L. infantum* strain BH401 presented
214 predominantly glomerulosclerosis. In dogs naturally infected with *L. infantum*,
215 membranoproliferative glomerulonephritis was most prevalent, followed by
216 membranous nephropathy. In the BH401 group, the main glomerular lesions were
217 characterized by glomeruli exhibiting either acellular amorphous material with an
218 acidophilic appearance and hypertrophied Bowman's capsule collapsing the

219 glomerulus (glomerulosclerosis) or acidophilic amorphous material followed by
220 hypertrophy of podocytes and the presence of mononuclear inflammatory cells such
221 as macrophages composing the crescents. They also presented a reduction in
222 Bowman's space. In the naturally infected dogs, the main glomerular lesion was
223 characterized by hypertrophy and hyperplasia of mesangial cells due to the presence
224 of macrophages, typifying membranoproliferative glomerulonephritis. However, in
225 some cases (25%) we observed the membranous nephropathy . This lesion was
226 characterized by the proliferation and/or hypertrophy of the podocytes, and reduction
227 in the number of mesangial cells. The presence of sub-epithelial hyaline material
228 revealed by PAS and more defined by Masson's trichrome staining (red) has been
229 suggested to be immune-complex deposition. In fact, the definitive diagnosis of
230 glomerulonephritis is made by Jones' methenamine silver staining (Aresu *et al.* 2012;
231 Cianciolo *et al.* 2016) (Figure 1 A-O).

232 With the exception of expansion of the mesangium and alterations of the
233 peripheral capillary loops caused by glomerulonephritis, we did not observe
234 eosinophilic or birefringent material in any renal sample of all cases (Figure 2 A-E).

235 The chronic interstitial nephritis was the secondary main lesion observed in the
236 renal parenchyma. An intense mononuclear exudate, focal or diffuse, was always
237 found composed by plasma cells, macrophages and lymphocytes. However it was
238 really marked by the predominance of plasma cells (plasmocytosis) along with
239 macrophages and lymphocytes. In addition, many plasma cells showed so-called
240 Russell corpuscles (hyaline corpuscles) in the cytoplasm structure, a finding of
241 visceral leishmaniasis. All naturally infected dogs and those experimentally infected
242 with the *L. infantum* BH401 strain presented interstitial nephritis, but this lesion was
243 only found in 25% of dogs infected with the BH400 strain (Figure 3 A-D).

244 Immunolabeled amastigote forms of *Leishmania* were found in all naturally
245 infected dogs and in those experimentally infected with the *L. infantum* BH401 strain.
246 We did not find immunolabeled *Leishmania* amastigotes in kidneys of BH400 dogs or
247 controls (Figure 4A-D).

248 All infected animals revealed glomerulonephritis, ranging from mild to intense,
249 with enlargement of the glomeruli or increased cellularity (hypertrophied and/or
250 hyperplastic endothelial cells, proliferation of mesangial macrophages, or presence of
251 inflammatory cells in the mesangium matrix) with reinforcement of the glomerular
252 lobule (clover leaf form) and excessive dilatation of the capillary loops with
253 duplication of the glomerular basement membrane. Following the histological
254 classification of Cianciolo (2016), three types of glomerulonephritis were recognised:
255 membranoproliferative, glomerulosclerosis, and membranous nephropathy. The most
256 common lesions were the membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN) and
257 membranous nephropathy (MmGN). Glomerulosclerosis was found only in the
258 BH401 group (Table 1).

259 Dogs experimentally infected with *L. infantum* strain BH401 presented
260 predominantly glomerulosclerosis. In dogs naturally infected with *L. infantum*,
261 membranoproliferative glomerulonephritis was most prevalent, followed by
262 membranous nephropathy. In the BH401 group, the main glomerular lesions were
263 characterized by glomeruli exhibiting either acellular amorphous material with an
264 acidophilic appearance and hypertrophied Bowman's capsule collapsing the
265 glomerulus (glomerulosclerosis) or acidophilic amorphous material followed by
266 hypertrophy of podocytes and the presence of mononuclear inflammatory cells such
267 as macrophages composing the crescents. They also presented a reduction in
268 Bowman's space. In the naturally infected dogs, the main glomerular lesion was

269 characterized by hypertrophy and hyperplasia of mesangial cells due to the presence
270 of macrophages, typifying membranoproliferative glomerulonephritis. However, in
271 some cases (25%) we observed the membranous nephropathy . This lesion was
272 characterized by the proliferation and/or hypertrophy of the podocytes, and reduction
273 in the number of mesangial cells. The presence of sub-epithelial hyaline material
274 revealed by PAS and more defined by Masson's trichrome staining (red) has been
275 suggested to be immune-complex deposition. In fact, the definitive diagnosis of
276 glomerulonephritis is made by Jones' methenamine silver staining (Aresu *et al.* 2012;
277 Cianciolo *et al.* 2016) (Figure 1 A-O).

278 With the exception of expansion of the mesangium and alterations of the
279 peripheral capillary loops caused by glomerulonephritis, we did not observe
280 congophilic or birefringent material in any renal sample of all cases (Figure 2 A-E).

281 The chronic interstitial nephritis was the secondary main lesion observed in the
282 renal parenchyma. An intense mononuclear exudate, focal or diffuse, was always
283 found composed by plasma cells, macrophages and lymphocytes. However it was
284 really marked by the predominance of plasma cells (plasmocytosis) along with
285 macrophages and lymphocytes. In addition, many plasma cells showed so-called
286 Russell corpuscles (hyaline corpuscles) in the cytoplasm structure, a finding of
287 visceral leishmaniasis. All naturally infected dogs and those experimentally infected
288 with the *L. infantum* BH401 strain presented interstitial nephritis, but this lesion was
289 only found in 25% of dogs infected with the BH400 strain (Figure 3 A-D).

