

LUCILENE DOS SANTOS SILVA

Imunopatologia da nefropatia em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e co-
infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum*

TERESINA(PI)
NOVEMBRO/2015

LUCILENE DOS SANTOS SILVA

Imunopatologia da nefropatia em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e co-infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias/UFPI para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvana Maria Medeiros de S. Silva.

TERESINA(PI)
NOVEMBRO/2015

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

S586i Silva, Ludilene dos Santos
Imunopatologia da nefropatia em cães naturalmente infectados
por *Ehrlichia canis* e co-infectados com *Leishmania (Leishmania)*
infantum/ Ludilene dos Santos Silva - 2015
93 f.: il.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal
do Piauí, Teresina, 2015.

Orientação: Prof.ª. Dr.ª. Silvana Maria Medeiros da S. Silva

1. *E. canis* 2. *L. (L.) infantum* 3. Nefropatia 4. Co-infecção
I. Título

CDD 636.7089692

IMUNOPATOLOGIA DA NEFROPATIA EM CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS COM *Ehrlichia canis* E CO-INFECTADOS COM *E. CANIS*
E *Leishmania (Leishmania) infantum*

LUCILENE DOS SANTOS SILVA

Tese aprovada em: 03/11/2015

Banca Examinadora:




Prof. Dra. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva (Presidente)/DCCV/CCA/UFPI



Prof. Dra. Samantha Ive Myashiro (Externa)/USP



Prof. Dra. Maria das Graças Prianti (Externa)/IESM



Prof. Dra. Sílvia de Araújo França (Interna)/UFPI



Prof. Dra. Flaviane Alves de Pinho (Interno) / Bolsista DCR/CNPq/FAPEPI

“Não desanime. Persiste mais um tanto. Não cultives pessimismo. Centraliza-te no bem a fazer. Esquece as sugestões do medo destrutivo. Segue adiante, mesmo varando a sombra dos próprios erros. Avança ainda que seja por entre lágrimas... e assim vencerás”

Chico Xavier

A dois grandes homens que fizeram parte de minha vida: João de Sousa Silva, meu pai biológico e Francisco Assis Lima Costa, meu pai científico “in memoriam”. Ambos serão sempre um exemplo de força, determinação e sabedoria para mim.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, meu alicerce e meu refúgio.

Aos cães que fizeram parte desta pesquisa sem os quais a mesma não teria sido desenvolvida.

Ao prof. Francisco Assis Lima Costa (*in memoriam*), serei eternamente grata pelo prazer de ter convivido e sido orientada por um profissional tão dedicado e competente. Um ser humano invejável, tranquilo, discreto, educado e bem humorado, que durante muitos anos de convivência proporcionou inúmeros momentos de descontração nas reuniões científicas, técnicas e sociais ao grupo que coordenava no Setor de Patologia Animal/UFPI.

À minha atual orientadora, prof^ª. Dr^ª. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva, por ter me recebido novamente mesmo diante de tantas adversidades ocorridas no decorrer dessa jornada e pela transmissão de conhecimentos durante esses anos de convivência.

À prof^ª Sílvia pelo auxílio na revisão das leituras das lâminas.

Agradeço especialmente à incansável amiga Flaviane Alves, a qual acredito ter sido enviada por Deus nos momentos mais difíceis de minha vida, pelo apoio incondicional e imensurável que me prestou nessa reta final.

Às amigas Graça Prianti, Lidiany Viana e Juliana Braga pelas vezes que deixaram suas próprias obrigações para me auxiliar nos experimentos e análise dos dados ao longo desses anos.

Às demais amigas e colaboradoras que participaram ativamente dessa pesquisa: Georgia Brenda, Dayane Miranda e Micherlene Carneiro.

Às colegas Kaiulany Nascimento, Elis Rosélia, Monique Ponces, Lara Priscila e Alexandra Cajado que prontamente me auxiliaram quando necessitei.

Aos demais amigos e colegas da pós-graduação: Chico Leite, Luciano Feitosa, Nilton Magalhães, Angela Piauilino, Karina Drumond, Larissa Feitosa por tantos momentos de convivência no Setor de Patologia Animal.

Aos funcionários Raquel, Sr. Manoel, Brás e D. Rosângela, e aos residentes e ex-residentes com quem convivi durante esses anos.

À minha amada mãe, que só com seu olhar meigo e abraço caloroso já me conforta e mesmo à distância está sempre me apoiando e orando por mim.

Aos meus queridos filhos Mateus e Marina, pelo amor incondicional, pelos momentos de descontração e pela compreensão em suportar desde pequenos, minha ausência em busca de conhecimento. Vocês são tudo para mim.

Aos meus queridos irmãos, Cruz, Vera, Célia, Júnior, Gorete, Gardel, Naiara e Victor, e a todos os meus cunhados e sobrinhos pelo apoio, carinho e pelos bons momentos que passamos juntos que me fazem tão bem.

À família Marques, que me adotou como filha e sempre me apoia e me protege, em especial, aos amigos Adriana Marques e Welington Marques, que muitas vezes suportam meus desabafos. E aos meus segundos pais Major Marques e Marineuda Marques que sempre confiaram em mim e me apoiaram em tudo.

Agradeço infinitamente a Emilia Batista, por fazer o papel de mãe dos meus filhos em minha ausência ao longo dos últimos anos.

A toda equipe que forma a Clínica Veterinária Animal's, sobretudo aos veterinários e a equipe do laboratório pela compreensão em aceitar as inúmeras vezes em que tive que me ausentar em prol do doutorado nesses anos.

À amiga Geiciane Vilanova pela amizade sincera, os momentos de descontração e o apoio incondicional dado em minha ausência no laboratório nessa reta final.

A Gerência de Zoonoses de Teresina, por ceder os cães utilizados nessa pesquisa.

Aos professores e funcionários da Pós-graduação em Ciência Animal da UFPI.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, fundamental para realização desta pesquisa.

A todos que de algum modo contribuíram para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!!

RESUMO

SILVA, LS. Imunopatologia da nefropatia em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e co-infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum* (tese). Universidade Federal do Piauí; 2015.

Ehrlichia canis é uma bactéria gram-negativa, agente etiológico da Erliquiose Monocítica Canina (EMC). A co-infecção com *Leishmania (Leishmania) infantum* é comum em cães domésticos. Ambas, afetam órgãos do sistema fagocítico mononuclear e podem levar ao comprometimento renal. A patologia renal na EMC é pouco explorada, o que nos levou primeiramente a caracterizar as lesões histopatológicas nos rins de cães afetados pela *E. canis*. Posteriormente, estendemos nosso estudo para uma avaliação comparativa da resposta imunológica na lesão renal de cães com EMC, cães infectados com *L. (L.) infantum* e co-infectados. Para tanto, foram utilizados 10 cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum*, 12 cães naturalmente infectados com *E. canis*, 15 cães co-infectados e 6 cães saudáveis. Após avaliação clínica e confirmação do diagnóstico realizado por nested-PCR para *E. canis*, e por pesquisa direta, testes sorológicos e imunistoquímica para *L. (L.) infantum*, os animais foram eutanasiados e fragmentos de rins foram obtidos para exame histopatológico (Hematoxilina-Eosina [H-E], Tricrômio de Masson, *periodic acid-Schiff* [PAS], *periodic acid-methenamine silver* [PAMS] e Vermelho Congo), e para detecção de células T CD4 e CD8, bem como de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA por imunistoquímica. Na análise histopatológica de rins de cães com EMC, em 100% dos casos havia lesões glomerulares e tubulointersticiais. A lesão glomerular era do tipo membranoproliferativa em 83,33%, e proliferativa em 16,67% dos cães infectados com *E. canis*. A distribuição das lesões nos glomérulos afetados variou entre focal e difusa em intensidade média a moderada, observou-se hiperplasia celular no mesângio e espessamento da matriz mesangial, bem como espessamento da cápsula urinária e, em alguns casos da membrana basal dos capilares glomerulares. Nefrite intersticial estava presente na região cortical em todos os cães infectados, com infiltrado inflamatório em intensidade mínima a severa constituído por linfócitos, macrófagos e plasmócitos, localizado no interstício e nas regiões periglomerular e perivascular. Sendo que a contagem diferencial mostrou predominância de linfócitos em comparação com plasmócitos e macrófagos. Fibrose intersticial e cilindros hialinos foram observados em menor intensidade. Na análise comparativa entre os cães com *E. canis*, cães com *L. (L.) infantum* e os co-infectados, as alterações glomerulares nos rins de cães com EMC eram menos intensas em relação aos demais grupos de animais infectados. Nestes, a lesão glomerular predominante também foi do tipo membranoproliferativa, sendo que se destacou em intensidade mais severa no grupo dos cães com *L. (L.) infantum* e nos co-infectados, bem como a fibrose e nefrite intersticial. Na análise morfométrica do infiltrado inflamatório, o predomínio de linfócitos foi significativo nos cães infectados com *E. canis* em relação aos cães com *Leishmania*, nos quais havia um predomínio de histiócitos. Na análise imunistoquímica, as células T CD4⁺ estavam presentes nos glomérulos e no infiltrado inflamatório intersticial em todos os cães infectados com diferença significativa quando comparados aos cães saudáveis. Enquanto, células T CD8⁺ predominaram somente nos animais infectados por *E. canis* e co-infectados. De forma interessante, os glomérulos de cães com EMC tinham maior número de células T CD4⁺ comparado aos cães com LV. As imunoglobulinas IgG, IgM e IgA apresentaram um padrão de imunomarcagem na região cortical, com destaque nos capilares glomerulares, bem como na região medular, nos túbulos renais e no interstício. A deposição de IgG foi significativa nos cães com LV na região tubular e lúmen vascular. Em conclusão, a glomerulonefrite

membranoproliferativa é a principal lesão renal em cães com EMC e as células T CD4⁺ parecem ter um papel na sua patogênese, semelhante aos cães com LV. O aumento de células T CD8⁺ parece contribuir para a injúria renal na EMC. O padrão de lesão renal observada nos animais co-infectados sugere que a infecção por *L. (L.) infantum* seja a principal responsável pelo comprometimento renal mais severo nos casos de co-infecção.

Palavras-chave: *E. canis*, *L. (L.) infantum*, nefropatia, co-infecção.

ABSTRACT

Silva LS. Immunopathology of nephropathy in dogs naturally infected by *Ehrlichia canis* and co-infected by *Leishmania (Leishmania) infantum* (thesis). Universidade Federal do Piauí; 2015.

Ehrlichia canis is a gram-negative bacteria, etiologic agent of Canine Ehrlichiosis Monocytic (CME). Co-infection with *Leishmania (Leishmania) infantum* is common in domestic dogs. Both pathogens affect organs of the mononuclear phagocyte system and can lead to renal impairment. The renal pathology at CME is little investigated, which directed us first to characterize the histopathological damage to the kidneys of dogs affected by *E. canis*. Later, we extend our study to a comparison of the immune response in renal lesions in dogs with CME, infected with *L. (L.) infantum* and co-infected. To this end, 10 dogs were used naturally infected with *L. (L.) infantum*, 12 dogs naturally infected with *E. canis*, 15 co-infected dogs and 6 healthy dogs. After clinical evaluation and confirmation of the diagnosis by nested-PCR to *E. canis* and parasitology, serological and immunohistochemical tests to *L. (L.) infantum*, the animals were euthanized and kidney fragments were obtained for histopathological examination (Hematoxylin and Eosin (HE), Masson's trichrome, periodic acid-Schiff- PAS, periodic acid-methenamine silver (PAMS) and Congo red stain), and for CD4 and CD8 T cells detection as well as immunoglobulins IgG, IgM, IgA by immunohistochemistry. Histopathological analysis revealed in dogs with CME that the main lesions were observed in the glomerulus and tubulointerstitial region, in 100% of cases. The glomerular injury was the membranoproliferative type in 83.33%, and proliferative in 16.67% of those infected dogs by *E. canis*. The distribution of affected glomeruli was focal and diffuse with mild to moderate intensity. Hypercellularity was observed in the mesangium and thickening of the mesangial matrix as well as thickening of urinary capsule and glomerular basement membrane of capillaries. Interstitial nephritis was present in the cortical region in all infected dogs. Inflammatory infiltrate was minimum to severe constituted primarily by lymphocytes, macrophages and plasma cells with interstitial, perivascular and periglomerular localization. Interstitial fibrosis and hyaline casts were observed at lower intensity. In the comparative analysis between the infected dogs with *E. canis*, dogs with *L. (L.) infantum* and co-infected, glomerular changes in the kidneys of dogs with CME were less intense than the other infected groups which also had membranoproliferative glomerulonephritis as main glomerular lesion being more severe in the group of dogs with *L. (L.) infantum* and co-infected, similar fibrosis and interstitial nephritis findings. In the morphometric analysis of the inflammatory infiltrate, the increase of lymphocytes was significant in dogs infected by *E. canis* when compared to dogs with *Leishmania* which had a predominance of histiocytes. In immunohistochemical analysis, CD4⁺ T cells were significantly present in the glomeruli and interstitial inflammatory infiltration in all dogs infected when compared to healthy dogs while CD8⁺ T cells predominated only in animals infected with *E. canis* and co-infected. Interesting, the glomeruli of dogs with CME had higher number of CD4⁺ T cells compared with VL dogs. IgG, IgM and IgA showed a pattern of immunostaining in the cortical region, especially in glomerular capillaries, as well as in the spinal region, the renal tubules and interstitium. The IgG deposition was significant in dogs with VL in the tubules and vascular lumen. In conclusion, the membranoproliferative glomerulonephritis is the main renal lesion in dogs with CME and CD4⁺ T cells seem to play a role in its pathogenesis, similar to dogs with VL. The increase of CD8⁺ T cells appear to contribute to renal injury mainly in EMC

disease. The pattern of renal damage observed in co-infected animals suggests that the *L. (L.) infantum* infection could be the main responsible for renal failure.

Keywords: *E. canis*, *L. (L.) infantum*, nephropathy, co-infection.

.

LISTA DE FIGURAS

CAPTÍTULO I

Figura 1. Correlação negativa entre os níveis séricos de albumina e a severidade da glomerulopatia em cães naturalmente infectados com <i>E. canis</i>	49
Figura 2. Glomerulonefrite membranoproliferativa em cão naturalmente infectado por <i>E. canis</i>	51
Figura 3. Lesões glomerulares em rins de cães naturalmente infectados por <i>E. canis</i>	52
Figura 4. Glomerulonefrite proliferativa em rim de cão naturalmente infectado por <i>E. canis</i>	53
Figura 5. Infiltrado inflamatório em rins de cães naturalmente infectados por <i>E. canis</i>	57
Figura 6. Contagem diferencial do infiltrado inflamatório de rins de cães naturalmente infectados com <i>E. canis</i>	59
Figura 7. Fibrose intersticial em rim de cão naturalmente infectado por <i>E. canis</i>	60
Figura 8. Presença de cilindros em rim de cão naturalmente infectado por <i>E. canis</i> .	61

CAPTÍTULO II

Figura 1. Glomerulonefrite membranoproliferativa em cães naturalmente infectados por <i>E. canis</i> , <i>L. (L.) infantum</i> e cães co-infectados com <i>E. canis</i> e <i>L. (L.) infantum</i>	79
Figura 2. Glomérulo normal e hiperplasia glomerular em cães naturalmente infectados com <i>L. (L.) infantum</i> , com <i>E. canis</i> e em cães co-infectados.....	81
Figura 3. Proliferação celular em glomérulos de cães naturalmente infectados por <i>E. canis</i> , <i>L. (L.) infantum</i> , co-infectados e controles não infectados.....	82
Figura 4. Rim de cão naturalmente infectado por <i>E. canis</i> : infiltrado inflamatório intersticial e periglomerular.....	85
Figura 5. Fibrose intersticial em rim de cão naturalmente infectado por <i>L. (L.) infantum</i>	87
Figura 6. Cilindros hialinos em túbulos renais de cão naturalmente infectado <i>E. canis</i>	88
Figura 7. Contagem de linfócitos no infiltrado inflamatório presente na região cortical de rins de cães naturalmente infectados por <i>E. canis</i> , <i>L. (L.) infantum</i> e co-infectados.....	89
Figura 8. Contagem de histiócitos no infiltrado inflamatório presente na região cortical de rins de cães naturalmente infectados por <i>E. canis</i> , <i>L. (L.) infantum</i> e co-infectados.....	91

Figura 9. Contagem de plasmócitos no infiltrado inflamatório presente na região cortical de rins de cães naturalmente infectados por <i>E. canis</i> , <i>L. (L.) infantum</i> e co-infectados.....	92
Figura 10. Imunomarcção de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ em glomérulo de cães naturalmente infectados por <i>E. canis</i> , <i>L. (L.) infantum</i> , co-infectados e controles não infectados.....	93
Figura 11. Cão com LV: Imunomarcção de célula T CD4 ⁺ no glomérulo e interstício. Cão co-infectado: Imunomarcção de células T CD8 ⁺ no glomérulo e interstício.....	95
Figura 12. Imunomarcção de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA em rim de cães dos grupos Leish e EC	100

LISTA DE TABELAS

CAPTÍTULO I

Tabela 1. Perfil hematológico e bioquímico de 12 cães naturalmente infectados com <i>E. canis</i>	44
Tabela 2. Detecção de <i>E. canis</i> em tecido renal por nPCR e análise histopatológica em rins de cães naturalmente infectados por <i>E. canis</i>	48
Tabela 3. Alterações glomerulares observadas em rins de cães naturalmente infectados por <i>E. canis</i>	54
Tabela 4. Características histológicas de nefrite intersticial e outras lesões observadas nos rins de cães naturalmente infectados com <i>E. canis</i>	56

CAPTÍTULO II

Tabela 1. Perfil bioquímico de cães naturalmente infectados por <i>E. canis, L. (L.) infantum</i> , co-infectados e controles não infectados.....	76
Tabela 2. Alterações histopatológicas em rins de cães naturalmente infectados por <i>E. canis, L. (L.) infantum</i> , co-infectados e controles não infectados.....	77
Tabela 3. Imunomarcção de imunoglobulinas IgA, IgM e IgG em tecido renal de cães naturalmente infectados por <i>E. canis, L. (L.) infantum</i> , co-infectados e controles não infectados.....	98

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Erliquiose monocítica canina.....	19
2.1.1	Nefropatia na EMC.....	22
2.2	Leishmaniose visceral canina.....	23
2.2.1	Nefropatia na LVC.....	25
2.3	Glomerulonefrites.....	27
2.4	Co-infecção com <i>E. canis</i> e <i>L. (L.) infantum</i>	29
3	OBJETIVOS.....	32
4	CAPÍTULO I.....	33
	Introdução.....	34
	Material e métodos.....	36
	Resultados e discussão.....	42
	Conclusão.....	61
	Agradecimentos.....	62
	Referências Bibliográficas do capítulo I.....	63
5	CAPÍTULO II.....	67
	Introdução.....	68
	Material e métodos.....	70
	Resultados e discussão.....	75
	Conclusão.....	101
	Agradecimentos.....	102
	Referências bibliográficas do capítulo II.....	103
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	108
	APÊNDICE	
	ANEXO	

1. INTRODUÇÃO

A *Ehrlichia canis* é uma bactéria gram-negativa, estritamente intracelular, agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC), transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. No Brasil é uma doença endêmica em várias regiões, sendo umas das doenças mais importantes que acometem os cães, podendo levar o animal a óbito. Os sinais clínicos variam com a severidade da infecção, a resposta imune do hospedeiro e a presença de co-infecção com outros patógenos.