290 Immunolabeled amastigote forms of *Leishmania* were found in all naturally
291 infected dogs and in those experimentally infected with the *L. infantum* BH401 strain.
292 We did not find immunolabeled *Leishmania* amastigotes in kidneys of BH400 dogs or
293 controls (Figure 4A-D).

294

295 *Morphometric glomerular analysis*

296 The mean size of the glomerular area in dogs infected with strain BH401 was
297 greater in comparison to that of dogs infected with BH400 strain. However, there was
298 no difference compared to the naturally infected dogs. Another parameter evaluated
299 was the glomerular cellularity that accompanied the results obtained previously
300 described. (Figures 5 and 6).

301

302 **Discussion**

303 Poli *et al.* (1991), Nieto *et al.* (1992); Costa *et al.* (2003), Zatelli *et al.* (2003), and
304 Aresu *et al.* (2012) classified distinct canine histological glomerulus lesions as
305 membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN), mesangioproliferative
306 glomerulonephritis (MSGN), membranous glomerulonephritis (MmGN), and focal
307 segmental glomerulonephritis (FSGN). Cianciolo *et al.* (2006) proposed a
308 classification of glomerular disease in dogs in which MPGN, MSGN and MmGN are
309 grouped as immune complex mediated diseases: (1) MPGN, characterized by
310 thickening of capillary loops (membranous) and increased cellularity tufts
311 (proliferative). The defining light microscopy feature of MPGN is glomerular
312 endocapillary hypercellularity characterized by increased numbers of leukocytes,
313 endothelial cells, and/or interposed mesangial cells internal to the GBM. The
314 glomeruli show distinct lobular accentuation of the vascular tufts and GBM thickening
315 may cause encroachment or obliteration of the peripheral capillary lumen.
316 Endocapillary hypercellularity is associated with interposition of mesangium and
317 sometimes immunoglobulin deposits between the endothelium and the GBM, forming
318 a new basement membrane. Commonly, the glomerular tuft nearly fills the Bowman

319 space, due to diffuse mesangial cell proliferation or expansion. (2) MmGN is
320 characterized by thickening of the capillary basement membrane, enlarging the
321 glomerular tuft. The glomeruli present uniform expansion with endocapillary
322 hypercellularity and mesangial hypercellularity is absent to minimal. A peculiar
323 histological aspect of “spikes” and “holes” are revealed by special tissue staining,
324 such as Masson trichrome and Jones methenamine silver. (3) Focal segmental
325 glomerulosclerosis is characterized histologically by mesangial matrix expansion,
326 which is stained by PAS and Jones’ silver, and accumulation of plasma proteins in
327 the form of hyaline deposits. According to some authors, FSGS in CVL occurs
328 preferentially in glomeruli juxtamedulares in areas in which capillary lumen is
329 collapsed describing the evolution of global sclerosis, with FSGS arising in a growing
330 number of clusters (Costa *et al.* 2003; Aresu *et al.* 2010).

331 In this work the MPGN was the more frequently lesion among all infected
332 animals ., especially in the naturally infected animals and BH401 groups (75%).
333 However, the glomerulosclerosis was found in 100% of BH401 group. We could
334 considered that these glomerulosclerosis were an evolution of de MPGN process
335 (Aresu, 2010). In addition, we also infere that the strain BH401, was more virulently
336 than BH400, even due BH401 showed several lesions than CNI dogs. Parasite
337 virulence is important factor in the experimental leishmaniasis. Pires *et al.* (2013), for
338 example, showed differences in virulence of *L. infantum* strains
339 MCAN/BR/2000/BH400 (BH400) and MHOM/BR/1972/BH6 (BH46). BH400-infected
340 hamsters showed greater damage in analyzed tissue than those infected with BH46,
341 confirming more significant virulence of BH400. We found the BH401 strain to be
342 more virulent than BH400, at least considering kidney pathology. In addition,
343 morphometrical analyses sustened all glomerular results pathology because BH401

344 group showed higher glomerular area cellularity than other groups. BH400 group
345 showed very low virulence because this strain behavior did not induce any lesion
346 (similar to controls).

347 Our findings of glomerulonephritis in CVL were in accordance with others (Costa
348 *et al.* 2003; Aresu *et al.* 2007). The mechanisms involved in the pathogenesis of this
349 disease have been described as type III hypersensitivity and involvement of CD4 +
350 Th lymphocytes (Costa *et al.* 2003; Aresu *et al.* 2007). The issue of hypersensitivity
351 was described in CVL (Tafari *et al.* 1989; Nieto 1992). Costa *et al.* (2010) showed the
352 role of CD4 T cells in inhibiting apoptosis of mesangial cells. However, attracted
353 attention that despite findings, the mechanism of type III hypersensitivity appears to
354 coexist with CD4 + Th lymphocytes (Aresu *et al.* 2008). Aresu *et al.* (2008) found
355 antigen-antibody complexes in kidney biopsies taken from 15 dogs naturally infected
356 with *L. infantum* in Italy. Our immunofluorescence assays showed granular deposits
357 of C3 and IgG complement fragments in glomeruli of infected animals (data not
358 shown).