A *Leishmania (Leishmania) infantum*, protozoário responsável pela leishmaniose visceral canina (LVC) e humana, também é endêmica no Brasil e considerada um grave problema de saúde pública, com forte impacto econômico e social. O cão tem um papel fundamental na cadeia epidemiológica devido ao alto parasitismo cutâneo. Além disso, o cão é bastante susceptível à infecção por *L. (L.) infantum* desenvolvendo a doença em sua forma plena.

Tanto a EMC quanto a LVC afetam órgãos do sistema fagocítico mononuclear como baço, fígado, linfonodos e medula óssea levando a manifestações clínicas semelhantes, culminando com linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, trombocitopenia e pancitopenia. Nesses compartimentos, as alterações histopatológicas são classicamente descritas em diversos estudos. No entanto, nos rins ainda são escassas pesquisas demonstrando os mecanismos patológicos que levam à gênese das lesões renais nessas doenças, particularmente, na EMC e em cães co-infectados.

No curso da erliquiose e da leishmaniose visceral, os rins são frequentemente acometidos. Na LVC, os padrões de lesão renal foram classificados pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa, sendo estes constituídos predominantemente por glomerulonefrites proliferativas, notavelmente, determinados pela presença de células mononucleares, principalmente células T, em destaque as células T CD4⁺. Essa abordagem despertou uma nova visão acerca dos elementos determinantes na patogênese da lesão renal, uma vez que a deposição de complexo imune era o principal mecanismo aceito. Na erliquiose canina não se tem estabelecido critérios para avaliação da lesão renal. No entanto, pesquisas demonstram tanto na infecção natural e/ou experimental por *E. canis*, um infiltrado predominantemente plasmocitário na junção corticomedular renal característico de uma forte resposta imune humoral.

Visto que na LVC, a morte dos animais geralmente é decorrente da insuficiência renal e que o cão é um excelente modelo para o estudo da LV; e considerando que na EMC pouco se sabe acerca dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na lesão renal, neste trabalho propomos caracterizar o padrão de lesão renal em cães com EMC, sobretudo nos glomérulos, além de investigar a participação de elementos imunes na gênese das lesões nos rins de cães mono infectados com *E. canis* fazendo uma análise comparativa do comprometimento renal dos cães co-infectados com *L. (L.) infantum* e animais com LV.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Erliquiose Monocítica Canina (EMC)

A Erliquiose Monocítica Canina (EMC) é causada pela *Ehrlichia canis*, uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória, pertencente à ordem *Rickettsiales*, família *Anaplasmataceae*, gênero *Ehrlichia* spp (Dumler *et al.*, 2001). A principal forma de transmissão é pela picada de carrapatos, fato que justifica a alta prevalência em clima tropical, por favorecer o desenvolvimento do vetor e consequente transmissão de hemoparasitas (Carlos *et al.*, 2007; Dantas-Torres, 2008). O principal vetor é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, no entanto, outras espécies como *Dermacentor variabilis* (Dantas-Torres, 2008; Rene-Martellet *et al.*, 2015). *Ixodes scapularis* e *Ixodes ricinus* (Dagnone, Morais e Vidotto, 2001; Nicholson *et al.*, 2010) são apontadas como transmissores em infecção experimental. A EMC é considerada uma das mais severas doenças transmitidas por carrapatos (Rene-Martellet *et al.*, 2015).

A EMC é uma doença de ocorrência mundial atingindo principalmente regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, desde o primeiro relato em Belo Horizonte (Costa *et al.*, 1973), a EMC vem sendo confirmada em diversas regiões do país com taxa de soropositividade nos cães, variando de 4,8 a 70% em áreas urbanas (Tanikawa *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2013). Na cidade de Teresina-PI, em trabalhos anteriores realizados por nosso grupo, utilizando a técnica de PCR, demonstraram em 270 cães em área urbana, que a frequência de infectados por *E. canis* era de aproximadamente 29% (Silva, 2010); e em pesquisas mais recentes realizadas em cães de áreas urbana e rural, também utilizando a técnica de PCR, foi detectada *Ehrlichia* sp em 26,29% na zona urbana e 49,75% na área rural (Fonseca, 2014).

Após a inoculação de *E. canis* no cão, a bactéria invade células do sistema fagocítico mononuclear disseminando-se para vários tecidos (Moreira *et al.*, 2003). A EMC pode ser aguda, subclínica ou crônica (Oriá, Pereira e Laus, 2004). A doença na fase aguda ocorre entre uma a três semanas após o início da infecção, geralmente cursa com febre, depressão, anorexia, perda de peso, secreção nasal e ocular, letargia, esplenomegalia, linfadenomegalia, trombocitopenia e anemia não regenerativa (Breitschwerdt, 2004; Hasegawa, 2005; Aguiar *et al.*, 2007; Silva, 2010). Na fase subclínica, o animal tem aparente recuperação da fase aguda com sinais clínicos ausentes ou mínimos, embora a infecção persista. Nesse caso, observa-se elevados títulos de anticorpos, alterações hematológicas discretas, como anemia não regenerativa, leucopenia e trombocitopenia (Harrus *et al.*, 1999; Borin, Crivelenti e Ferreira, 2009). Após a fase subclínica, o animal pode recuperar-se ou progredir para um quadro crônico (Breitschwerdt, 2004), neste último, alterações severas são observadas como comprometimento da medula óssea e consequente pancitopenia (Mylonakis *et al.*, 2004; Breitschwerdt, 2004; Nakaghi *et al.*, 2008). Segundo Couto (2003), os animais apresentam perda de peso, febre, sangramento espontâneo, palidez, linfadenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia, uveíte anterior e/ou posterior, sinais neurológicos causados por meningoencefalomielite, poliartrite, edema de membros e sinais decorrentes da hiperplasia linforreticular.

Trombocitopenia, anemia não regenerativa e leucopenia são as alterações hematológicas mais citadas na erliquiose canina (Harrus *et al.*, 1999). A redução de plaquetas é observada frequentemente em todas as fases de infecção, seja em infecção natural e/ou experimental (Moreira *et al.*, 2003; De Castro *et al.*, 2004; Nakaghi *et al.*, 2008).

Alterações bioquímicas também são comuns na EMC, geralmente, caracterizadas por hiperproteinemia com hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (De Castro *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2006; Roqueplo *et al.*, 2009). Além disso, elevações das atividades de aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT) (Costa *et al.*, 2015), e aumento nas concentrações séricas de uréia, creatinina e fósforo são observadas (Troy e Forrester, 1990).

A patogenia da EMC parece estar relacionada à citotoxicidade dependente de anticorpos (Kakoma *et al.*, 1977; De Castro *et al.*, 2004) levando a intensa vasculite em diferentes órgãos, nos quais é observado infiltrado inflamatório perivascular predominantemente plasmocitário (Simpson, 1974; De Castro *et al.*, 2004). Em consequência, observa-se nefrite intersticial, inflamação perivascular e degeneração hidrópica no fígado, meningo-encefalite não supurativa, esplenomegalia e hiperplasia de cordões medulares (De Castro *et al.*, 2004).

A *E. canis* desenvolveu habilidades para evadir-se dos mecanismos imunológicos inato e adaptativo, o que permite a sua sobrevivência no hospedeiro, por meio da produção de proteínas que impedem a fusão do fagolisossomo no interior dos macrófagos (Wells e Rikihisa, 1988). Além disso, a persistência de *E. canis* nos tecidos induz a produção de altos níveis de IgM e IgG o que facilita a sua entrada nas células do sistema fagocítico mononuclear por opsonização, e consequente manutenção da sua sobrevivência nos tecidos (Ristic e Holland, 1993). Em contrapartida, estudos experimentais demonstraram que a resposta imune humoral é essencial contra a infecção por *E. canis* (Lewis, Hill e Ristic, 1978).

A imunopatogenia da EMC ainda não está totalmente esclarecida. Alguns estudos sugerem que o mecanismo de resposta imune protetora é T-dependente e com elevada concentração de IFN- γ (Tajima e Rikihisa, 2005; Unver, Huang e Rikihisa, 2006), uma

vez que foi evidenciado que a infecção por *E. canis* induz uma queda acentuada nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺, MHC II⁺ e CD45R⁺ caracterizando o quadro imunossupressor da doença (Harrus *et al.*, 2003; Heeb *et al.*, 2003). Outras pesquisas demonstraram também na imunofenotipagem de células de linfonodo e baço que as populações de células T CD3⁺ e CD8⁺ estavam alteradas (De Castro *et al.*, 2004).

O diagnóstico da EMC pode ser realizado por meio de pesquisa direta em esfregaços sanguíneos, aspirados de baço, medula óssea e linfonodos. Entretanto, devido à variação da parasitemia durante o curso da doença, o exame direto é pouco sensível para casos subclínicos e/ou assintomáticos (Hildebrandt *et al.*, 1973a), uma vez que as mórulas praticamente só são encontradas na fase aguda (De Castro *et al.*, 2004). Atualmente, testes sorológicos e moleculares constituem ferramentas úteis no diagnóstico da EMC por apresentarem bons índices de sensibilidade e especificidade (Harrus e Waner, 2011).

Os testes sorológicos comumente utilizados na rotina laboratorial para diagnóstico de EMC são: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para anticorpos IgG anti-*E. canis*, sendo considerada "padrão ouro" (Waner *et al.*, 2001); e a técnica *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), sendo que existem alguns testes comerciais disponíveis, os quais identificam IgG para *E. canis*, como o Immunocomb® (recombinant major antigenic protein 2 - rMAP2 – Biogal, Israel) e o Snap® 3Dx e 4Dx (IDEXX Laboratories Inc., USA) (Harrus e Waner, 2011).

2.1.1 Nefropatia na EMC

No curso da EMC sabe-se que na fase crônica há comprometimento renal (Frank e Breitschwerdt, 1999). Muito embora a falha renal não seja uma alteração frequentemente associada à erliquiose, estudos demonstram que a deposição de imuno-

complexos nos rins podem desencadear uma glomerulonefrite e predispor o animal à proteinúria (Frank e Breitschwerdt, 1999; Harrus *et al.*, 2001). Esta foi caracterizada na infecção experimental de cães com *E. canis*, os quais desenvolveram uma proteinúria transitória, com perda de albumina, entre duas a três semanas após a infecção (Codner e Maslin, 1992).

O aumento da excreção de proteínas de cadeia leve em cães com *Ehrlichia* spp e/ou *Babesia* spp ocorre devido o envolvimento tubular, além de glomerular (Bonfanti *et al.*, 2004). Em alguns casos também se observa aumento nas concentrações séricas de ureia e creatinina sugestivo de azotemia pré-renal e/ou glomerulopatia nos casos crônicos (Sousa *et al.*, 2010).

Mesmo constatado na literatura que o comprometimento renal é evidente na EMC, poucos estudos focaram na patogênese da nefropatia nessa doença (Codner *et al.*, 1992; De Castro *et al.*, 2004). A glomerulopatia encontrada na EMC devido à deposição de imunocomplexos sugere que o quadro de vasculite imunomediada pode desempenhar papel central na lesão renal, bem como, nos demais órgãos (Simpson, 1974; De Castro *et al.*, 2004).

Os principais achados histopatológicos são caracterizados por glomerulonefrite intersticial crônica multifocal com presença de infiltrado mononuclear (De Castro *et al.*, 2004) e infiltrado cortical linfoplasmocitário (Codner *et al.*, 1992). Além disso, também é relatado infiltrado plasmocitário perivascular na junção corticomedular, edema perivenular/periglomerular e necrose focal seguido de infiltrado celular (Hildebrandt *et al.*, 1973b; Reardon e Pierce, 1981). Acredita-se também que a infecção por *E. canis* pode ser responsável por insuficiência renal por amiloidose (Luckschander, Kleiter e Willmann, 2003).

2.2 Leishmaniose visceral canina (LVC)

As leishmanioses são atualmente um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo (Alvar *et al.*, 2012; Faria e Andrade, 2012). São causadas por espécies de *Leishmania*, sendo que algumas podem desencadear manifestações restritas a pele e mucosas, enquanto outras afetam principalmente os órgãos do sistema fagocítico mononuclear, causando a Leishmaniose Visceral (LV) (Quinnell e Courtenay, 2009).

A LV ocorre em mais de 70 países dos cinco continentes, a exceção da Antártica e da Austrália situada na Oceania. Registros epidemiológicos indicam que 90% dos casos concentram-se na Índia, Bangladesh, Brasil, Nepal e Sudão (Alvar *et al.*, 2012). Na América Latina, a doença ocorre desde o México até Sul da Argentina, exceto no Chile (Travi *et al.*, 2002; Alvar *et al.*, 2012; PAHO/OMS, 2013; Vilas *et al.*, 2014). Cerca de 4000 novos casos de LV são relatados anualmente, sendo que 96,6% dos casos relatados ocorrem no Brasil (PAHO/OMS, 2013).

A LV, mesmo diagnosticada no Brasil desde 1913, só chamou atenção das autoridades públicas diante da grave epidemia registrada em Sobral (Ceará) em 1953, a qual foi fatal para 100 pacientes humanos (Deane e Deane, 1955). Desde então, a doença vem se expandido para grandes centros urbanos, atingindo mais de 1.200 municípios em 21 estados brasileiros (Werneck, 2010). Em Teresina-PI, a prevalência chegou a 16,34 casos/100.000 habitantes entre 1999 a 2009 (Drumond e Costa, 2011).

No Brasil, a LV é uma doença zoonótica, e os cães desempenham papel fundamental na cadeia epidemiológica em decorrência do intenso parasitismo cutâneo e sua susceptibilidade a infecção por *L. (L.) infantum* (Menezes-Souza *et al.*, 2011). A prevalência da leishmaniose visceral canina (LVC) nos estados brasileiros é variável, mas em áreas endêmicas pode atingir uma prevalência de 80% da população canina (Solano-Gallego *et al.*, 2001). Na cidade de Teresina-PI foram registrados aproximadamente 19,7 casos para cada 1000 cães entre 1999 a 2009 (Drumond e Costa, 2011).

A LVC é uma doença sistêmica grave para a população canina, quando o parasito é inoculado pelo flebotômíneo durante o repasto sanguíneo, ocorre a sua disseminação, em particular, nos órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, como baço, fígado, medula óssea e linfonodo (Lainson, Ryan e Shaw, 1987; Tafuri *et al.*, 2001). O animal pode permanecer assintomático ou apresentar sinais clínicos, dependendo do tipo de resposta imune estabelecida pelo hospedeiro após a interação com o parasito (Baptista-Fernandes *et al.*, 2007; Alexandre-Pires *et al.*, 2010).

Usualmente, a infecção leishmaniótica causa doença sistêmica crônica, a qual é caracterizada por diversos sinais clínicos como febre irregular, anemia, perda de peso, linfadenomegalia localizada ou generalizada, hepatoesplenomegalia, lesões dermatológicas, diarreia, falência renal, lesões oftálmicas, epistaxe e onicogribose (Baneth *et al.*, 2008; Freitas *et al.*, 2012). Ocasionalmente são observadas alterações locomotoras, respiratórias e/ou cardíacas (Barbieri, 2006; Reis *et al.*, 2006a; Ikeda-Garcia *et al.*, 2007). Essa variação do quadro clínico é influenciada por fatores intrínsecos

do hospedeiro como idade, sexo, nutrição, genética e comorbidades, e aqueles relacionados ao parasito como virulência da cepa e a carga parasitária inoculada (Solano-Gallego *et al.*, 2000; Koutinas e Koutinas, 2014), o que dificulta o diagnóstico de LVC em áreas endêmicas (Aguiar *et al.*, 2007).