359

360 All the 62 infected dogs and 17 experimental infected dogs were negative for amyloid
361 deposition. Amyloidosis has been described in visceral leishmaniasis, sometimes
362 associated with mesangial hypercellularity, in hamsters experimentally infected with
363 *Leishmania donovani* (Meleney *et al.* 1925; Duarte *et al.* 1978). The pathology is
364 invariably associated with immunoglobulins and deposits of complement factor (C3)
365 (Aresu *et al.* 2008; Costa *et al.* 2010). The tissue parasite burden in spleen and liver
366 of infected hamsters increased with polyclonal activation of B cells. Hence, after
367 development of glomerulonephritis, cell proliferation was replaced by amyloid

368 material deposits. However, we found no correlation between the presence of
369 amyloid protein and positivity for *Leishmania* in renal tissue, as has been reported in
370 experimentally infected hamsters (Oliveira *et al.* 1985) and naturally infected dogs
371 (George *et al.* 1976), and in human visceral leishmaniasis (Navarro *et al.* 2006).

372 Interstitial nephritis had been considered to be the single most important
373 nephropathy encountered in dogs (Murray *et al.* 1971). We also observed chronic
374 interstitial nephritis, dilated renal tubules sometimes containing hyaline casts;
375 albuminous degeneration of renal tubule epithelial cells; and arterioles with hyalinosis
376 of the subintimal layer (PAS positive). Following the glomerulus pathology interstitial
377 nephritis were more intense in the BH401 group reinforcing the idea the higher
378 virulence of this *Leishmania* strain. Moreover, intracellular amastigotes in
379 inflammatory macrophages were observed only in dogs naturally and experimentally
380 infected dogs with the BH401 strain. This was always associated with interstitial
381 exudate and was not observed in the glomeruli cells. The interstitial nephritis
382 observed appears similar to that described by the cited authors, except for the strong
383 presence of parasites (Marcussen *et al.* 1989; Tafuri *et al.* 1989; Costa *et al.* 2013).
384 Interstitial nephritis appears to be related to parasite load, in contrast to
385 glomerulonephritis, which seems related to immunocomplex deposits (Costa, *et al.*,
386 2013).

387 In conclusion, the primary kidney pathologies observed in this study were
388 membranoproliferative glomerulonephritis, membranous glomerulonephritis,
389 glomerulosclerosis and interstitial nephritis. The BH401 strain of *L. infantum*
390 produces kidney disease as described in visceral leishmaniasis in both dogs and
391 humans.

392

393

394 **Acknowledgments**

395 The authors thank FAPEMIG for grant APQ-01378-12, CNPq for grant
396 474665/2012-7 and grant 303022/2013-2, Lucidus Consulting for the English
397 language revision and Pro-reitoria de Pesquisa da UFMG, Programa Institucional
398 para Melhoria Qualitativa da Produção Científica da UFMG-Edital 02/2017

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408 **References**

409 Agu W.E., Farrell J.P. & Soulsby E.J. 1981. Proliferative glomerulonephritis in
410 experimental *Leishmania donovani* infection of the golden hamster. *Comp. Immunol.*
411 *Microbiol. Infect. Dis.* 4, 353-368.

412

413 Amorim I.F., Silva S.M., Figueiredo M.M., Moura E.P., Castro R.S., Lima T.K.,
414 Gontijo N.F., Michalick M.S.M., Gollob K.J., Tafuri W.L. 2011. Toll receptors type-2
415 and CR3 expression of canine monocytes and its correlation with
416 immunohistochemistry and xenodiagnosis in visceral leishmaniasis. *PloS one* 6
417 (11):e27679.

418

419 Aresu L., Valenza F., Ferroglio E., Pregel P., Uslenghi F., Tarducci A., Zanatta R.
420 2007. Membranoproliferative glomerulonephritis type III in a simultaneous infection of

421 Leishmania infantum and Dirofilaria immitis in a dog. Journal of veterinary diagnostic
422 investigation : *J. Vet. Diagn. Invest.* 19:569-572.

423

424 Aresu L., Pregel P., Bollo E., Palmerini D., Sereno A., Valenza F. 2008.
425 Immunofluorescence staining for the detection of immunoglobulins and complement
426 (C3) in dogs with renal disease. *Vet Rec* 163:679-682.

427

428 Aresu L., Zanatta R., Luciani L., Trez D., Castagnaro M. 2010. Severe renal failure in
429 a dog resembling human focal segmental glomerulosclerosis. *J. Comp Pathol.*
430 143:190-4.

431

432 Aresu L., Benali S., Ferro S., Vittone V., Gallo E., Brovida C., Castagnaro M. 2013.
433 Light and Electron Microscopic Analysis of Consecutive Renal Biopsy Specimens
434 from Leishmania-Seropositive Dogs. *Vet Pathol* .50: 753-60

435

436 Caliari M.V. 1997. Principios de Morfometria Digital: KS300 Para Iniciantes. Belo
437 Horizonte: Editora UFMG.

438

439 Ciaramella P., Oliva G., Luna R., Gradoni L., Ambrosio R., Cortese L. 1997. A
440 retrospective clinical study of a canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by
441 Leishmania infantum. *Vet. Rec.* 141:539-43.

442

443 Cianciolo RE, Mohr FC, Aresu L, Brown CA, James C, Jansen JH, Spangler WL, van
444 der Lugt JJ, Kass PH, Brovida C, Cowgill LD, Heiene R, Polzin DJ, Syme H, Vaden
445 SL, van Dongen AM, Lees GE. 2016. World Small Animal Veterinary Association

446 Renal Pathology Initiative: Classification of Glomerular Diseases in Dogs. *Vet Pathol.*
447 53:113-35.

448

449 Costa F.A., Goto H., Saldanha L.C., Silva S.M., Sinhorini I.L., Silva T.C., Guerra J.L:
450 2003. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral
451 leishmaniasis. *Vet Pathol*, 40:677-684.

452

453 Costa F.A., Guerra J.L., Silva S.M., Klein R.P., Mendonca I.L., Goto H. 2000. CD4(+)
454 T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. *Braz J Med*
455 *Biol Res*, 33:1455-1458.

456

457 Costa F.A., Prianti M.G., Silva T.C., Silva S.M., Guerra J.L., Goto H. 2010. T cells,
458 adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis
459 glomerulonephritis. *BMC Infect Dis.* 10:112.

460 de Amorim I.F., Freitas E., Alves C.F., Tafuri W.L., Melo M.N., Michalick M.S., da
461 Costa-Val A.P. 2010 Humoral immunological profile and parasitological statuses of
462 Leishmune vaccinated and visceral leishmaniasis infected dogs from an endemic
463 area. *Vet. Parasitol.* 173:55-63.

464

465 De Brito, T., Hoshino-Shimizu S., Neto V.A., Duarte I.S., Penna D.O. 1975.
466 Glomerular involvement in human kala-azar. A light, immunofluorescent, and electron
467 microscopic study based on kidney biopsies. *Am J Trop Med Hyg*, 24:9-18.

468

469 Duarte MI, Sesso A, de Brito T. 1978. Relationship between glomerular mesangial
470 cell proliferation and amyloid deposition as seen by ultrastructural and morphometric
471 analysis in experimental kala-azar of the hamster. *Am J Pathol*, 92:85-98.
472

473 Dutra M., Martinelli R., de Carvalho E.M., Rodrigues LE, Brito E, Rocha H. 1985.
474 Renal involvement in visceral leishmaniasis. *Am J Kidney Dis*, 6:22-27.
475

476 George J.W., Nielsen S.W., Shiveley J.N., Hopek S., Mroz S. 1976. Canine
477 leishmaniasis with amyloidosis. *Vet. Pathol.*, 13: 365-373.
478

479 Keenan, C.M., *et al.*, 1984. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II.
480 Pathology. *Vet Pathol.*, 21(1): p. 80-6.
481

482 Mancianti F., Poli A., Bionda A. 1989. Analysis of renal immune-deposits in canine
483 leishmaniasis. Preliminary results. *Parasitologia*, 31:213-230.

484 Marcussen N., Vetner M., Kristensen H.M. 1989. Interstitial nephritis and
485 glomerulonephritis in visceral leishmaniasis in a dog. A case report. *APMIS*, 97:1137-
486 1140.
487

488 Mangoud A.M., Ramadan M.E., Morsy T.A., Amin A.M., Mostafa S.M. 1997.
489 Histopathological studies of Syrian golden hamsters experimentally infected with
490 *Leishmania D. infantum*. *J Egypt Soc Parasitol.* 27:689-702.
491

492 Meleney, H. E. 1925a. The Histopathology of Kala-Azar in the Hamster, Monkey, and
493 *Man*. *Am J Pathol.* (1): 147-168

494

495 Murray, M, H.M. Pirie, H. Thompson, W.F,H. Jarriet and A. Wiseman. 1971.
496 Glomerulonephritis in a dog. A histological and electron microscopical study. *Res. Vet.*
497 *Sci.* 12: 493-495.

498

499 Murray, M. and N. G. Wright.1974. A morphologic study of canine
500 glomerulonephritis. *Lab. Invest.* 30: 213-221.

501 Navarro M, Bonet J, Bonal J, Romero R. 2006. Secondary amyloidosis with
502 irreversible acute renal failure caused by visceral leishmaniasis in a patient with AIDS.
503 *Nefrologia* 26:745-746.

504 Nieto C.G., Navarrete I., Habela M.A., Serrano F., Redondo E. 1992. Pathological
505 changes in kidneys of dogs with natural Leishmania infection. *Vet Parasitol*, 45:33-
506 47.

507

508 Oliveira A.V., Roque-Barreira M.C., Sartori A., Campos-Neto A., Rossi M.A. 1985.
509 Mesangial proliferative glomerulonephritis associated with progressive amyloid
510 deposition in hamsters experimentally infected with *Leishmania donovani*. *Am J.*
511 *Pathol.*, 120:256-262.

512

513 Ortiz M., Mon C., Herrero J.C., Oliet A., Rodríguez I., Ortega O., Gallar P.,
514 Hinostroza J., Cobo G., del Alamo M., Jiménez J., Torres R., Digiogia C., San Martin
515 J., Vigil A.I., Blanco J. 2015. Glomerulonephritis and cryoglobulinemia: first
516 manifestation of visceral leishmaniasis. *Clin Nephrol.* 83: 370-7.