A LVC é uma doença imunomediada, porém os elementos relacionados com resistência e susceptibilidade ainda não são bem estabelecidos, uma vez que uma resposta mista Th1/Th2 é observada nos cães sintomáticos e assintomáticos (Koutinas e Koutinas, 2014). Estudos descreveram em diferentes tecidos que a resposta protetora está associada ao perfil Th1 com produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α correlacionando-os com sinais clínicos e a carga parasitária (Carrillo e Moreno, 2009). Já na fase ativa da LVC ocorre uma falha na resposta linfoproliferativa e uma redução no número de células T CD4⁺ (Bourdoiseau *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 1999; Guarga *et al.*, 2000).

A resposta policlonal também tem sido descrita na LVC como marcador de resistência e/ou susceptibilidade (Cardoso *et al.*, 2007). Em cães com LV podem ser detectados níveis elevados das quatro subclasses de IgG (IgG1-IgG4), sendo que IgG1 e IgG2 são as mais indicadas na caracterização do perfil clínico do animal do que IgG total (Quinnell *et al.*, 2003). Alguns estudos demonstraram em cães assintomáticos que o aumento de IgG1 está associado com mecanismos protetores, e que IgG2 tem correlação com cães infectados com sinal clínico mais severo e com maior parasitismo (Reis *et al.*, 2006b). Outras imunoglobulinas como IgM, IgA e IgE também tem sido relatadas na LVC e consideradas importantes marcadores para a progressão da doença (Reis *et al.*, 2006b; Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007).

O diagnóstico da LVC ainda tem como padrão-ouro o exame parasitológico. No entanto, o Ministério da Saúde recomenda o uso dos testes sorológicos como o imunocromatográfico DPP® (Bio-Manguinhos) como triagem, e o teste imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay* = ELISA- Bio-Manguinhos) como confirmatório. Técnicas moleculares, como a Reação da Cadeia em Polimerase – PCR, também podem ser empregadas como método para confirmação da infecção (Faria e Andrade, 2012).

2.2.1. Nefropatia na LVC

Os aspectos imunopatológicos em órgãos pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear são classicamente descritos em cães com LV (Tafari, 2001; Reis *et al.*,

2009). No entanto, órgãos como rins, coração e pulmão também são acometidos e estudos recentes tem caracterizado a lesão tecidual e os seus mecanismos patológicos (Alves *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2010; Rigo *et al.*, 2013; Rosa *et al.*, 2014). Desses órgãos, o comprometimento renal assume uma importância ímpar na LVC, uma vez que na literatura há vários relatos dessa alteração como a principal causa de morte dos cães infectados (Lopez *et al.*, 1996; Noli, 1999).

Nos achados laboratoriais indicativos de lesão renal na LVC observa-se hipoalbuminemia devido à perda renal, azotemia/uremia relacionada à progressão da glomerulopatia, proteinúria como reflexo do aumento da permeabilidade capilar glomerular a proteínas do plasma, e no exame do sedimento urinário também podem estar presentes leucócitos e hemácias (Nieto *et al.*, 1992; Moura, Paula e Soares, 2002; Costa *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2005).

Mesmo que vários estudos tenham atribuído à falha renal como causa de morte dos cães com LV, ainda é pouco esclarecida a sua patogênese (Lopez *et al.*, 1996; Noli, 1999; Costa *et al.*, 2010). Tanto em modelo humano, canino e murino com LV há controvérsias acerca dos elementos que levam à lesão renal. Deposição de imunocomplexos, ativação de células T e moléculas de adesão são descritas como possíveis mecanismos que levam à injúria renal (Elshafie *et al.*, 2006; Prianti *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2010).

Na LVC, estudos realizados por Costa *et al.* (2003) foram pioneiros na avaliação e classificação histopatológica das lesões renais em cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* em área endêmica com base nos critérios utilizados pela Organização Mundial de Saúde para casos humanos. Eles demonstraram que em 100% dos cães com LV havia predomínio de glomerulonefrites proliferativas, e 78,2% apresentaram nefrite intersticial. Outras alterações como degeneração hialina e vacuolar, atrofia tubular e fibrose também foram evidenciadas nos cães com LVC.

Os primeiros relatos sobre os mecanismos patogênicos responsáveis pelo envolvimento renal na LVC sugeriram que a deposição de imunocomplexos causavam as glomerulopatias observadas em cães com LV. Mancianti, Poli e Bionda, 1989 detectaram depósitos de IgG no tecido renal de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, sendo que essa imunoglobulina era policlonal e reconhecia antígenos de membrana de *Leishmania*. Seguindo ainda essa abordagem, Lopez *et al.* (1996) determinaram elevadas concentrações de complexos imunes em cães com LV associando-as a uma hipercreatinemia. Outro estudo revelou por imunomarcção depósitos de IgG, IgM e C3

em áreas mesangiais como também na parede dos capilares glomerulares, reforçando essa hipótese (Poli *et al.*, 1991). Todavia, estudos utilizando camundongos BALB/c e hamsteres como modelo, contraria a hipótese de que a deposição de imunocomplexo seja suficiente para explicar o comprometimento renal, pois os autores demonstraram deposição inexpressiva de moléculas C3, bem como participação transitória das imunoglobulinas, já que a imunomarcção de IgG em tecido renal foi significativamente maior na fase inicial da doença (Mathias, Costa e Goto, 2001; Prianti *et al.*, 2007). Estendendo a mesma abordagem para o modelo canino, Costa *et al.* (2010) revelaram pela primeira vez em rins de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* que não havia nenhuma diferença significativa na intensidade do depósito de C3b, particularmente no glomérulo, em relação aos cães saudáveis. Também foi demonstrado que a deposição de C3b, IgG e antígenos de *Leishmania* se encontravam em diferentes compartimentos, não formando imunocomplexos.

Por outro lado, vêm sendo constatada a participação de linfócitos T, citocinas e moléculas de adesão na lesão renal na LV (Costa *et al.*, 2010). Pesquisas com cães naturalmente infectados mostram hiperplasia glomerular, com presença marcante de células mononucleares, predominando linfócitos T CD4⁺. Nesse mesmo trabalho foi demonstrado diminuição de expressão de TNF e de apoptose nos animais infectados quando comparado aos animais do grupo controle. Em outro trabalho do mesmo grupo, utilizando modelo murino, foi observado presença marcante tanto de células T, quanto de macrófagos (Prianti *et al.*, 2007), justificando o padrão proliferativo da glomerulonefrite na LVC.

2.3 Glomerulonefrites

As glomerulopatias são constituídas por um grupo de doenças que acometem os glomérulos, sendo a glomerulonefrite (GN) a forma mais comum caracterizada por diferentes padrões histológicos (Miguel e Rodriguez Puyol, 2007). O dano irreversível ao rim ocorre quando a lesão glomerular atinge a região tubulointersticial comprometendo a função do órgão em toda sua extensão.

As Glomerulonefrites podem ser classificadas em: GN proliferativa, GN membranoproliferativa, GN membranosa e GN esclerótica. Histologicamente, a GN proliferativa é caracterizada pelo aumento da celularidade do tufo glomerular devido a proliferação de células endoteliais, epiteliais, mesangiais e glomerulares, bem como ao

influxo de células inflamatórias envolvendo o mesângio. Na GN membranosa ocorre um espessamento difuso da membrana basal do capilar glomerular, e na GN membranoproliferativa observa-se hiper celularidade com proliferação de células glomerulares e espessamento da membrana basal capilar e mesângio. Já na GN esclerótica, os glomérulos estão gravemente afetados, diminuídos de tamanho e hialinizados devido ao aumento do tecido conjuntivo fibroso e matriz mesangial com perda de capilares glomerulares (Santos e Alessi, 2010; Mcgavin Zachary, 2013).

A imunidade humoral e celular contribui na imunopatogênese da glomerulonefrite e pode ter importante papel na determinação nos diferentes padrões histológicos (Kurts *et al.*, 2013). Imunoglobulinas monoclonais (Ig) comprometem o rim envolvendo deposição de uma Ig inteira ou dos seus componentes no glomérulo e com menos frequência após a formação de anticorpos direcionados contra antígenos existentes na membrana basal glomerular (Karras *et al.*, 2002; Nasr *et al.*, 2009; Pedchenko *et al.*, 2010). A GN por imunocomplexos geralmente está associada a infecções persistentes que apresentam uma antigenemia prolongada, que aumenta a formação de imunocomplexos solúveis cuja localização nos capilares glomerulares estimula a formação de quimiotáticos para neutrófilos que liberam proteases que lesam a membrana basal, esta quando persiste a lesão glomerular é intensificada pela ação de moléculas biologicamente ativas a partir de infiltrações de monócitos nas fases posteriores à inflamação aguda (Mcgavin e Zachary, 2013).

Células T também participam na imunopatogenia da GN, uma vez que foi constatado que subpopulações de células T CD4⁺ ativam diferentes mecanismos efetores que resultam em diferentes padrões e severidade da injúria glomerular (Wu *et al.*, 2002; Kurts *et al.*, 2013). Em modelo murino foi demonstrado que a transferência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ específicas para antígenos glomerulares podem causar danos ao rim. A liberação de antígenos glomerulares inicia um ciclo vicioso envolvendo a apresentação antigênica pelas células dendríticas residentes às células T, com isso havendo produção acentuada de quimiocinas e citocinas inflamatórias, maior influxo de células T CD8⁺ e macrófagos e consequente lesão tecidual (Wu *et al.*, 2002; Kurts *et al.*, 2007). A participação das células T tem sido associada as GN proliferativas/crescênticas (Tipping *et al.*, 1998).

Lesões glomerulares observadas em infecções parasitárias apresentam uma variedade de lesões, em sua maioria são proliferativas, exibindo acúmulo de células no tufo glomerular, do tipo glomerulonefrite mesangioproliferativa ou

membranoproliferativa. Também são observadas lesões glomerulares com pouca ou nenhuma proliferação (Van Velthuysen e Florquin, 2000).

2.4 Co-infecção com *E. canis* e *L. (L.) infantum*

As condições ambientais dos países tropicais e subtropicais favorecem a sobrevivência de uma variedade de vetores que podem transmitir ao mesmo tempo diferentes agentes etiológicos (Trotz-William e Trees, 2003; Dantas-Torres, 2008). Nesse contexto, a infecção simultânea desses parasitos representa um desafio no diagnóstico, terapêutica e prognóstico para o animal acometido.

Estudos recentes vêm demonstrando a importância da co-infecção entre *L. (L.) infantum* e *E. canis* na população canina, uma vez que podem levar a um quadro clínico-patológico mais severo (Andrade *et al.*, 2014). Muito embora a prevalência de agentes co-infectantes seja pouco relatada, trabalhos realizados em algumas regiões brasileiras demonstraram uma taxa de co-infecção variando entre 6,0-74,3% entre *L. (L.) infantum* e *E. canis* (Silva, 2010; Paulan *et al.*, 2013). Teresina-Piauí é uma área endêmica para esses agentes, em estudo realizado anteriormente por nosso grupo, Silva (2010) observou percentual de co-infecção com *E. canis* e *Leishmania* de 6,30%; com *E. canis*, *A. platys* e *Leishmania* de 5,18%; e 9,26% por *A. platys* e *Leishmania*. O diagnóstico de *Leishmania* foi confirmado por pesquisa direta de amastigotas em aspirados de medula e linfonodo, portanto, esse percentual pode estar subestimado pela baixa sensibilidade da técnica comparado a técnicas sorológicas e/ou moleculares.

Tanto *E. canis* quanto *L. (L.) infantum*, são parasitos intracelulares obrigatórios de células do sistema fagocitário mononuclear (Killick-Kendrick, 1990; Dumler *et al.*, 2001). Em ambos, o hospedeiro pode desenvolver uma resposta imune específica celular ou humoral (Andrade *et al.*, 2014). As manifestações clínicas nas duas enfermidades são semelhantes e decorrem da interação dos patógenos com os órgãos linfóides como linfonodo, baço, fígado e medula óssea (Breitschwerdt, 2004; Soares *et al.*, 2005; Aguiar *et al.*, 2007). Considerando a co-infecção entre esses agentes infecciosos, a *L. (L.) infantum* pode levar a uma falha na resposta imune celular e humoral do hospedeiro e conseqüente favorecimento para o estabelecimento ou reativação de uma infecção pré-existente por *E. canis* (Barbieri, 2006). Ao mesmo tempo, é válido lembrar que *E. canis*

causa uma redução de receptores para moléculas de MHC II o que pode potencializar a progressão da LV canina (Harrus *et al.*, 2003).

Dentre as alterações patológicas observadas tanto na EMC quanto LV, têm-se as desordens hemostáticas, sendo que a redução plaquetária se destaca em ambas as doenças (Harrus *et al.*, 1999; Ciaramella *et al.*, 2005). Em algumas abordagens focadas nesse contexto constataram que cães co-infectados com *E. canis* e *L. (L.) infantum* apresentam trombocitopenia mais severa e com episódios hemorrágicos mais frequentes do que naqueles animais monoinfectados (Cortese *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2014). Além disso, foi visto que o tratamento concomitante para essas duas parasitoses é menos eficiente na recuperação clínica (Cortese *et al.*, 2009).

Um estudo recente avaliou alterações histopatológicas, hematológicas e laboratoriais em cães naturalmente co-infectados com *L. (L.) infantum* e *E. canis*, no qual observou uma anemia acentuada, um aumento do parasitismo cutâneo por *Leishmania* e altos níveis de proteínas plasmáticas totais, globulinas, fosfatase alcalina e creatina quinase, o que favoreceu o quadro mais severo observado nesses cães (Andrade *et al.*, 2014).

O diagnóstico de LV e/ou EMC em áreas endêmicas tornou-se desafiador quando questionamentos surgiram sobre a possibilidade de falsos-positivos devido às reações cruzadas nos testes sorológicos quando essas doenças acometiam simultaneamente o animal, como demonstrado por (Gomes e Cordeiro, 2004). No entanto, estudos mais recentes utilizando soro de cães provenientes de áreas endêmicas e não-endêmicas para LVC constataram apenas co-infecção entre *Leishmania*, *Babesia canis* e *E. canis* (Paulan *et al.*, 2013).

A patogênese da LV e EMC em cães co-infectados ainda não está esclarecida, seja em infecção natural ou experimental (Graham *et al.*, 2007). A compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia dessas doenças em casos de co-infecção permite explicar as variações na apresentação clínica, na patogenicidade e na resposta à terapêutica (Cortese *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2014).

Neste contexto, considerando que a leishmaniose visceral pode provocar lesões renais graves, e que pouco se sabe sobre nefropatias na erliquiose monocítica canina, o presente trabalho visa classificar a lesão renal em cães naturalmente infectados por *E. canis* e co-infectados por *L. (L.) infantum*, de modo a caracterizar a nefropatia nas duas enfermidades, bem como investigar mecanismos imunológicos envolvidos apontando os aspectos comuns e distintos que contribuem para o comprometimento renal.

Os dados serão apresentados na forma de dois artigos intitulados:

- 1) **Alterações histopatológicas em rins de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis***, seguindo as normas para publicação da revista Brazilian Journal of Veterinary Pathology.
- 2) **Imunopatologia da nefropatia em cães naturalmente infectados com *Ehrlichia canis* e co-infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum***, seguindo as normas para publicação da revista Plos One.

3. OBJETIVOS

✓ Objetivo Geral

Classificar as lesões renais e investigar os mecanismos imunes responsáveis pela nefropatia em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e naturalmente co-infectados por *L. (L.) infantum*, de modo a identificar diferenças no padrão de imunomarcadores de lesão renal nessas enfermidades.

✓ Objetivos específicos

- Caracterizar o padrão histopatológico da lesão renal, em particular, da glomerulopatia em cães naturalmente infectados por *E. canis*
- Correlacionar os achados clínico-laboratoriais com a lesão renal em cães naturalmente infectados por *E. canis*
- Classificar e caracterizar o perfil das lesões histopatológicas nos rins dos cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* e naturalmente co-infectados por *E. canis* e *L. (L.) infantum*.
- Identificar por imunomarcção moléculas T CD4⁺ e CD8⁺, bem como imunoglobulinas IgG, IgM, e IgA nos rins dos cães naturalmente infectados com *E. canis* e naturalmente co-infectados com *L. (L.) infantum*

4. CAPÍTULO I

Alterações histopatológicas em rins de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*

Lucilene dos Santos Silva^{1*}, Flaviane Alves de Pinho¹, Maria das Graças Prianti²,
Juliana Fortes Vilarinho Braga³, Lidiany Viana Pires¹, Sílvia de Araújo França¹,
Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva¹

¹Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, UFPI.