517

518 Pires, S.M.; Fialho Jr., L.C.; Silva, S.O.; Melo, M. N.; De Souza, C. C.; Tafuri, W. L.;
519 Romero, O. B.; Andrade, H. M. 2013. Identification of virulence factors in *Leishmania*
520 *infantum* strains by a proteomic approach. *Proteome research*.
521
522 Plevraki, K., Koutinas, A.F.; Kaldrymidou, H.; Roumpies, N.; Papazoglou, L.G.;
523 Saridomichelicks, M.N.; Savvas, I., Leondides, L. 2006. Effects of allopurinol
524 treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniasis (*Leishmania*
525 *infantum*). *J. Vet. Intern. Med.* 20, 228-233.
526
527 Prianti Mg, Yokoo M, Saldanha Lc, Costa Fa, Goto H. 2007. (*Leishmania*) chagasi-
528 infected mice as a model for the study of glomerular lesions in visceral leishmaniasis.
529 *Braz J Med Biol Res.* Jun;40(6):819-23.
530
531 Poli A, Abramo F, Mancianti F, Nigro M, Pieri S, Bionda A: Renal involvement in
532 canine leishmaniasis. 1991. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-
533 microscopic study. *Nephron*, 57:444-452.
534
535 Requena J.M., Soto M., Doria M.D., Alonso C. 2000. Immune and clinical parameters
536 associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet*
537 *Immunol Immunopathol.* 76:269-81.
538 Rigo, R.S.; Carvalho C.M.E.; Honer, M.R.; Andrade, G.B.; Silva, I.S.; Rigo, L.;
539 Figueiredo, H.R. Barreto, W.T.G. 2013. Renal histological findings in dogs with
540 visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 55:113-116.
541

542 Sartori A., De Oliveira A.V., Roque-Barreira M.C., Rossi M.A., Campos-Neto A. 1987.
543 Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. *Parasite Immunol.* 9:
544 93-103.

545 Seymour, A. E., Spargo, B. H. and Penksa R. 1971. Contributions of renal biopsy
546 studies to the understanding of disease. *Am. J. Pathol.* 65: 550.

547

548 Solano-Gallego L, Koutinas A, Mirò G, Cardoso L, Pennisi M.G, Ferrer L, Bourdeau
549 P, Oliva G, Baneth G. 2009.Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment
550 and prevention of canine leishmanosis. *Vet. Parasitol.* ;65:1–18

551

552 Tafuri W.L., Michalick M.S., Dias M., Genaro O., Leite V.H., Barbosa A.J., Bambirra
553 E.A., da Costa C.A., Melo M.N., Mayrink W. 1989. Optical and electron microscopic
554 study of the kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania*
555 (*Leishmania*) *chagasi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1989, 31:139-145.

556

557 Tafuri W.L., Santos R.L., Arantes R.M. *et al.* 2004. An alternative
558 immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-
559 embedded canine tissues. *J. Immunol. Methods* 292, 17-23.

560

561 Weisinger J.R., Pinto A., Velazquez G.A., Bronstein I., Dessene J.J., Duque J.F.,
562 Montenegro J., Tapanes F., de Rouse A.R. 1978. Clinical and histological kidney
563 involvement in human kala-azar. *Am J Trop Med Hyg*, 27:357-359.

564

565

Table 1 Distribution and classification of glomerulonephritis according to Cianciolo et al. (2016) in dogs naturally and experimentally infected with *L. (L.) infantum*

Distribution and classification of glomerulonephritis			
Group	<i>n</i>	% de cases	Classification
BH 401	5	100%	Membranoproliferative– 75% Glomerulosclerosis– <u>100%</u>
BH 400	11	27,2%	Membranous nephropathy – 33,3% Membranoproliferative – 66,6%
CNI	62	100%	Membranoproliferative (75%) Membranous nephropathy (25%)
CC	4	100%	No lesion

Table 1: BH400, BH401, naturally infected dog (CNI) and control dog (CC). Hematoxylin & Eosin (H&E), Periodic Acid Schiff (PAS), Congo Red, Masson's Trichrome or Jones Silver Methenamine (JSM) were used for analysis, as seen in a 20x objective optical microscope and 40x

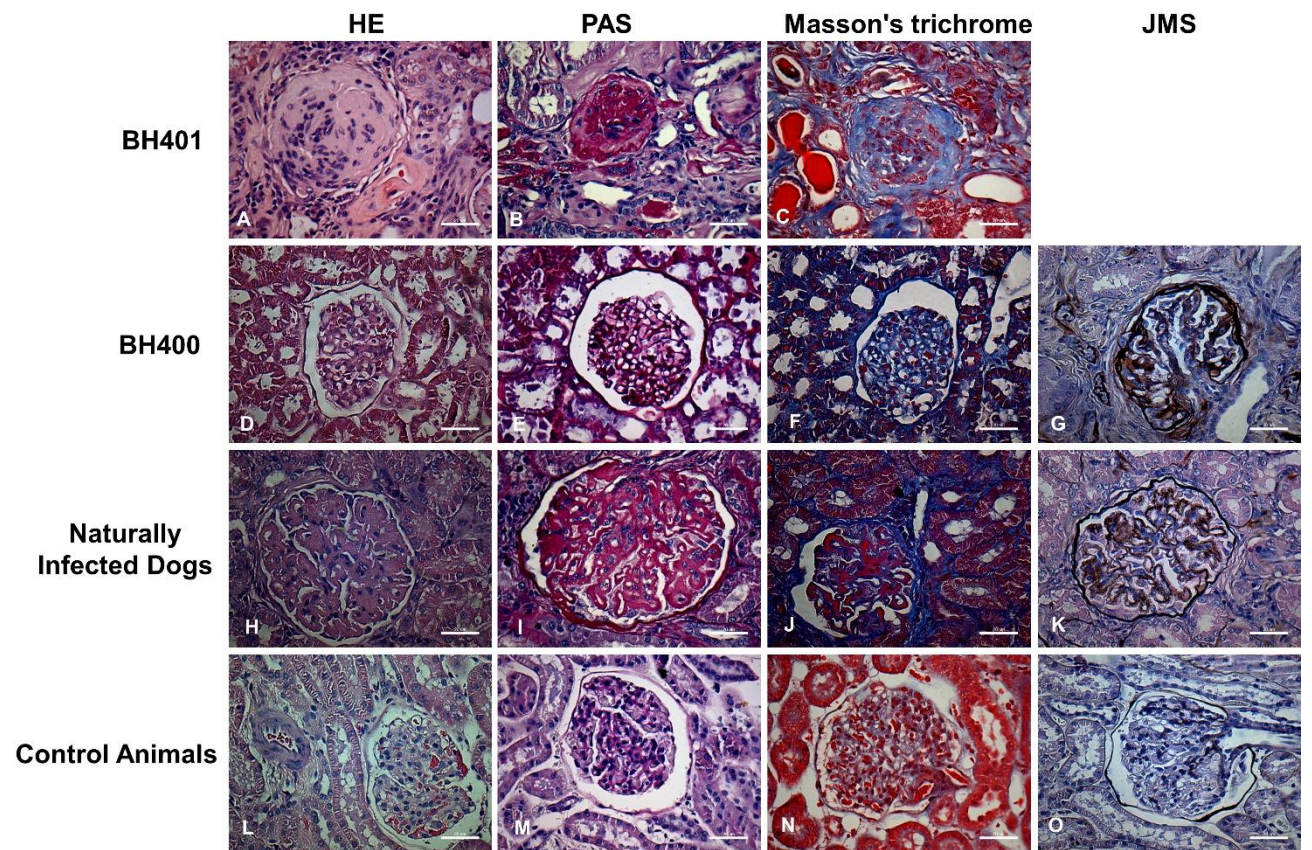


Figure 1A-O: Kidney of dogs naturally or experimentally infected with *L. infantum* stained with Hematoxylin & Eosin (H&E), Periodic Acid Schiff (PAS), Masson trichrome and Jones Metenamine Silver (JMS) . (A-C): *L. infantum* strain BH401; (D-G): *L. infantum* strain BH400; (H - K): Animal naturally infected with *L. infantum*; (L – O): controls. Deposition of collagen fibers stained blue in C, F, J (fibrosis), which does not occur in (N). NOTE: JMS was not necessary for glomerulosclerosis as described in the text.