²Instituto de Ensino Superior Múltiplo, IESM

³Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG

*Autor para correspondência: Rua Antonio Marques, 1461, São Benedito, Timon-MA, CEP 65636-202, Brasil. E-mail: vetluc@hotmail.com

Resumo: O envolvimento renal na Erliquiose Monocítica Canina (EMC) tem sido demonstrado em casos crônicos sem classificação do padrão histopatológico das glomerulopatias. Assim, no presente estudo propusemos avaliar o padrão histopatológico dos tipos de glomerulopatia em rins de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* correlacionando-o com as alterações clínico-laboratoriais. Foram utilizados 12 cães naturalmente infectados com *E. canis* e seis cães saudáveis. Após avaliação clínica e confirmação do diagnóstico de EMC, os animais foram eutanasiados e fragmentos de rins foram coletados para avaliação histopatológica (H-E, Tricromio de Masson, PAS, PAMS e Vermelho Congo), imunohistoquímica e detecção molecular de *E. canis*. Na análise histopatológica, a lesão renal foi observada em 100% dos cães com

EMC, nos glomérulos e na região tubulointersticial. A glomerulonefrite membranoproliferativa foi evidenciada em 83,33% dos casos e proliferativa em 16,67%. Nefrite intersticial estava presente em todos os cães infectados em intensidade variando de mínima a severa, atingindo principalmente a cortical, com infiltrado inflamatório do tipo linfohistioplasmocitário localizado nas regiões intersticial, perivascular e periglomerular. Na contagem diferencial do infiltrado inflamatório, o predomínio de linfócitos foi significativo em relação aos plasmócitos e histiócitos. Outras alterações observadas foram fibrose intersticial e cilindros hialinos. Havia uma correlação inversa entre os níveis séricos de albumina e a severidade da glomerulopatia. Em conclusão, glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite intersticial são as principais lesões renais na EMC, com participação de células inflamatórias, especialmente linfócitos, sugerindo a participação destes na imunopatogênese da lesão renal em cães com EMC. Além disso, a hipoalbuminemia parece estar associada ao comprometimento renal na infecção por *E. canis*.

Palavras-chave: cão, *Ehrlichia canis*, rins, histopatologia.

Introdução

Erliquiose Monocítica Canina (EMC) é considerada uma das principais enfermidades infecciosas nos cães [34]. É uma doença cosmopolita com maior prevalência em áreas de clima tropical e subtropical [47]. O agente etiológico da EMC é a *Ehrlichia canis*, uma bactéria intracelular obrigatória que infecta células mononucleares disseminando-se para vários tecidos [11], sendo transmitida para o hospedeiro pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* [11]. Embora seja primariamente patogênica para caninos, a bactéria tem também potencial zoonótico [32].

A doença é caracterizada por três fases em: aguda, subclínica e crônica. As manifestações clínicas quando presente são inespecíficas como apatia, febre, vômito, lesões de pele, secreção ocular e nasal, esplenomegalia, mucosas pálidas, linfadenopatia, e hemorragias, mas quando severa, há comprometimento da medula óssea com pancitopenia, e o animal pode vir a óbito [5, 14, 28, 38]. Anormalidades como anemia, trombocitopenia, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia são comumente associadas à infecção por *E. canis*. Também é citado aumento sérico das concentrações de uréia, creatinina e fósforo [44].

Apesar de já existirem muitas pesquisas que contribuem na elucidação dos mecanismos envolvidos na patogênese da EMC, ainda são poucos aqueles focados na nefropatia de cães infectados com *E. canis*. Sabe-se que na fase aguda as células mononucleares infectadas circulantes invadem, principalmente, pulmões, rins e meninges e aderem-se ao endotélio vascular levando a vasculite e a infecção tecidual subendotelial [39].

A insuficiência renal não é uma alteração frequentemente associada à erliquiose, mas estudos demonstram que a deposição de imunocomplexos nos rins podem desencadear uma glomerulonefrite e predispor o animal à proteinúria [15, 17]. Esta foi caracterizada na infecção experimental de cães com *E. canis*, os quais desenvolveram uma proteinúria transitória, com perda de albumina, entre duas a três semanas após a infecção [10]. Em alguns casos também se observa aumento nas concentrações séricas de ureia e creatinina sugestivo de azotemia pré-renal [3] e/ou glomerulopatia nos casos crônicos [40].

Os principais achados histopatológicos são caracterizados por glomerulonefrite intersticial crônica multifocal [14] com presença de infiltrado linfoplasmocitário [9, 10]. Além disso, também é relatado infiltrado plasmocitário perivascular na junção

corticomedular, edema perivenular/periglomerular e necrose focal seguido de infiltrado celular [20, 33]. Acredita-se também que a infecção por *E. canis* pode ser responsável por insuficiência renal por amiloidose [25].

O comprometimento renal é evidente nos casos crônicos de cães com EMC, mas a caracterização morfológica das lesões renais, particularmente, das glomerulopatias é pouco explorada. Assim, pela primeira vez propusemos um estudo detalhado do padrão histopatológico enfatizando o tipo de lesão glomerular em rins de cães naturalmente infectados por *E. canis* de área endêmica Teresina-PI, no qual mostramos que na EMC a patologia renal é caracterizada por lesões tanto glomerulares como tubulointersticiais, sendo que a lesão mais importante é a glomerulonefrite do tipo membranoproliferativa.

Material e métodos

Triagem dos animais

18 cães adultos, machos e fêmeas, Sem Raça Definida (SRD), provenientes da Gerência de Zoonoses de Teresina, PI (GEZOON) foram utilizados nesse estudo, sendo 12 cães infectados com *E. canis* e 6 cães saudáveis. Os critérios para inclusão dos cães positivos foram por diagnóstico sorológico e molecular *nested*-PCR (nPCR) positivo para erliquiose, e negativos para leptospirose (SAM) e leishmaniose visceral (exame direto, DPP, ELISA e Imunoistoquímica). Os cães controles eram cães errantes, capturados para eutanásia como medida de controle da raiva urbana. Estes animais foram mantidos sob condições de alojamento habituais (alojamento, alimentação, temperatura e ventilação adequadas) no Centro de Controle de Zoonoses, na cidade de Teresina, PI, até eutanásia e estavam assintomáticos e negativos em todos os diagnósticos realizados.

Após avaliação clínica dos animais, 4 mL de sangue periférico foram colhidos por punção venosa em tubos contendo EDTA (BD Vacutainer®) para análises hematológicas e diagnóstico molecular de *E. canis*. Outros 10 mL de sangue periférico foram obtidos em tubos sem anticoagulante (BD Vacutainer®) para análise sorológica e bioquímica. Os animais foram eutanasiados para coleta de fragmentos de rins destinados ao exame histopatológico, imunistoquímica e para detecção de DNA de *E. canis*.

Considerações éticas

O protocolo de experimentação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal/Universidade Federal do Piauí sob o protocolo de nº 070/12, seguindo normas reguladoras de procedimentos relativos à eutanásia em animais, estabelecidas pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária, Resolução nº 714, em 20 de junho de 2002.

Diagnóstico de EMC

Sorologia- ELISA para anticorpos IgG anti-*E. canis*

Sorologia- ELISA (Immunocomb-ELISA, Biogal, Israel) foi utilizado para detectar anticorpos IgG anti-*E. canis*. A técnica foi realizada seguindo as normas do fabricante (Biogal Galed Laboratories Acs Ltd.).

Detecção molecular de *E. canis*

DNA foi obtido em amostras de sangue periférico, utilizando-se o kit *Illustra™ blood genomicPrep MiniSpin Kit* (GE Healthcare Life Sciences, UK), e para as amostras de tecido renal o kit *GeneJet Genomic DNA Purification* (Thermo Scientific, USA), conforme as recomendações do fabricante.

A detecção de *E. canis* foi realizada pela técnica de nPCR, na qual dois pares de oligonucleotídeos iniciadores foram utilizados de acordo com Wen et al. (1997) [48],

sendo as sequencias da primeira etapa da reação “EC1 sense”

5’AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC3’ e “EC1 antisense”

5’CGTATTACCGCGGCTGCTGGC 3’, e da segunda etapa “EC2 sense”

5’CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA3’ e “EC2 antisense”

5’TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT 3’. A reação foi preparada para um volume

total de 25µL contendo 0,625 U de enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, EUA),

1,5 mM MgCl₂, 1x Taq buffer, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen®, EUA), 400 nM de

primers e 15,05 µL de água ultra-pura estéril. A amplificação foi realizada em

termociclador (Bioer Gene pro®), a 94°C por cinco minutos, posteriormente por 40

ciclos: 94°C por um minuto, de 60°C por um minuto e de 72°C por um minuto e, um

ciclo final de cinco minutos a 72°C. Os ciclos das reações foram semelhantes para as

duas fases, com diferença apenas pelos pares de oligonucleotídeos iniciadores que foram

“EC1 sense” e “EC1 antisense” para a primeira amplificação, e “EC2 sense” e “EC2

antisense” para a segunda [48].

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a

1,5%, corados com brometo de etídeo (0,5µg/mL). As leituras foram visualizadas em

transluminador UV (BioAgency), sendo considerados positivos para *E. canis* as bandas

de tamanho aproximado de 390 pares de bases (pb).

Diagnóstico diferencial para leptospirose e LV

A técnica de Soro Aglutinação Microscópica (SAM) foi realizada no Laboratório

de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico de São Paulo para

detecção de anticorpos anti-*Leptospira* para 24 sorovares.

Os testes sorológicos utilizados para o diagnóstico de LV foram: DPP® (teste

imunocromatográfico que contém os antígenos recombinantes rK39), e o teste

imunoenzimático (*Enzyme linked immunosorbent assay* – ELISA) utilizando antígenos

totais de *L. major-like*, ambos produzidos pelo Instituto de Biotecnologia Bio-Manguinhos. Para confirmação de LV, aspirados de linfonodo poplíteo e/ou medula óssea esternal foram coletados para pesquisa direta de formas amastigotas de *Leishmania spp.* Além disso, imunistoquímica para imunomarcção de antígenos de *Leishmania* foi realizada em fragmentos de tecido renal no Setor de Patologia animal da UFPI.

Testes laboratoriais

Quatro mL de sangue periférico obtidos punção venosa em tubos contendo ácido etilodiaminotetracético-EDTA (BD Vacutainer®) para realização de exame hematológico analisado em contador automatizado (ABC vet, ABX Diagnostics, Montpellier, França). As análises bioquímicas foram analisadas em sistema semiautomático (Thermoplate TP Analyzer), utilizando-se os kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil), conforme recomendações do fabricante para quantificação sérica de proteínas totais (Ref. 99-250), albumina (Ref. 19-1/250), uréia (Ref. 27), creatinina (Ref. 35-100) e alanina aminotransferase (ALT) (Ref. 53-200).

Procedimento anestésico e eutanásia

Sob anestesia profunda por via intravenosa com associação de acepromazina (2 mg/Kg) e tiopental sódico 25 mg/kg, foi realizada a eutanásia dos cães com a administração de solução de cloreto de potássio a 20% para coleta de fragmentos de rim para exame histopatológico, os quais foram mantidos em formol a 10% tamponado com fosfato 0,01M pH 7,2, e/ou em solução fixadora Duboscq-Brasil por uma hora e então transferidos para formol tamponado por 24 horas até o processamento.

Análise histopatológica

As amostras de tecido renal foram processadas por técnicas histológicas de rotina e coradas com Hematoxilina-Eosina (H-E). Foram processados três fragmentos para avaliação e classificação das lesões renais, e 80 glomérulos foram avaliados para caracterização das alterações glomerulares[8]. Além disso, os cortes histológicos também foram submetidos a colorações específicas como Ácido Periódico de Schiff - *Periodic acid-Schiff* (PAS) para melhor visualização de alterações na membrana basal dos capilares glomerulares, células epiteliais tubulares e possível expansão da matriz mesangial; Tricrômico de Masson (TM) para detecção de elementos fibrosos à base de colágeno; Ácido Periódico Prata Metanamine (PAMS) para visualização de fibras reticulares do tecido conjuntivo, sendo específica para membrana basal; e Vermelho-Congo (VC) para visualização de depósito de amiloide [43]. As lesões observadas no exame histopatológico foram avaliadas de forma semi-quantitativa, mensurando-se a intensidade das lesões glomerulares e túbulointersticiais em escala de 0 a 4 onde: 0 = normal, 1 = mínima ou duvidosa; 2 = média (leve); 3 = moderada; 4 = severa[8]. As glomerulopatias foram classificadas segundo Max e Newman (2007) [26], que definiram as glomerulonefrites conforme as alterações morfológicas em: 1) glomerulonefrite membranosa onde há predomínio de espessamento da membrana basal glomerular; 2) glomerulonefrite proliferativa (mesangioproliferativa), caracterizada pelo predomínio de proliferação celular; 3) glomerulonefrite membranoproliferativa (mesangiocapilar), onde ocorre tanto espessamento da membrana basal glomerular, quanto proliferação celular; e 4) glomerulonefrite esclerótica, caracterizada por aumento da matriz mesangial e obliteração do lúmen capilar, com hialinização progressiva que resulta em transformar o glomérulo em uma massa eosinofílica hipocelular. A localização da lesão glomerular foi caracterizada como segmentar ou global, e a distribuição das lesões em focal ou difusa [7]. A celularidade e área glomerular foram avaliadas em 30 glomérulos por amostra

selecionados aleatoriamente [12, 42]. A quantificação diferencial das células inflamatórias na região cortical do rim foi realizada em 10 campos aleatórios no analisador de imagem computadorizado Leica Qwin D-1000, versão 4.1 (Cambridge, UK). A exposição dos dados foi em células/500.000 μm^2 .

Análise imunoistoquímica

Reação de imunoistoquímica foi realizada para excluir amostras positivas para *Leishmania*. Cortes de tecido renal embebidos em parafina foram desparafinados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico e submetidos ao bloqueio de peroxidase endógena e, posteriormente, tratados com solução Tris-HCl, pH 1,0. Em seguida, os tecidos foram incubados *overnight* a 4°C em atmosfera úmida com os anticorpos primários: anticorpo policlonal de camundongo anti-*Leishmania amazonensis* [Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia-IMT-USP-SP] [13]. Após a incubação, seguiram-se as etapas de amplificação da reação utilizando os sistemas *Envision+Sistem-HRP Labelled polymer, anti-mouse*, DAKO. As amostras foram incubadas em atmosfera úmida a 37°C intercaladas por lavagens em PBS e a revelação feita com 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical, EUA) em PBS com peróxido de hidrogênio e seguiu-se a contracoloração com hematoxilina de Harrys e montagens das lâminas para pesquisa de imunomarcção por+ antígenos de *Leishmania* em microscopia de luz

Análise estatística

Os resultados quantitativos foram analisados por testes paramétricos ou não paramétricos de acordo com a natureza dos dados, utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 6 demo statistical software (Califórnia, Estados Unidos). Foram consideradas diferenças significantes quando $P < 0,05$.

Resultados e discussão

Na nefropatia de cães com EMC, os aspectos patológicos ainda são pouco explorados [9, 10, 14, 33], mesmo que alguns estudos têm demonstrado que a infecção por *E. canis* pode causar lesão renal [16, 17, 20]. Sabendo que a EMC é endêmica na nossa região e que o conhecimento do perfil da lesão renal pode contribuir para terapêutica, propusemos nesse estudo caracterizar o padrão histopatológico em rins de 12 cães naturalmente infectados por *E. canis* correlacionando-o com os aspectos clínico-laboratoriais. Vale ressaltar, que todos os cães com EMC eram negativos para leishmaniose visceral e leptospirose.

Avaliação clínica e laboratorial

Na avaliação clínica dos 12 cães com EMC, as manifestações clínicas eram inespecíficas, sendo linfadenopatia e lesões dermatológicas os principais achados, ambos observados em 83,33% dos cães. Esses sinais são comumente descritos em diferentes estágios da erliquiose canina [5, 30, 38].

No perfil hematológico dos 12 cães com EMC, as principais alterações foram anemia e trombocitopenia. Dos cães anêmicos, 80% apresentaram o tipo anemia normocítica normocrômica, e redução de plaquetas estava presente em 50% dos cães infectados. Leucopenia e leucocitose foram observadas em 25% e 33,33% dos casos respectivamente (Tabela 1). Essas alterações hematológicas são frequentemente relatadas em cães infectados, em consequência de mecanismos multifatoriais [2, 6, 14, 29].

Na EMC, um aumento dos níveis de creatinina e ureia sérica tem sido relatado na literatura [45]. Com base nesses dados, também avaliamos esses analitos em nossos cães com EMC, os quais apresentaram níveis circulantes sem alterações (Tabela 1). A azotemia pré-renal pode ocorrer em casos agudos e/ou crônicos na erliquiose devido à

desidratação severa [3], bem como azotemia renal em casos crônicos com glomerulonefrite acentuada [40]. No entanto, a ausência e/ou baixa frequência do aumento de uréia e creatinina na circulação não exclui a presença da lesão renal, já que a azotemia renal é detectada quando mais de 75% dos glomérulos estão afetados [46]. Além disso, os cães utilizados nesse estudo eram naturalmente infectados, portanto, não sabemos exatamente a fase da infecção e conseqüente nível de comprometimento nos rins desses animais.

A hiperglobulinemia e hipoalbuminemia também foram observadas em nossos cães, estando presente em 91,67% e 41,67% dos cães, respectivamente (Tabela 1), sendo essas alterações classicamente descritas na EMC [14, 36, 38]. A hiperglobulinemia na EMC ocorre principalmente devido a uma gamopatia policlonal, em que o aumento na concentração de gama globulinas atinge seu pico no estágio febril e persiste nas fases subclínica e crônica [35]. A hipoalbuminemia na erliquiose parece ser em conseqüência do aumento da permeabilidade vascular, hemorragias, dano hepático [49] e/ou renal [9,10].