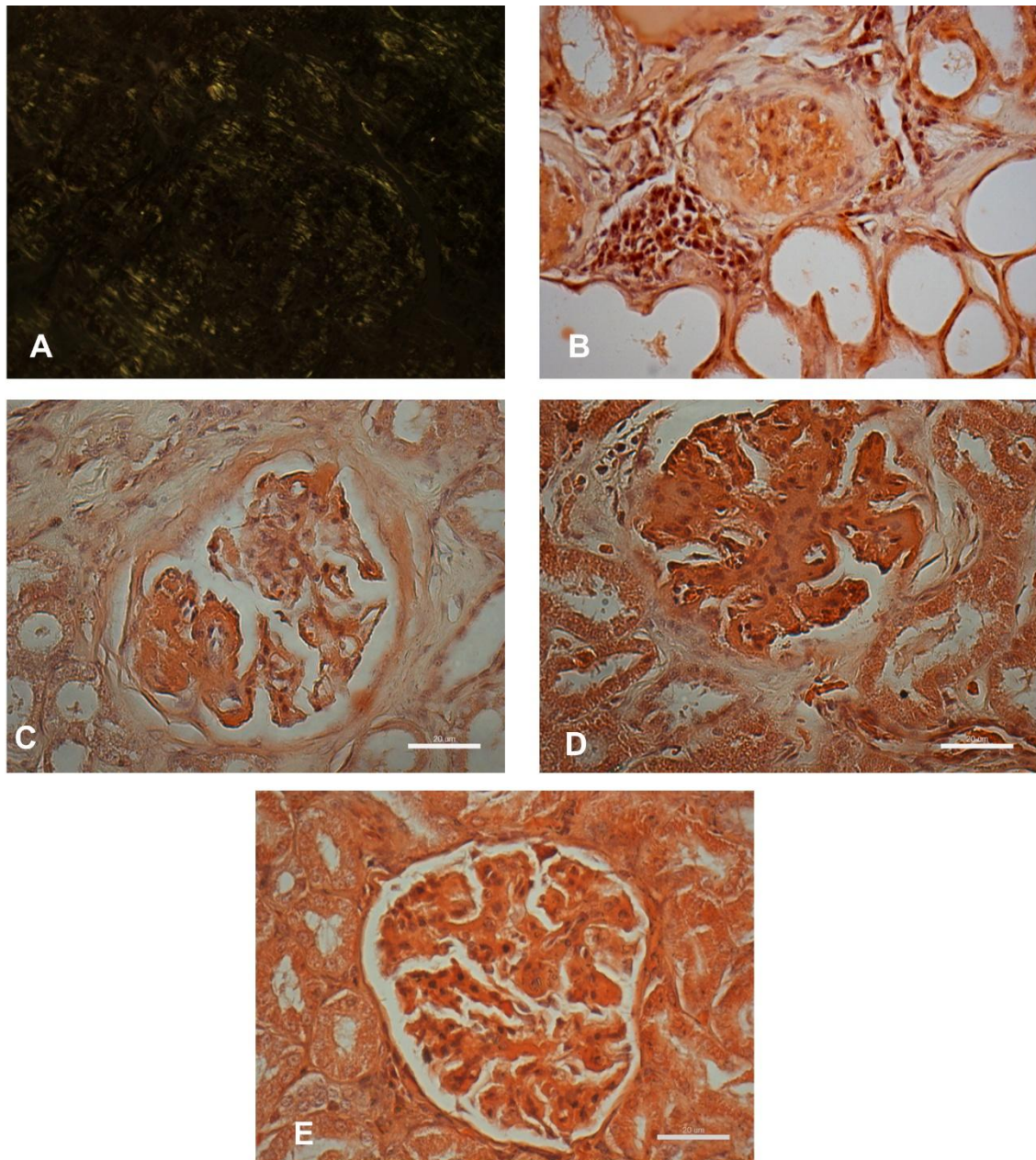


Figure 24 A-E Kidney of dogs naturally and experimentally infected with *L. infantum* and uninfected controls; Congo red staining. A: positive reaction for amyloid. B: strain BH401; C: strain BH400; D: naturally infected dog; E: control. B - E showed no positive reaction for amyloid material. Bar= 20μm.

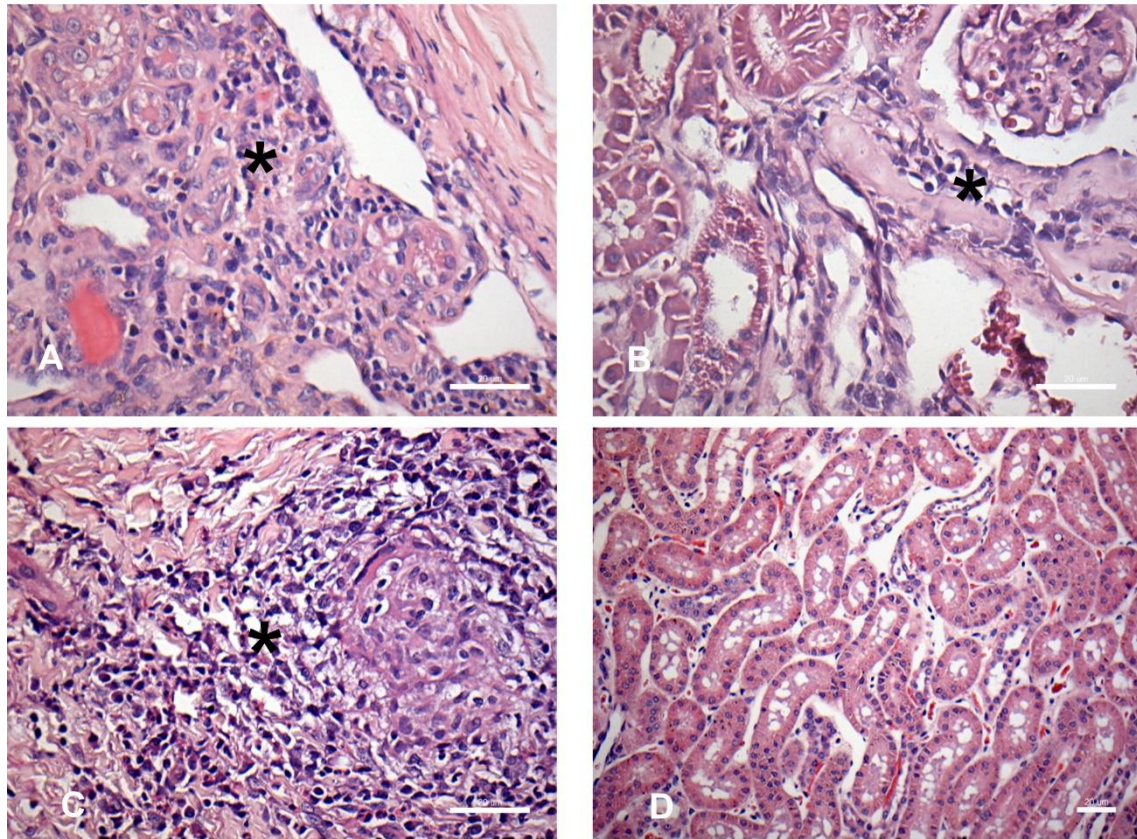


Figure 3 Kidney of dogs naturally or experimentally infected with *L. infantum*, H&E staining. (A): BH401 strain of *L. infantum*; (B): BH400 strain of *L. infantum*; (C): Animal naturally infected with *L. infantum*; D: control dog. (*) indicates presence of inflammatory cells. (A–C). Bar=20μm.