Table 1. Perfil hematológico e bioquímico* de 12 cães naturalmente infectados com *E. canis*

Cães	Hemácias* (x 10 ⁶ /mm ³)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	CHCM (%)	Leucócitos (x 10 ³ /mm ³)	Plaquetas (x 10 ³ /mm ³)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Prot Total (g/dL)	Alb (g/dL)	Glob (g/dL)	ALT# UI/L
1	5,11	11,9	36,5	73	31,8	5,7	124	33,00	1,50	8,03	2,94	5,09	25,80
2	5,38	13,1	35,0	65	36,0	8,3	25	59,00	1,54	8,33	3,87	4,46	37,80
3	3,49	9,5	24,2	69	33,6	5,6	46	50,00	0,76	9,00	2,84	6,16	39,30
4	5,32	12,4	33,2	61	35,5	7,7	382	52,00	0,65	7,60	1,90	5,70	12,00
5	4,12	10,1	23,9	58	32,1	3,2	111	34,00	0,88	8,85	3,44	5,41	38,76
6	6,41	14,0	44,1	69	31,7	11,2	27	23,00	1,35	8,90	1,40	7,50	23,40
7	7,83	14,6	47,9	61	32,4	8,2	364	24,40	1,00	7,40	2,60	4,80	68,49
8	4,10	11,4	27,9	67	32,1	23,5	67	20,32	1,01	8,06	3,35	4,71	26,97
9	3,97	8,4	25,8	65	32,4	33,1	273	20,00	1,25	4,10	2,60	1,50	31,80
10	5,00	7,4	23,4	59	31,7	11,7	298	14,00	0,58	8,50	2,20	6,30	36,30
11	5,31	11,0	33,5	63	32,9	20,0	470	51,00	1,02	8,80	2,10	6,70	15,00
12	4,62	9,0	27,8	60	32,3	32,4	219	26,40	0,84	7,05	1,40	5,65	10,89

*Valores de referência: # Hemácias = 5,5-8,5 (x10⁶/mm³); Hb (hemoglobina) = 12-18 g/dL; Ht (hematócrito) = 37-55%; VCM (Volume Corpuscular Médio) = 60-77 fL; CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) = 32-36 %; Leucócitos = 6-17 x 10³/mm³; Plaquetas = 200-500 x10³/mm³ (24); Ureia: 21,40-59,92 mg/dL; Creatinina: 0,50-1,50 mg/dL; Prot Total (proteína Total): 5,40-7,10 g/dL; Alb (albumina): 2,60-3,30 g/dL; Glob (globulina): 2,70-4,40 g/dL; ALT (Alanina aminotransferase) :21-73 UI/L, [22, 27].

Análise histopatológica dos rins de cães com EMC e correlação com os achados clínico-laboratoriais

Sabe-se que a infecção por *E. canis* pode afetar diferentes órgãos, inclusive os rins [14, 33]. Contudo, poucos são os estudos que avaliaram o padrão histopatológico na lesão renal de cães com EMC, sobretudo a caracterização das glomerulopatias [9, 10, 14].

Em nosso estudo, nos 12 cães com EMC, observamos alterações renais em 100% dos casos, com lesões em intensidade mínima a moderada. É evidente a importância do exame microscópico nesses casos, uma vez que a maioria dos animais apresentaram lesões mínimas. Somente um caso em que as alterações histopatológicas eram em intensidade moderada, foi observado lesão macroscópica nos rins como áreas pálidas de distribuição focal, com superfície irregular e consistência firme devido à fibrose.

Um dado interessante é que detectamos DNA de *E. canis* no tecido renal dos dois cães que tinham uma glomerulopatia e nefrite intersticial mais severas, sugerindo que a presença e/ou persistência da bactéria pode contribuir para as alterações patológicas nesse órgão (Tabela 2). Vale lembrar, que essas amostras foram negativas na análise imunohistoquímica para detecção de *Leishmania*. Na LV, as lesões renais são classicamente descritas e associadas a diferentes tipos de glomerulopatias em graus de severidade variáveis [13].

Na fase crônica, a magnitude das alterações clínico-patológicas é variável e dependente da resposta imune do hospedeiro e da cepa inoculada. Um estudo realizado por Hasewaga (2005) [19], em cães experimentalmente infectados por *E. canis* acompanhou por 70 dias a evolução da doença, sendo que a partir do 20º dia pós-infecção os animais apresentaram melhora no quadro clínico e laboratorial. No entanto,

a persistência da infecção foi constatada pela positividade da PCR e esplenomegalia até a décima semana após a inoculação de *E. canis*. Nesse estudo não foi citado nenhum sinal clínico sugestivo de comprometimento renal durante a fase aguda e/ou crônica. Também não observamos em nossos cães sinais clínicos sugestivos de lesão renal como ulcerações na mucosa, polidipsia e/ou poliúria, bem como hálito urêmico, sendo as manifestações clínicas inespecíficas e sem correlação com o comprometimento renal evidenciado nesses animais. Vale acrescentar, que a lesão tecidual observada nos rins dos cães desse estudo, mesmo naqueles de intensidade moderada, não necessariamente seja representativa para todo o órgão a ponto de desenvolver sinais clínicos. A determinação da fase clínica na infecção natural de cães por *E. canis* é extremamente difícil e muitas vezes dificulta o diagnóstico pela variedade dos sinais clínicos inespecíficos decorrentes da infecção [31].

A hipoalbuminemia também foi uma alteração frequente e que pode ser indicativa de lesão renal e/ou hepática [10, 47]. Notavelmente, os cães que apresentaram hipoalbuminemia em nosso estudo tinham uma correlação negativa com a severidade da glomerulopatia sugerindo que a diminuição dos níveis séricos de albumina está associada ao comprometimento glomerular conforme a intensidade da lesão (Figura 1). Hipoalbuminemia por dano hepático não parece ter ocorrido nesses casos, pois de acordo com Thrall (2007) [41], a hipoalbuminemia em consequência de doença hepática só é observada quando há perda de sessenta a oitenta por cento da função hepática, Além disso, nesses casos normalmente ocorre ascite, manifestação clínica esta que não foi observada nesses animais, ao exame clínico e autópsia.

Neste estudo os cães com EMC não apresentaram alteração nos níveis séricos de ureia e creatinina, portanto, não foi evidenciado correlação entre esses analitos e os achados histopatológicos nos rins desses animais. Vale lembrar, que é necessário um

acometimento em mais de 70% dos rins para que mudanças no perfil desses analitos seja detectado à nível sérico [46].

Tabela 2. Detecção de *E. canis* em tecido renal por nPCR e análise histopatológica em rins de cães naturalmente infectados por *E. canis*

Cães	Tipo e intensidade de Glomerulonefrites	Nefrite intersticial #		
		Infiltrado inflamatório mononuclear		nPCR
		Corticomedular	Cortical	
1	Membranoproliferativa difusa média	0	1	+
2	Membranoproliferativa focal moderada	3	4	+
3	Membranoproliferativa focal moderada	4	4	+
4	Membranoproliferativa focal média	3	1	-
5	Membranoproliferativa focal média	2	2	-
6	Membranoproliferativa focal moderada	1	1	-
7	Membranoproliferativa difusa média	2	4	-
8	Membranoproliferativa focal moderada	1	2	+
9	Membranoproliferativa focal moderada	1	1	-
10	Proliferativa difusa média	1	2	-
11	Prolifertiva focal média	0	1	-
12	Membranoproliferativa focal moderada	0	1	-

= Escala de escore de intensidade das lesões (0 = ausente, 1 = mínima, 2 = média (leve), 3 = moderada, e 4 = severa).

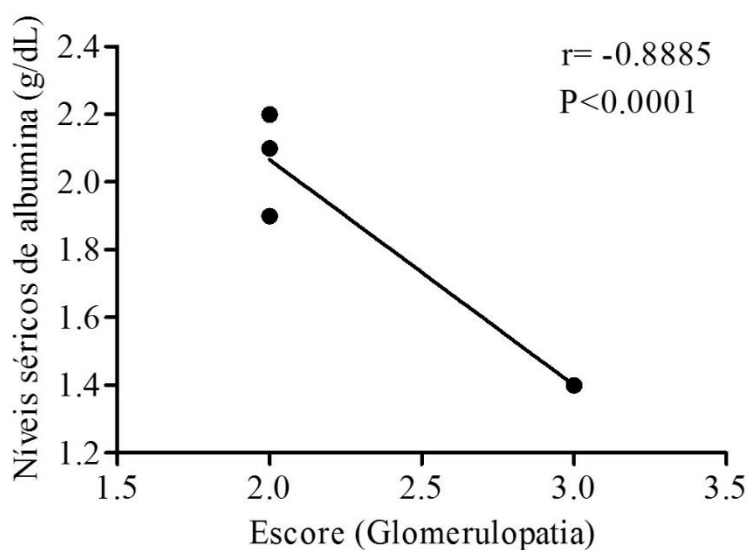


Figura 1. Correlação negativa entre os níveis séricos de albumina e a severidade da glomerulopatia em cães naturalmente infectados com *E. canis*. Teste de Spearman.

Na literatura, nos estudos com cães naturalmente infectados por *E. canis* não observaram lesão glomerular [20], mas em infecções experimentais tem-se descrito lesões glomerulares e tubulares mínimas [9, 10, 14]. Assim, ressaltamos a importância da nossa pesquisa, na qual pela primeira vez demonstra que na infecção natural de cães por *E. canis* pode ocorrer um comprometimento glomerular importante. Constatamos que 50% dos cães com EMC apresentaram uma glomerulopatia em intensidade moderada, sendo que eram acompanhados de uma nefrite intersticial em intensidade variando de mínima a moderada (Tabela 2).

Alterações glomerulares em cães com EMC

Para melhor compreender os achados histopatológicos nos rins de cães com EMC, caracterizamos as glomerulopatias seguindo a classificação descrita por Max e Newman (2007) [26], em: membranosa, proliferativa, membranoproliferativa e esclerótica. Além disso, avaliamos a distribuição da lesão nos glomérulos. Vale

acrescentar que não encontramos nenhum dado na literatura com essa abordagem em cães naturalmente infectados por *E. canis*.

A glomerulopatia estava presente em 100% dos animais infectados (Tabela 3), sendo que a distribuição da lesão glomerular era focal e difusa em 75% e 25% dos casos respectivamente. A glomerulopatia membranoproliferativa predominou em 83,33% (10/12) dos cães com EMC. No glomérulo, observamos espessamento da matriz mesangial e da membrana basal dos capilares glomerulares, confirmado pela coloração de PAS (Figura 2A), acompanhado por um aumento acentuado de células mononucleares no mesangio (Fig 3A e D), comparado ao glomérulo normal Figura 3B). Além disso, observou-se aumento do tufo glomerular e redução do espaço urinário (Fig 3D), sobretudo nos casos de intensidade moderada. A hiper celularidade glomerular foi confirmada pela média do número de células contadas em 30 glomérulos de cada animal. Os cães infectados por *E. canis* apresentaram maior número de células no glomérulo em relação aos cães controles. A glomerulonefrite membranoproliferativa tem prognóstico reservado, sendo uma das glomerulonefrites que evoluem para insuficiência renal terminal[4].

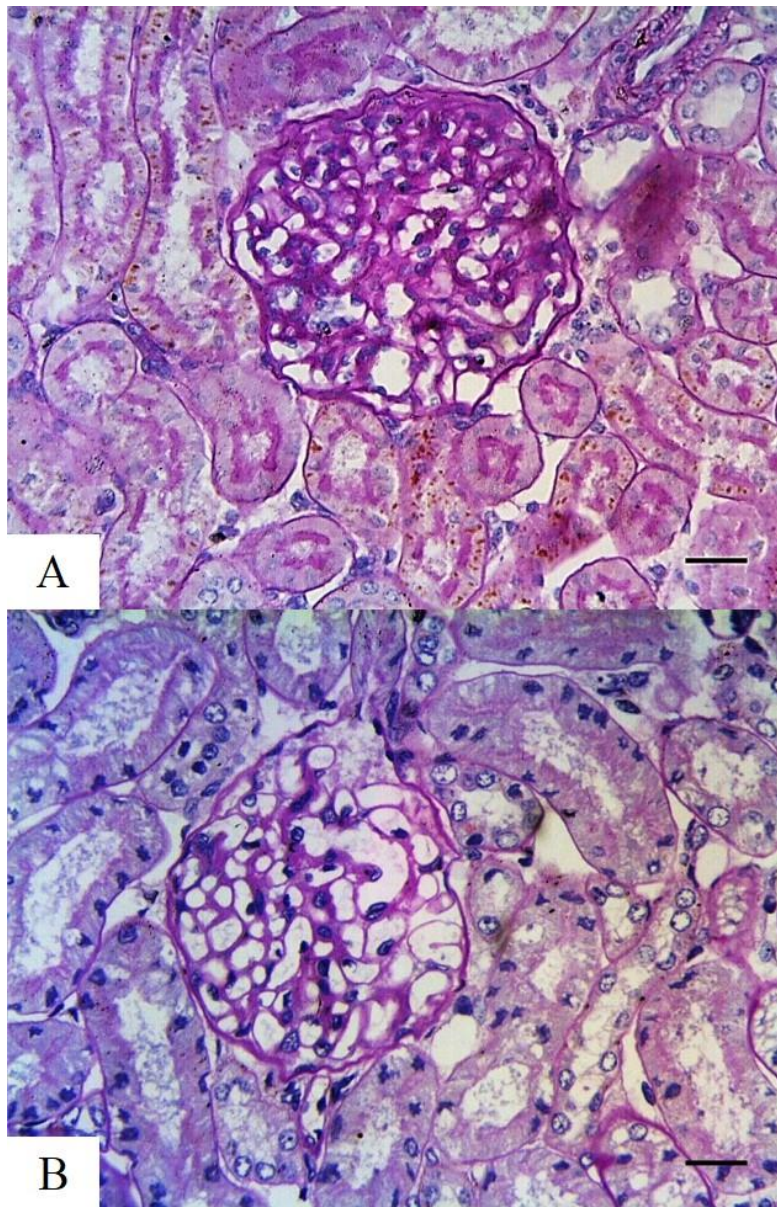


Figura 2. Glomerulonefrite membranoproliferativa em cão naturalmente infectado por *E. canis*. (A) Espessamento da membrana basal capilar e do mesangio; (B) Glomérulo com ausência de espessamento da membrana basal capilar. PAS. Barra= 25 μ m.

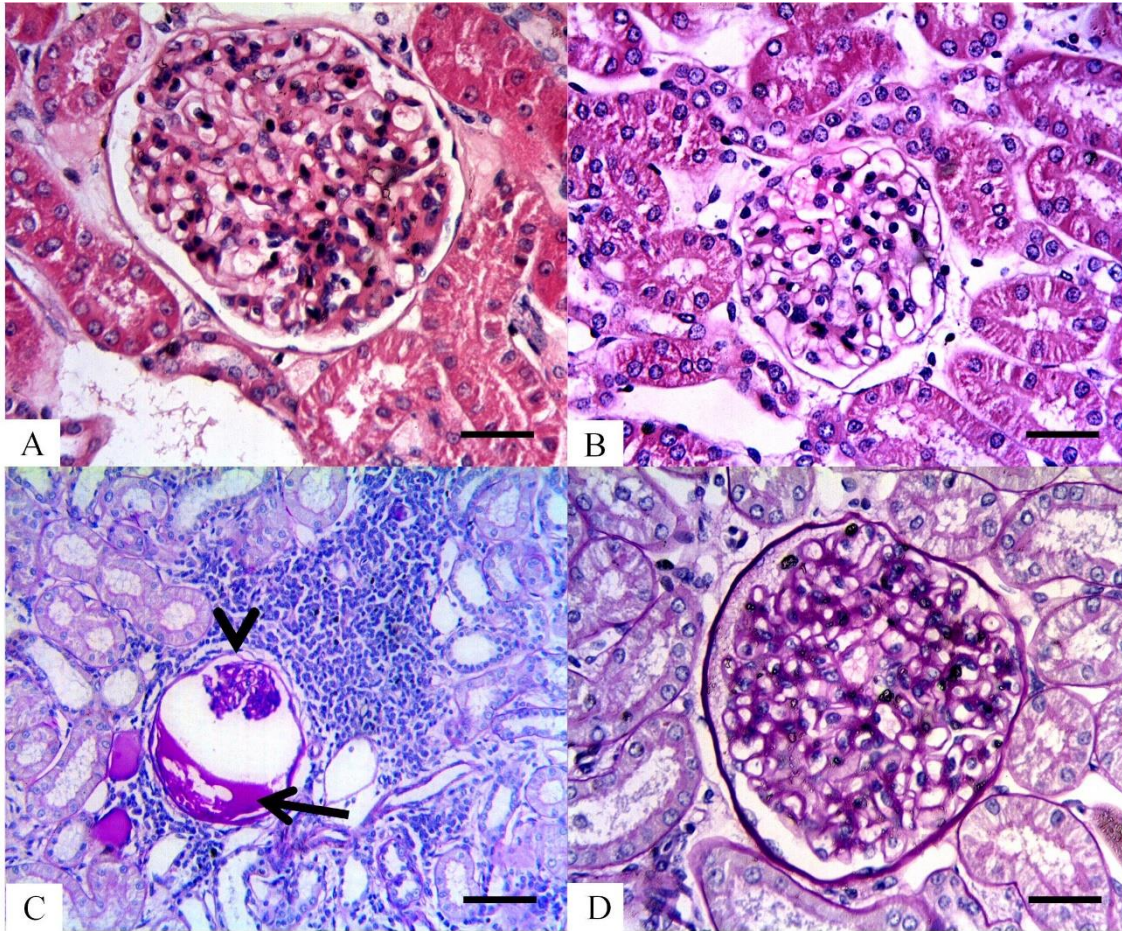


Figura 3. Lesões glomerulares em rins de cães naturalmente infectados por *E.canis*. (A) GNMP. Hipercelularidade glomerular (H-E); (B) Glomérulo normal (H-E). Barra = 25 μ m; (C) Depósito proteico no espaço urinário (seta) e esclerose glomerular (cabeça da seta) (PAS). Barra = 50 μ m; (D) GNMP. Redução do espaço urinário, espessamento mesangial e redução do espaço urinário (PAS). Barra = 25 μ m.