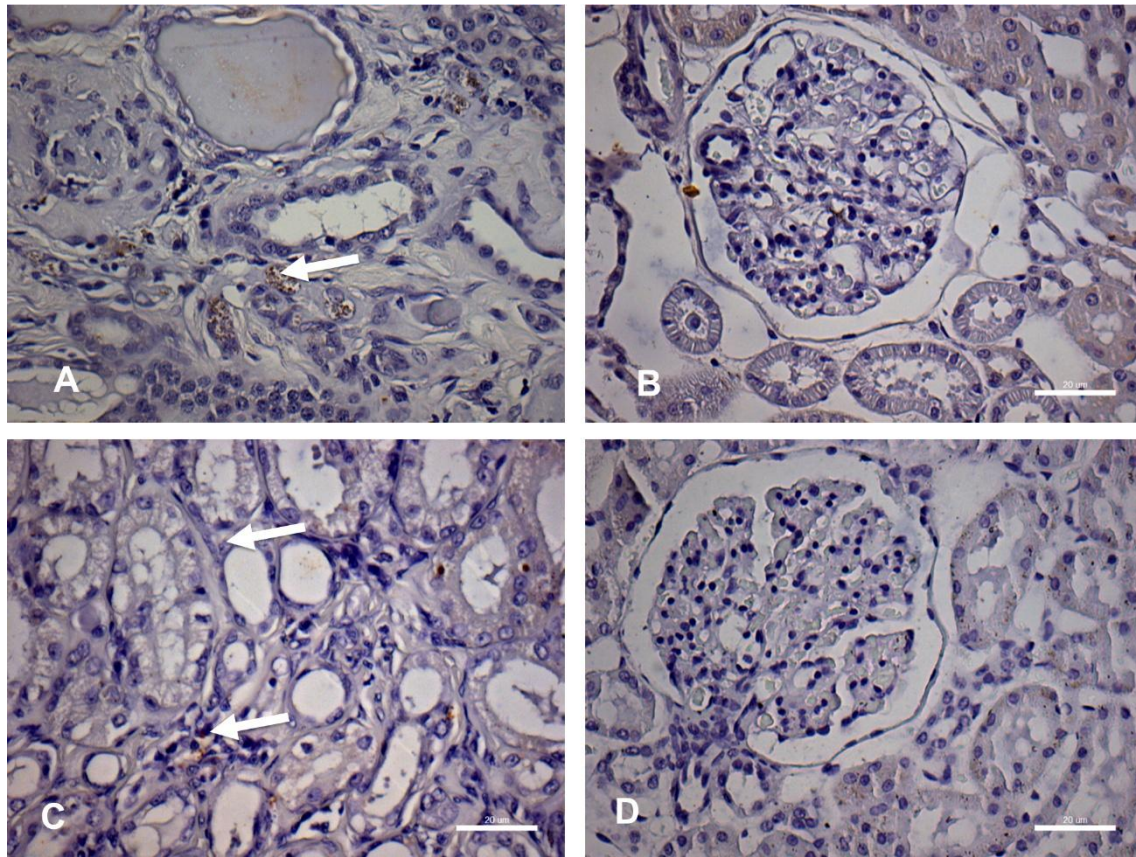


Figure 4 (A-D) Kidney of dogs naturally and experimentally infected with *L. infantum* and uninfected controls stained by the peroxidase method, immunohistochemistry. A: strain BH401; B: strain BH400; C: naturally infected animal; D: control animal. White arrows indicate immunotacted amastigote forms. Bar=20μm.

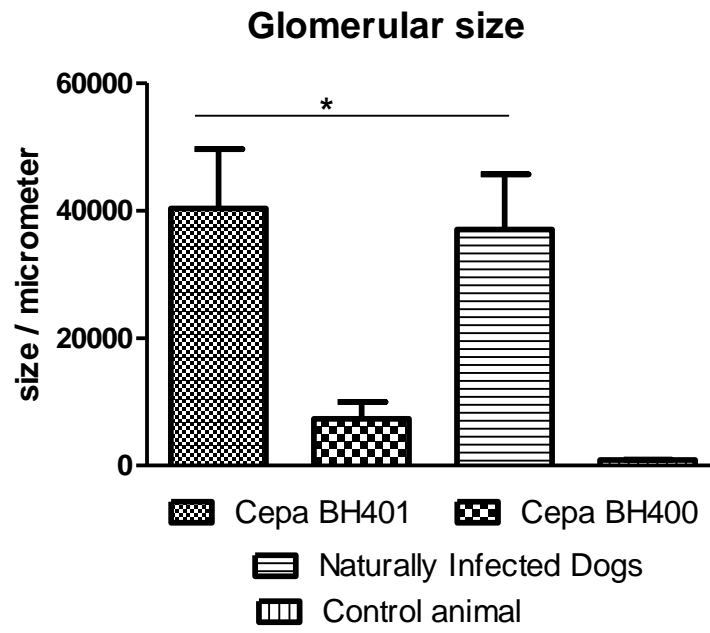


Figure 5 Mean glomerular size in kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *P < 0.05. - Anova one way seguido do pós test de Tukey.

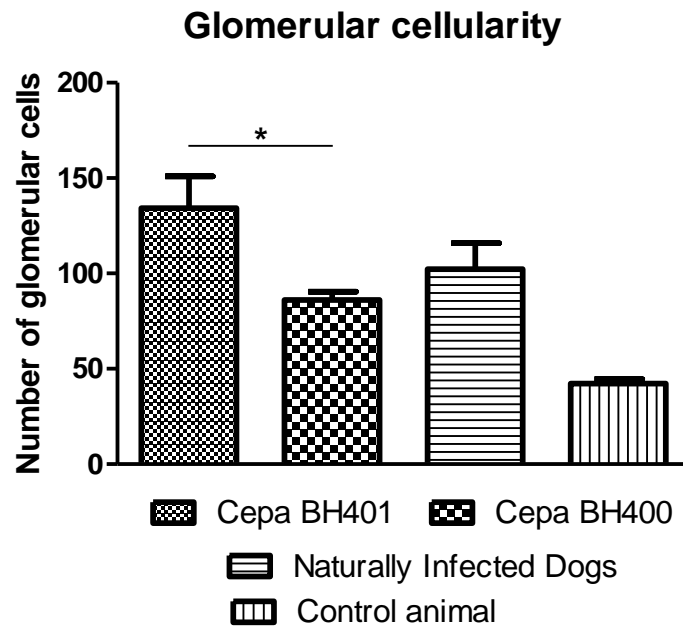


Figure 6 Mean glomerular cellularity in kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. * $P < 0.05$. - Anova one way seguido do pós test de Tukey.