A glomerulopatia proliferativa estava presente apenas em dois cães em intensidade leve. Em ambos a lesão era global, sendo de distribuição focal em um caso e global em outro. Neste tipo de lesão glomerular, observamos um aumento de células mononucleares no mesangio e expansão da matriz mesangial (Figura 4), O comprometimento capilar era mínimo.

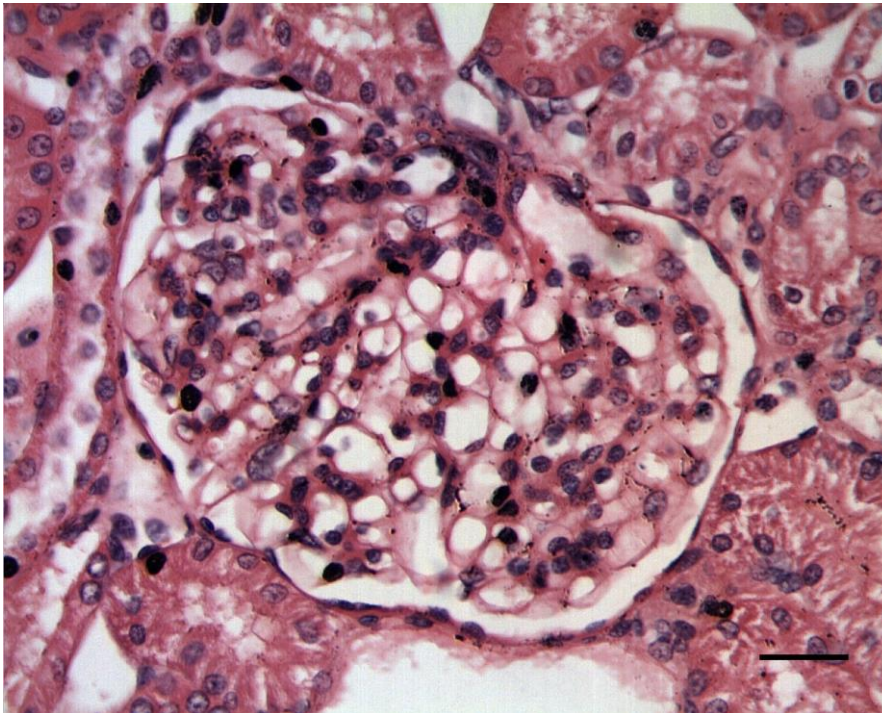


Figura 4. Glomerulonefrite proliferativa em rim de cão naturalmente infectado por *E. canis*. Hiper celularidade e aumento glomerular. (H-E). Barra = 25 μ m

Em menor intensidade, outras alterações glomerulares observadas foram: depósitos protéicos no espaço urinário, leve esclerose glomerular (Figura 3C) e espessamento da cápsula de urinária.

Tabela 3. Alterações glomerulares observadas em rins de cães naturalmente infectados por *E. canis*

Cães	Glomerulopatia		Hipercel glom#	Esclerose glomerular	Espessam mesangial ¥	Espessam MB cap glom £	Espessam cápsula urinária ∞	Dep prot espaço urinário Ω	Redução espaço urinário α	Lobulação do glom β
	Tipo	Intensidade								
1	GNMP	2*	4	1	2	4	2	0	4	1
2	GNMP	3	3	2	1	0	0	0	1	0
3	GNMP	3	2	1	3	3	3	3	3	3
4	GNMP	2	4	0	3	2	4	1	4	0
5	GNMP	2	3	1,	3	2	3	0	4	2
6	GNMP	2	3	2	3	1	4	0	4	0
7	GNMP	3	2	0	0	0	2	0	2	0
8	GNMP	3	3	2	3	1	2	0	2	1
9	GNMP	3	2	2	2	2	1	0	1	3
10	GNP	2	3	2	3	1	2	0	1	0
11	GNP	2	3	0	3	1	2	0	3	3
12	GNMP	3	4	0	3	2	1	0	2	3

GNMP = glomerulonefrite membranoproliferativa; GNP = glomerulonefrite proliferativa; * = escala de escore de intensidade das lesões (0 = ausente, 1 = mínima, 2 = média (leve), 3 = moderada, e 4 = severa); # = hiper celularidade glomerular; ¥ = espessamento da matriz mesangial; £ = espessamento da membrana basal dos capilares glomerulares; ∞ = espessamento da cápsula urinária; Ω = depósitos protéicos no espaço urinário; α = redução do espaço urinário; β lobulação do glomérulo.

Nas doenças renais crônicas, a injúria renal está associada a ação direta ou indireta do sistema imunológico. Geralmente, a lesão mediada diretamente pelo sistema imune afeta o glomérulo causando diferentes perfis de glomerulonefrites [37]. Com base em nossos dados, a infecção por *E. canis* parece induzir, particularmente, a lesão glomerular do tipo membranoproliferativa. Nos estudos avaliando a lesão renal em cães com *E. canis* seja na infecção natural e/ou experimental, a maioria quando encontrou alguma alteração era em intensidade mínima sem caracterização do tipo de glomerulonefrite [9, 10, 15].

Alterações intersticiais em cães com EMC

Além das alterações glomerulares, também observamos lesões tubulointersticiais em todos os cães com EMC, sendo que a nefrite intersticial predominou em 100% dos casos em intensidade variando de mínima a severa. A presença do infiltrado inflamatório em maior intensidade era na cortical localizado na região intersticial, perivascular e/ou periglomerular (Tabela 4) (Figura 5). Codner et al (1992) [10], observaram um infiltrado linfoplasmocitário especialmente na região cortical, Outro estudo realizado em cães naturalmente infectados por *E. canis*, demonstrou que 98% dos animais apresentavam um infiltrado plasmocitário ao redor de veias e artérias da região corticomedular [20]. Infiltrado na cortical na região perivascular por plasmócitos e histiócitos, se estendo para a região córtico-medular também foi evidenciado na fase aguda em infecção experimental [33].

Tabela 4. Características histológicas de nefrite intersticial e outras lesões observadas nos rins de cães naturalmente infectados com *E. canis*

Cães	Nefrite intersticial			Outras lesões
	Tipo de infiltrado inflamatório	Distribuição	Intensidade	
1	Linfocitoplasmocitário	Intersticial, perivascular, periglomerular focal	Mínimo	Degeneração tubular vacuolar; necrose; dilatação e atrofia tubulares; cilindros hialinos
2	Linfocitoplasmocitário	Intersticial, perivascular, periglomerular multifocal coalescente	Severo	Degeneração tubular vacuolar; necrose; dilatação e atrofia tubulares; cilindros hialinos; fibrose intersticial
3	Linfoplasmohistocitário	Intersticial, perivascular, periglomerular, subcapsular multifocal coalescente	Severo	Degeneração tubular vacuolar; necrose; dilatação e atrofia tubulares; cilindros hialinos; fibrose intersticial
4	Linfocitoplasmocitário	Intersticial, perivascular, periglomerular Multifocal	Médio (leve)	Fibrose intersticial
5	Linfocitoplasmocitário	Intersticial, perivascular multifocal	Mínimo	Degeneração tubular vacuolar
6	Linfocitoplasmocitário	Intersticial, perivascular multifocal	Mínimo	Degeneração tubular vacuolar; necrose e atrofia tubulares; cilindros hialinos
7	Plasmolinfocitário	Intersticial focal	Severo	Cilindros hialinos
8	Linfocitoplasmocitário	Intersticial, perivascular, subcapsular multifocal	Médio (leve)	Degeneração tubular vacuolar; cilindros hialinos; fibrose intersticial
9	Linfocitoplasmocitário	Intersticial, perivascular, periglomerular multifocal	Mínimo	Degeneração tubular vacuolar
10	Linfoplasmocitário	Intersticial, perivascular, periglomerular multifocal	Médio (leve)	Degeneração tubular vacuolar e dilatação tubular
11	Histiocitoplasmocitário	Intersticial focal	Mínimo	Degeneração tubular vacuolar; necrose e dilatação tubulares
12	Histioplasmolinfocitário	Intersticial focal	Minimum	Sem alterações

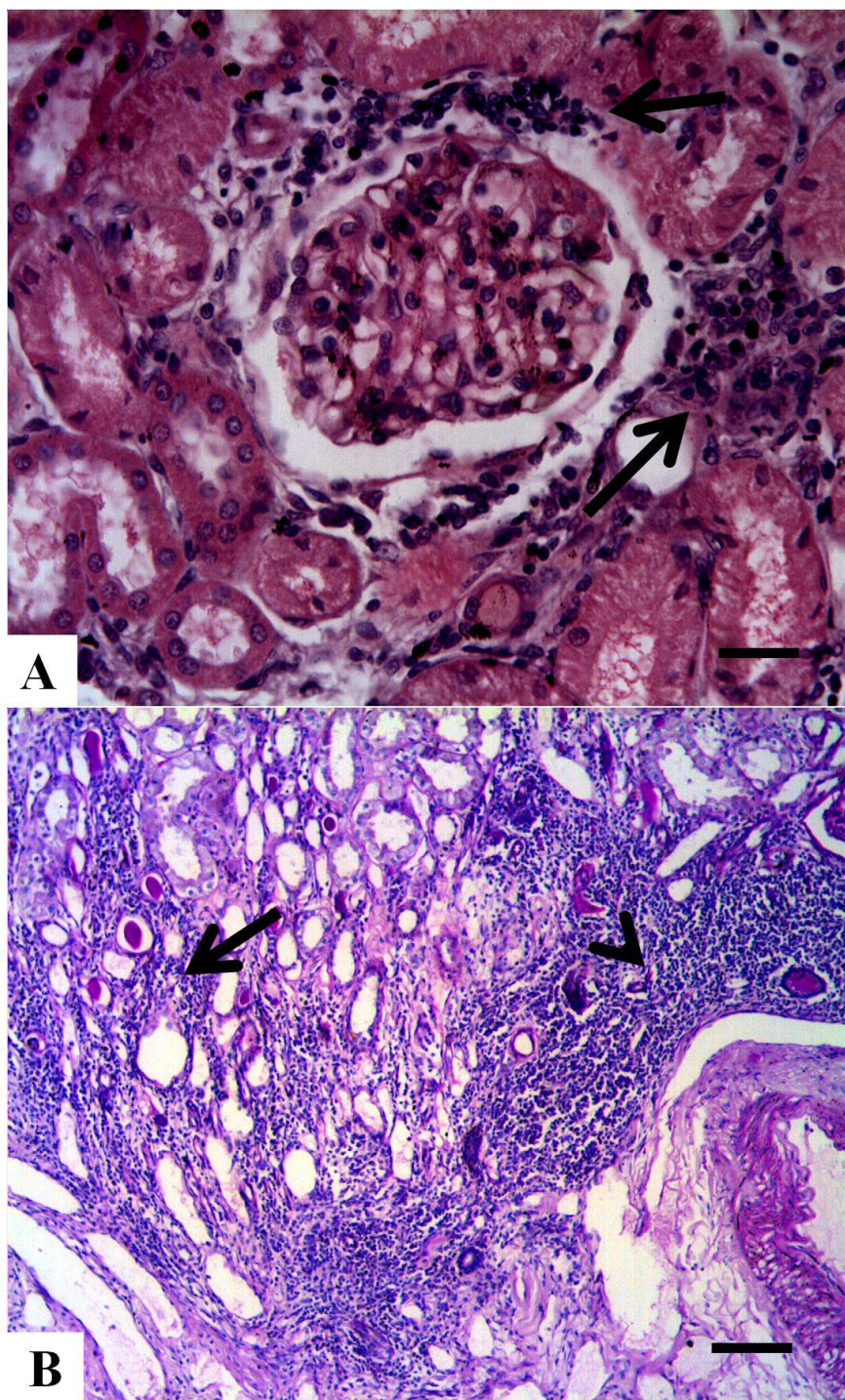


Figura 5, Infiltrado inflamatório em rins de cães naturalmente infectados por *E. canis*. (A) Infiltrado inflamatório mononuclear periglomerular (setas). H-E. Barra= 25 μm ; (B) Infiltrado inflamatório mononuclear intersticial (seta) e perivascular (cabeça da seta). H-E. Barra= 100 μm .

A patogenia da EMC parece estar relacionada à citotoxicidade dependente de anticorpos [14, 21], levando à intensa vasculite em diferentes órgãos, nos quais é observado infiltrado inflamatório perivascular predominantemente plasmocitário [20]. Na nossa análise, observamos na cortical um infiltrado linfohistioplasmocitário perivascular sem evidências de comprometimento da parede dos vasos, sugerindo que outros mecanismos podem contribuir para a lesão renal.

Na região cortical, o infiltrado inflamatório era principalmente linfohistioplasmocitário em 58,33% dos casos, com um predomínio significativo de linfócitos em comparação aos plasmócitos e histiócitos na contagem diferencial (Figura 6), diferindo de Codner et al (1992) [9] que demonstraram infiltrado na cortical linfoplasmocitário em infecção experimental. Em nosso estudo observamos infiltrado linfohistioplasmocitário perivascular na região corticomedular em 33,33% dos cães concordando com outros estudos em infecção natural [20]. Na patofisiologia das glomerulonefrites, a lesão glomerular pode alterar a homeostasia na região tubulointersticial por diversos mecanismos, sendo que um deles é o recrutamento de linfócitos T devido à produção de citocinas inflamatórias e fatores de quimiotaxia pelas células dendríticas residentes do rim [23]. Seguindo esse raciocínio e considerando que a erliquiose é uma doença imunoreguladora, o predomínio de linfócitos T parece contribuir para a patogênese da nefrite intersticial na EMC.

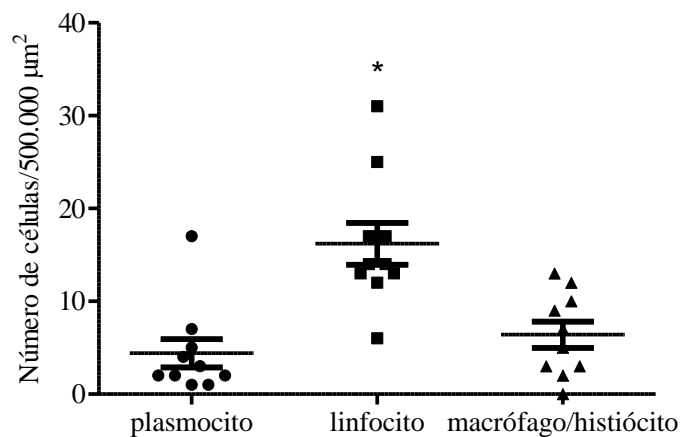


Figura 6. Contagem diferencial do infiltrado inflamatório de rins de cães naturalmente infectados com *E. canis*. Predomínio significativo de linfócitos no infiltrado inflamatório na região cortical. * $P < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis e Dunns,

A fibrose intersticial estava presente em 33,33% dos cães desse estudo em intensidade mínima a moderada (Tabela 4). A fibrose não é uma lesão comumente descrita na EMC, provavelmente pelo fato dos estudos terem conduzido a análise na fase aguda ou subclínica da doença [9, 10, 14, 20, 32], quando sabidamente a injúria renal por *E. canis* é mais comum na fase crônica [15]. Em nossos achados, a fibrose estava mais evidente nos casos em que havia infiltrado mais intenso, e só foi observada em intensidade moderada em apenas um animal (Figura 7), sendo que a distribuição da lesão acompanhava o infiltrado multifocal coalescente, e nas áreas com maior evidência de fibrose também evidenciamos dilatação e atrofia tubulares. Nesse caso a glomerulopatia era membranoproliferativa moderada, mas o animal ainda não apresentava alterações nos níveis séricos de ureia e creatinina, provavelmente por não ter fibrose comprometendo o rim em toda sua extensão.

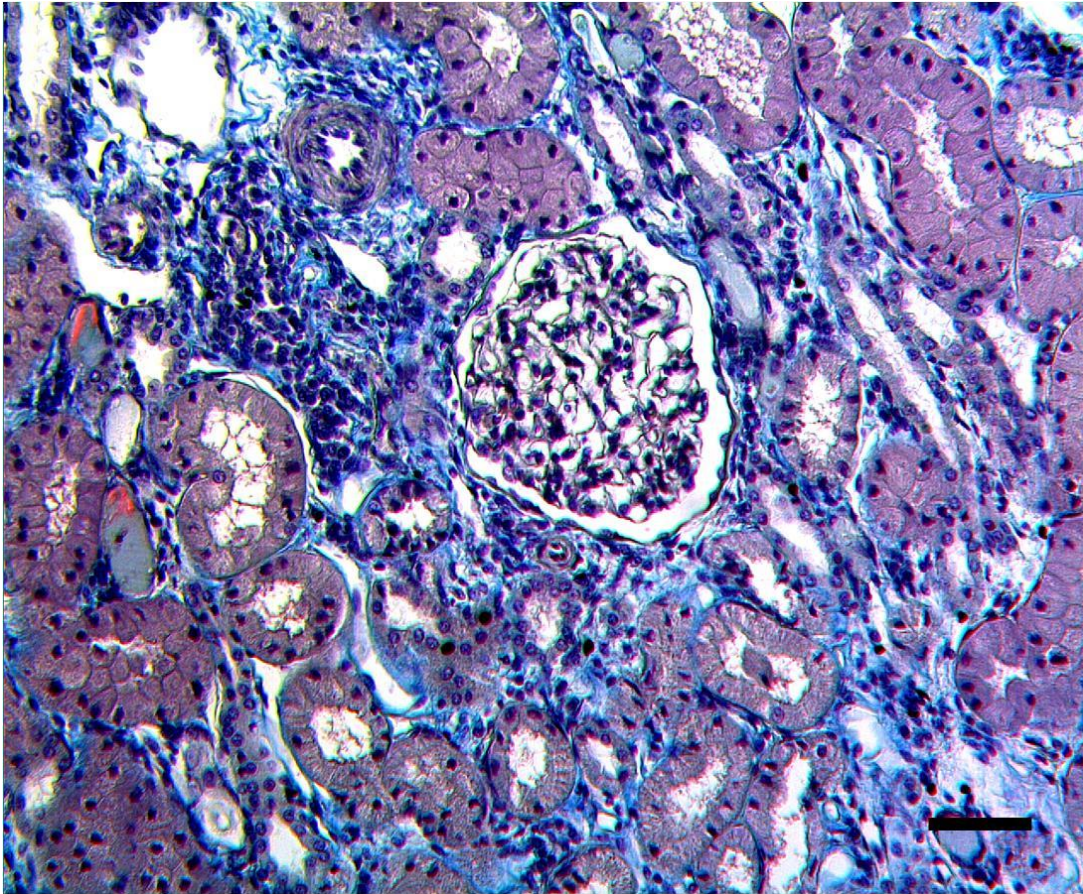


Figura 7. Fibrose intersticial em rim de cão naturalmente infectado por *E. canis*. Presença de fibrose intersticial moderada (em azul) localizado na região peritubular e periglomerular. Tricrômio de Masson. Barra = 50 μ m.

A presença de cilindros hialinos foi observada em 50% dos nossos cães, sendo que em dois casos em intensidade severa (Tabela 4) (Figura 8). Não foi possível realizar a urinálise nesse estudo, mas esse achado confirma a presença de proteinúria nesses animais. De acordo com Troy e Forrester (2006) [44], a proteinúria, com ou sem azotemia, pode ocorrer em cães com erliquiose. Na fase aguda da EMC, foi observado que a proteinúria estava inversamente correlacionada com os níveis séricos de albumina, sugerindo que a hipoalbuminemia na EMC pode decorrer de perda da proteína nos rins [10].

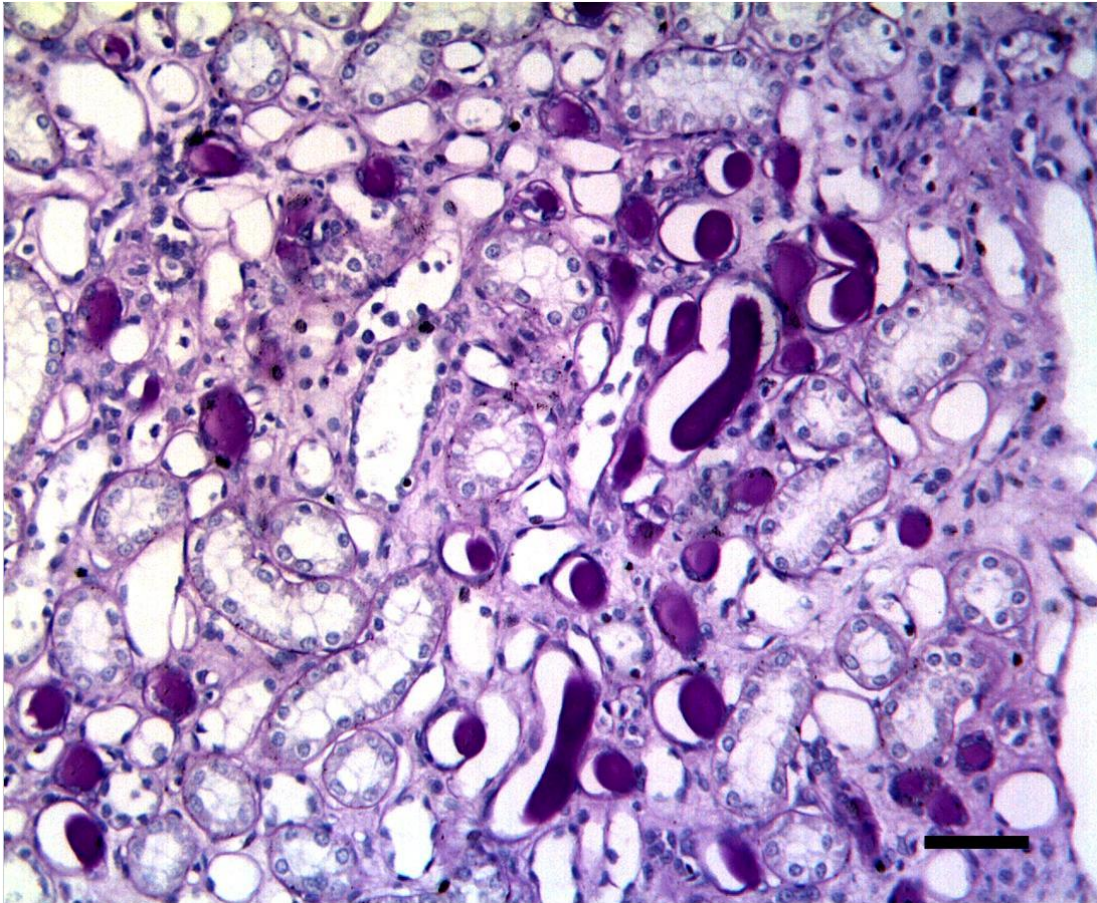


Figura 8. Presença de cilindros em rim de cão naturalmente infectado por *E. canis*. Túbulos renais contendo cilindros hialinos. PAS. Barra= 50 μ m.

Alterações circulatórias como congestão vascular, hemorragia e edema também foram observados ocasionalmente. Além disso, na região medular houve dois casos de pielite linfocítica em intensidade mínima a média, e quatro de pielonefrite variando de intensidade média à severa.

Conclusões

Este estudo fornece pela primeira vez a caracterização da glomerulopatia na lesão renal em cães naturalmente infectados por *E. canis*. Nossos estudos mostram que a glomerulonefrite membranoproliferativa foi a principal lesão glomerular associada com a infecção por esta bactéria. Embora não tenhamos encontrado nenhum caso de animal

infectado com manifestações clínicas devido a lesão renal, nossos dados demonstram a importância do achados histopatológicos renais associados com perda de proteína antes da ocorrência de doença clínica. Assim, as alterações glomerulares leves, parecem ser suficientes para provocar hipoalbuminemia, mesmo em casos de lesões focais. A patogênese da glomerulonefrite membranoproliferativa em cães muitas vezes é associada à deposição de imunocomplexos. No entanto, a nefrite intersticial associada com infiltrado inflamatório predominantemente linfocítico, como mostrado neste estudo, sugere que estas células podem também desempenhar um papel importante na imunopatogênese da lesão renal em cães com EMC. Portanto, mais estudos visando esclarecer a participação dessas células na patogênese da nefropatia associada com a infecção por *E. canis* são necessários para fornecer informações mais precisas para o diagnóstico, prognóstico e tratamento de cães com EMC.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa “*in memoriam*” pela orientação e disponibilidade na execução do estudo. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas do Capítulo I

1. AGARWAL SK., SETHI S., DINDA AK. Basics of kidney biopsy: a nephrologist's perspective. **Indian J. Nephrol.**,2013, 23, 243-252.
2. ALMOSNY NRP., MASSARD CL., SILVA GVO., XAVIER MS. Avaliação hematológica de cães infectados experimentalmente por *Ehrlichia canis*. **Rev. Bras. Cinc. Vet.**, 2000, 7, 111-112.
3. ALMOSNY NRP. ***Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935): Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados.** Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.
4. BARROS RTA, M. A. R., DANTE M. **Glomerulopatias: patogenia, clínica e tratamento**, 5 ed. Sarvier, 2006.
5. BORIN S., CRIVELENTI LZ., FERREIRA FA. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia spp.* naturalmente infectados. **Arq Bras Med Vet Zootec.**, 2009, 61, 566-571.
6. BULLA C., TAKAHIRA RK., ARAÚJO Jr. JP., TRINCA LA., LOPES RS., WIEDMEYER CE. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Vet. Res.**, 2004, 35, 141-146.
7. CIANCIOLO RE., MOHR FC. Urinary System. MAXIE MG. **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of domestic animals**. 6 ed., vol. 2, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2015: 376-464.
8. CIANCIOLO RE., MOHR FC., ARESU L., BROWN CA., JAMES C., JANSEN JH., SPANGLER WL., VAN DER LUGT JJ., KASS PH., BROVIDA C., COWGILL LD., HEIENE R., POLZIN DJ., SYMES H., VADEN SL., VAN DONGEN AM., LEES GE. World Small Animal Veterinary Association Renal Pathology Initiative: classification of glomerular diseases in dogs. **Vet. Pathol.**, 2016, 53, 113-135.
9. CODNER EC., CACECI T., SAUNDERS GK., SMITH CA., ROBERTSON JL., MARTIN RA., TROY GC. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **Am J Vet Res.**, 1992, 53, 12, 2286-2291.
10. CODNER EC., MASLIN WR. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **Am J Vet Res.**, 1992, 53, 3, 294-299.
11. COHN LA. Ehrlichiosis and related infections. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, 2003, 33, 4, 863-884.
12. COSTA FAL. **Patologia e imunopatogenia da nefropatia na Leishmaniose Visceral Canina.** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

13. COSTA FAL., GOTO H., SALDANHA LC., SILVA SM., SINHORINI IL., SILVA TC., GUERRA JL. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Vet Pathol.**, 2003, 40,6, 677-684.
14. DE CASTRO MB., MACHADO RZ., DE AQUINO LP., ALESSI AC., COSTA MT. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Vet Parasitol.**, 2004, 119, 1, 73-86.
15. FRANK JR., BREITSCHWERDT EB. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **J Vet Intern Med.**, 1999, 13, 3, :194-201.
16. GRAUER GF. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. **J Small Anim Pract.**, 2005, 46, 10, 469-478.
17. GRAUER GF. Proteinuria: measurement and interpretation. **Top Companion Anim Med.**, 2011, 26, 3, 121-127.
18. HARRUS S., DAY MJ., WANER T., BARK H. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Vet Microbiol.**, 2001, 83, 4, 343-349.
19. HASEWAGA MY. **Dinâmica da infecção experimental de cães por Ehrlichia canis: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular.** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
20. HILDEBRANDT PK., HUXSOLL DL., WALKER JS., NIMS RM., TAYLOR R., ANDREWS M. Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia). **Am J Vet Res.**, 1973, 34, 10, 1309-1320.
21. KAKOMA I., CARSON CA., RISTIC M., HUXSOLL DL., STEPHENSON EH., NYINDO MB. Autologous lymphocyte-mediated cytotoxicity against monocytes in canine ehrlichiosis. **Am J Vet Res.**, 1977, 38, 10, 1557-1559.
22. KANEKO JJ., HARVEY JW., BRUSS ML: **Clinical Biochemistry of Domestic Animals.** 5^a ed, 1997: 932.
23. KURTS C., PANZER U., ANDERS HJ., REES AJ. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. **Nat Rev Immunol.**, 2013, 13,10, 738-753.
24. JAIN NC. **Essentials of veterinary hematology**, Wiley-Blackwell, 1993.
25. LUCKSCHANDER N., KLEITER M., WILLMANN M. Renal amyloidosis caused by *Ehrlichia canis*. **Schweiz Arch Tierheilkd.**, 2003, 145,10, 482-485.
26. MAXIE MG., NEWMAN SJ. The urinary system. MAXIE MG. **Pathology of domestic animals.** 5 ed. vol. 2, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007: 425-522.
27. MEYER DJ., HARVEY JW: **Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis.** Edited by Sauders, 2^a ed, 2004: 351.

28. MYLONAKIS ME., KOUTINAS AF., BREITSCHWERDT EB., HEGARTY BC., BILLINIS CD., LEONTIDES LS., KONTOS VS. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. **J Am Anim Hosp Assoc.**, 2004, 40, 3, 174-184.
29. NAKAGHI ACH., MACHADO RZ., COSTA MT., ANDRÉ MR., BALDANI CD. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciênc. Rural**, 2008, 38, 766-770.
30. ORIÁ AP., DÓREA NETO FA., MACHADO RZ, E. SA., L. GJ., SILVA VLD., BEDFORD PGC, L.L L. Ophthalmic, hematologic and serologic findings in dogs with suspected *Ehrlichia canis* infections. **Rev Bras Ciênc Vet.**, 2008, 15, 94-97.
31. ORIÁ AP., PEREIRA PM., LAUS JL. Uveitis in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **Ciênc Rural**, 2004, 34, 1289-1295.
32. PEREZ M., BODOR M., ZHANG C., XIONG Q., RIKIHISA Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Ann N Y Acad Sci.**, 2006, 1078, 110-117.
33. REARDON MJ., PIERCE KR. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. **Vet Pathol.**, 1981, 18, 1, 48-61.
34. RENE-MARTELLET M., LEBERT I., CHENE J., MASSOT R., LEON M., LEAL A., BADAVELLI S., CHALVET-MONFRAY K., DUCROT C., ABRIAL D *et al.* Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. **Parasit Vectors**, 2015, 8, 3, 1-10.
35. RISTIC M., HOLLAND C: **Canine ehrlichiosis. In: Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals.** WOLDEHVIET Z., RISTIC M. Oxford, Pergamon Press; 1993, 169-186.
36. ROQUEPLO C., CHEMINEL V., BOURRY O., GOMEZ J., PREVOSTO JM., PARZY D., DAVOUST B. Canine ehrlichiosis in the Ivory Coast and Gabon: alteration of biochemical blood parameters based on *Ehrlichia canis* serology. **Clin Microbiol Infect.**, 2009, 15, 1 2, 41-42.
37. SERAKIDES, R. Sistema urinário. SANTOS, RL., ALESSI, AC. **Patologia Veterinária**, Roca (Ed.), São Paulo 2010: 291-336.
38. SILVA LS. **Erliquiose e anaplasmoze canina em Teresina, Piauí.** Universidade Federal do Piauí; 2010, 92.
39. SIMPSON CF. Relationship of *Ehrlichia canis*-infected mononuclear cells to blood vessels of lungs. **Infect Immun.**, 1974, 10, 3, 590-596.
40. SOUSA VRF., ALMEIDA ADBPFD., BARROS LA., SALES KG., JUSTINO CHDS., DALCIN L., BOMFIM TCBD. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. **Ciênc Rural** 2010, 40, 1309-1313.

41. THRALL MA: **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, Roca, São Paulo, 2007: 582.
42. TISHER CC., BRENNER BM. **Renal Pathology with clinical and functional correlations**. 2 ed, JB Lippincott, Philadelphia 1994.
43. TOLOSA CMC., RODRIGUES CJ., BEHMER AO., FREITAS NETO A. **Manual de Técnicas Para Histologia Normal e Patológica**. Manole, 2003, 341.
44. TROY GC., FORRESTER SD. **Canine ehrlichiosis. In: Infectious diseases of the dog and cat**. Saunders WB. GREENE, C. E. 404-418, 2006, 404-418.
45. TROY GC., FORRESTER SD. **Canine ehrlichiosis. In: Infectious diseases of the dog and cat**. GREENE CE. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990: 48-59.
46. WAKIMF., MARTORELLI CR., MOSKO PE., KOGIKA MM. Classificação em estágios da doença renal crônica em cães e gatos: abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. **Ciênc Rural**, 2010, 40, 2226-22
47. WANER T., HARRUS S., JONGEJAN F., BARK H., KEYSARY A., CORNELISSEN AW. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Vet Parasitol.**, 2001, 95, 1, 1-15.
48. WEN B., RIKIHISA Y., MOTT JM., GREENE R., KIM HY., ZHI N., COUTO GC., UNVER A., BARTSCH R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **J Clin Microbiol.**, 1997, 35, 7, 1852-1855.
49. WOODY BJ., HOSKINS JD. Ehrlichial diseases of dogs. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, 1991, 21, 1, 75-98.

5 CAPÍTULO II

Imunopatologia da nefropatia em cães naturalmente infectados com *Ehrlichia canis* e co-infectados com *E. canis* e *Leishmania (Leishmania) infantum****Nefropatia em cães co-infectados com erliquiose e leishmaniose canina***

Lucilene dos Santos Silva^{1*}, Flaviane Alves de Pinho², Maria das Graças Prianti³,
Georgia Brenda Barros Alves¹, Dayane Francisca Higino Miranda¹, Micherlene da
Silva Carneiro Lustosa¹, Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva¹

¹Setor de Patologia Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do
Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

²Laboratório de Sanidade Animal, Centro de Ciência Agrárias, Universidade Federal do
Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

³Instituto de Ensino Superior Múltiplo, Timon, Maranhão, Brasil

*Autor para correspondência: vetluc@hotmail.com (LSS)

Resumo: O padrão de lesão renal e a participação de células T e imunoglobulinas em rins foram investigados em 10 cães infectados com *L. (L.) infantum*, 12 cães infectados com *E. canis*, 15 cães co-infectados e seis cães saudáveis não infectados. Em tecido renal foi realizado exame histopatológico e imunoistoquímico para detecção de células T CD4, CD8 e imunoglobulinas IgG, IgM e IgA. No exame histopatológico o padrão de lesão glomerular do tipo membranoproliferativa predominou em todos os grupos de cães

infectados. Na contagem diferencial das células do infiltrado, houve predomínio de linfócitos e macrófagos nos cães com *E. canis* e *Leishmania*, respectivamente. Na análise imunoistoquímica, as células T CD4⁺ estavam em maior número nos glomérulos dos cães infectados quando comparados aos saudáveis. Enquanto, as células T CD8⁺ predominaram nos cães com *E. canis* e nos co-infectados. De modo interessante, os glomérulos dos cães com EMC tinham maior número de células T CD4⁺ comparados aos cães com LV. A deposição de IgG foi significativa somente nos cães com LV na região tubular e lúmen vascular quando comparados aos saudáveis. Em conclusão, a glomerulonefrite membranoproliferativa é a principal lesão renal em cães com EMC e as células T CD4⁺ parecem ter um papel na sua patogênese, semelhante aos cães com LV. O aumento de células T CD8⁺ parece contribuir para a injúria renal na EMC. O padrão de lesão renal observada nos animais co-infectados sugere que a infecção por *L. (L.) infantum* seja a principal responsável pelo comprometimento renal mais severo nos casos de co-infecção.

células T CD4⁺

Palavras-chave: *E. canis*, *L. (L.) infantum*, nefropatia, co-infecção.

Introdução

A *Ehrlichia canis* é uma bactéria gram-negativa, estritamente intracelular, agente etiológico da Erliquiose Monocítica Canina (EMC), transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* [1, 2]. No Brasil, a EMC é uma doença endêmica em várias regiões, sendo uma das enfermidades mais importantes em cães, podendo levar o animal a óbito [3].

A *Leishmania (Leishmania) infantum*, protozoário responsável pela Leishmaniose Visceral Canina (LVC) e humana, também é endêmica no Brasil [4]. O cão tem um papel fundamental na cadeia epidemiológica devido ao alto parasitismo cutâneo. Além disso, o

cão é bastante susceptível à infecção por *L. (L.) infantum* desenvolvendo a doença em sua forma plena, sendo um bom modelo para o estudo dos mecanismos imunopatológicos na progressão da doença [5].

A *E. canis*, assim como a *L. (L.) infantum*, são parasitos intracelulares obrigatórios de células do sistema fagocítico mononuclear [6, 7]. O hospedeiro pode desenvolver uma resposta imune específica celular ou humoral contra ambos os parasitos [8]. As manifestações clínicas nas duas enfermidades são semelhantes e decorrem da interação dos patógenos com células dos órgãos linfóides como linfonodo, baço, fígado e medula óssea [9, 10].

A patogênese da Leishmaniose Visceral (LV) e EMC em cães co-infectados em infecções naturais e/ou experimentais ainda não está esclarecida [11]. Em algumas abordagens focadas nas desordens hemostáticas foi observado que cães co-infectados com *E. canis* e *L. (L.) infantum* apresentam trombocitopenia mais severa e com episódios hemorrágicos mais frequentes do que naqueles animais mono-infectados, bem como uma resposta menos eficiente à terapia [12]. Um estudo mais recente avaliou alterações histopatológicas, hematológicas e laboratoriais entre esses agentes co-infectantes, no qual foi observada anemia acentuada, aumento do parasitismo cutâneo por *Leishmania* e altos níveis de proteínas plasmáticas totais, globulinas, fosfatase alcalina e creatina quinase, o que favoreceu o quadro mais severo observado nesses cães [8].

O comprometimento renal pode ocorrer na EMC e na LVC [13, 14]. No entanto, os mecanismos imunopatológicos da lesão renal são mais estudados em cães com LV, uma vez que essa alteração é relatada como umas das principais causas de morte dos cães infectados [14]. A deposição de imunocomplexos era considerada o principal mecanismo responsável pela glomerulonefrite na LVC [15], todavia, trabalhos de nosso grupo demonstraram que células T, citocinas e moléculas de adesão são mecanismos

relacionados à injúria renal, principalmente glomerulonefrites proliferativas na LVC [4]. Na EMC, sabe-se que a deposição de imunocomplexos nos rins podem desencadear uma glomerulonefrite e predispor o animal à proteinúria [16], sendo os principais achados histopatológicos na lesão renal caracterizados por glomerulonefrite intersticial crônica multifocal com presença de infiltrado mononuclear [10]; e infiltrado plasmocitário periglomerular e perivascular nos rins [17].

Neste contexto, considerando que tanto na LV quanto na EMC pode ocorrer lesões renais graves [14, 18], o presente trabalho visou classificar a lesão renal de modo a caracterizar a nefropatia nas duas enfermidades, bem como investigar mecanismos imunológicos envolvidos. Constatamos que na EMC, assim como na LV a patologia renal é caracterizada por lesões tanto glomerulares como tubulointersticiais, sendo que a glomerulonefrite membranoproliferativa é a principal lesão renal em ambas as enfermidades, destacando que a sua forma mais severa estava presente nos casos co-infectados, e que os possíveis mecanismos envolvidos na injúria renal ocorrem devido a participação de células T CD4⁺ e CD8⁺ e imunoglobulinas.

Material e métodos

Local e período de execução

O projeto foi desenvolvido no Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Laboratório de Patologia Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, no período de junho de 2014 a outubro de 2015.

Animais e diagnóstico da infecção por E. canis e/ou Leishmania spp.

Foram utilizados 43 cães adultos, machos e fêmeas, Sem Raça Definida (SRD), provenientes da Gerência de Zoonoses de Teresina (GEZOON). Os critérios para inclusão consistiam em testes sorológicos (DPP® e ELISA – Bio-Manguinhos), imunoistoquímico e parasitológico positivo para leishmaniose, teste molecular *nested*-PCR (nPCR) positivo para erliquiose e sorológico (Soro Aglutinação Microscópica - SAM) negativo para leptospirose. Para confirmação de LV, pesquisa direta do protozoário foi realizada em esfregaços de medula óssea esternal e/ou linfonodo poplíteo, bem como imunoistoquímica para detecção de antígenos de *Leishmania* em tecido renal. Para o diagnóstico de EMC foi realizada extração de DNA de sangue colhido com anticoagulante, com o uso do kit GeneJet Genomic DNA purification. A técnica de PCR foi realizada segundo Wen et al. (1997) [19].

Após a confirmação do diagnóstico e avaliação do quadro clínico, os cães foram distribuídos em quatro grupos: 12 cães naturalmente infectados com *E. canis*, 10 cães infectados com *L. (L.) infantum*; 15 cães naturalmente co-infectados com *L. (L.) infantum* e *E. canis*, e seis cães não infectados, sendo estes sem sinais clínicos e negativos para todos os exames diagnósticos.

Análise bioquímica.

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos sem anticoagulante para obtenção de soro. A análise bioquímica foi determinada por um sistema semi-automatizado (Thermoplate TP Analyzer), sendo que as dosagens séricas foram realizadas utilizando-se os kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil), conforme recomendações do fabricante para medições quantitativas de proteínas totais (Ref. 99-250), albumina (Ref. 19-1/250), uréia (Ref. 27), creatinina (Ref. 35-100) e alanina aminotransferase (ALT) (Ref. 53-200).

Procedimento anestésico e eutanásia

Sob anestesia profunda por via intravenosa com associação de acepromazina (2 mg/Kg) e tiopental sódico 25 mg/kg, foi realizada a eutanásia dos cães com a administração de solução de cloreto de potássio a 20% para coleta de fragmentos de rim para exame histopatológico e imunoistoquímico.

Análise histopatológica

Os fragmentos de rins foram mantidos em formol a 10% tamponado com fosfato 0,01M pH 7,2, e/ou em solução fixadora Duboscq-Brasil. Foram colhidos três fragmentos de tecido renal, os quais foram processados por técnicas histológicas de rotina e coradas com Hematoxilina-Eosina (H-E), para avaliação de alterações nucleares e citoplasmáticos; e com colorações especiais: Ácido Periódico de Schiff (PAS) para avaliação mais detalhada das alterações da membrana basal glomerular, capilares glomerulares, matriz mesangial e células epiteliais tubulares; Tricrômico de Massom (TM) para confirmação de fibrose; Ácido Periódico Prata Metanamine (PAMS) que cora a membrana basal em negro, útil para visualização de fibras reticulares do tecido conjuntivo e melhor caracterização de glomerulonefrite membranoproliferativa, além de Vermelho-Congo (VC) para visualização de amiloide. Para caracterização das alterações glomerulares foram avaliados no mínimo 80 glomérulos por amostra [20]. As lesões observadas no exame histopatológico foram avaliadas de forma semi-quantitativa, mensurando-se a intensidade da lesão em escala de 0 a 4 onde: 0 = normal, 1 = mínima ou duvidosa; 2 = média (leve); 3 = moderada; e 4 = severa. As alterações glomerulares foram classificadas de acordo com Maxie e Newman (2007) [21] que descrevem os tipos:

1. Glomerulonefrite proliferativa (mesangioproliferativa), na qual há predomínio de proliferação celular;
2. Membranosa, caracterizada por espessamento evidente da membrana basal;
3. Membranoproliferativa (mesangiocapilar), onde ocorre proliferação

celular e espessamento da membrana basal dos capilares glomerulares; e 4. Glomeruloesclerose, onde já ocorre espessamento da matriz mesangial com obliteração do lúmen vascular, resultando muitas vezes em hialinização progressiva que torna o glomérulo uma massa hipocelular. A localização da lesão glomerular foi caracterizada como segmentar ou global, conforme a lesão glomerular esteja atingindo o glomérulo parcial ou totalmente, e a distribuição das lesões em focal ou difusa [22]. A celularidade glomerular foi avaliada em 30 glomérulos por amostra, selecionados aleatoriamente em cortes corados com Hematoxilina-Eosina (H-E) [23]. A quantificação diferencial das células inflamatórias na região cortical do rim foi realizada em 10 campos aleatórios no analisador de imagem computadorizado Leica Qwin D-1000, versão 4.1 (Cambridge, UK). A exposição dos dados foi em células/500.000 μm^2 .

Imunoistoquímica

Cortes de tecido renal incluídos em parafina foram desparafinados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico e submetidos ao bloqueio de peroxidase endógena e, posteriormente, tratados com solução Tris-HCl, pH 1,0. Em seguida, os tecidos foram incubados *overnight* a 4°C em atmosfera úmida com os anticorpos primários: anticorpo policlonal de camundongo anti-*Leishmania amazonensis* [Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia-IMT-USP-SP] [24]; anticorpo policlonal de cabra anti-IgG canino (NB7338, Novus Biologicals); anticorpo policlonal de cabra anti-IgM canino (NB7318, Novus Biologicals); anticorpo policlonal de cabra anti-IgA canino (NB7308, Novus Biologicals); anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD4 canino (DH29H, VMRD) e anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD8 canino (CADO46A, VMRD). Após a incubação, seguiram-se as etapas de amplificação da reação utilizando os sistemas *Envision+Sistem-HRP Labelled polymer, anti-mouse*,

DAKO e/ou *LSAB+System-HRP Biotinylated link universal Streptavidin-HRP*, DAKO. As amostras foram incubadas em atmosfera úmida a 37°C intercaladas por lavagens em PBS e a revelação feita com 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical, EUA) em PBS com peróxido de hidrogênio e seguiu-se a contracoloração com hematoxilina de Harrys e montagens das lâminas. A análise da imunomarcação foi realizada de forma semi-quantitativa considerando-se a localização e intensidade em escala de 0 a 4 onde 0 = ausente, 1 = mínima ou duvidosa; 2= média (leve); 3 = moderada; e 4 = severa. A quantificação de células T CD4⁺ e CD8⁺ foi realizada em 30 glomérulos aleatórios no analisador de imagem computadorizado Leica Qwin D-1000, versão 4.1 (Cambridge, UK).

Considerações éticas

O protocolo de experimentação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal/Universidade Federal do Piauí sob o protocolo nº 070/12, seguindo normas reguladoras de procedimentos relativos à eutanásia em animais, estabelecidas pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária, Resolução nº 714, em 20 de junho de 2002.

Análise estatística

Os resultados quantitativos foram analisados por testes paramétricos ou não paramétricos de acordo com a natureza dos dados, utilizando programas estatísticos do GraphPad Prism 6 demo statistical software (Califórnia, Estados Unidos). Foram consideradas diferenças significantes quando $P < 0,05$.

Resultados e discussão

No curso da erliquiose e da leishmaniose visceral, os rins são frequentemente acometidos [10, 25]. No entanto, a patogênese da lesão renal nos casos de cães co-infectados, ainda não está esclarecida em infecções naturais e/ou experimentais. A compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia dessas doenças em casos de co-infecção permite explicar as variações na apresentação clínica, na patogenicidade e na resposta à terapêutica [8, 12]. Com base nisso, avaliamos as lesões histopatológicas nos rins de cães naturalmente infectados por *E. canis*, *L. (L.) infantum* e/ou cães co-infectados, a participação das células T CD4⁺ e T CD8⁺, bem como de imunoglobulinas no comprometimento renal.

Para exposição dos dados e comparação entre os grupos, os animais foram classificados de acordo com o tipo de infecção em: cães infectados por *E. canis* (EC); cães infectados por *L. (L.) infantum* (Leish); cães co-infectados por *E. canis* e *L. (L.) infantum* (Co-infect) e cães não infectados (Controle). Todos os animais infectados eram sintomáticos, sendo que as manifestações clínicas mais frequentes foram linfadenopatia em 86,49% % (32/37) e alterações cutâneas em 83,78% (31/37) dos casos. Não observamos correlação entre as manifestações clínicas e os grupos de cães infectados.

Lesão renal nos cães infectados por E. canis, L. (L.) infantum e co-infectados

Considerando que são escassos os estudos da lesão renal na EMC [16], e em cães co-infectados com *L. (L.) infantum*, focamos inicialmente na caracterização do padrão histopatológico da lesão renal nesses grupos associando-o com o perfil sérico de ureia e creatinina.

Dos animais avaliados, apenas um cão do grupo Leish e outro do Co-infect estavam com valores de ureia e creatinina aumentados acima do valor de referência

(Tabela 1). Sabe-se que azotemia renal é detectável quando há perda funcional de aproximadamente 75% dos néfrons [26], o que nos leva a pensar que nesses dois casos havia comprometimento renal extenso, uma vez que o exame histopatológico revelou também lesões severas nesses animais. Os demais casos, embora no tecido renal as lesões avaliadas tenham sido severas em alguns cães provavelmente não eram representativas para todo o órgão. Na EMC, há relatos de aumento nas concentrações séricas de ureia e creatinina sugestivo de azotemia pré-renal e/ou glomerulopatia nos casos crônicos [27]. Já na LVC a azotemia renal é um achado relativamente incomum, apesar da alta prevalência de patologia renal em cães infectados por *Leishmania* e a insuficiência renal ser uma das principais causas de morte do animal com LV [24, 25].

Tabela 1. Perfil bioquímico de cães naturalmente infectados por *E. canis*, *L. (L.) infantum*, co-infectados e controles não infectados

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS	EC N= 12	Leish N=10	Co-infect N=15	Controle N=06
Uréia (mg/dL)	29,70 (20,99-50,75)*	31,80 (25,91-66,90)	43,74 (34,00-66,00)	40,50 (34,73-48,00)
Creatinina (mg/dL)	1,00 (0,78-1,32)	1,29 (1,06-1,85)	1,07 (0,64-1,50)	1,15 (0,91-1,25)
ALT (U/L)	26,97 (13,50-39,03)	29,97 (19,43-44,51)	27,02 (19,22-33,65)	29,00 (23,25-41,24)
Proteína Total (g/dL)	8,19 (7,45-8,84)	6,40 (5,56-10,46)	7,94 (6,90-9,55)	7,15 (6,95-7,45)
Albumina (g/dL)	2,60 (1,95-3,24)	2,62 (2,25-3,05)	1,80 (1,28-2,14) ^{a,b,c}	3,10 (2,40-3,49)
Globulina (g/dL)	5,53 (4,73-6,26) ^a	3,67 (3,29-7,10)	6,32 (5,40-7,22) ^a	4,15 (3,57-4,67)

* Mediana (percentis 25 – 75).

^a P < 0,05 (testes de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação ao grupo Controle.

^b P < 0,05 (testes de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação ao grupo EC.

^c P < 0,05 (testes de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação ao grupo Leish.

A relação proteína/creatinina urinária é muito útil para estimativa da magnitude da proteinúria no cão e consequente detecção do risco de progressão da lesão renal [28]. Não foi possível realizarmos essas dosagens na urina, mas o exame histopatológico revelou cilindros hialinos em túbulos renais nos cães infectados, sendo esta alteração também indicativa de proteinúria [29]. Esses cilindros foram observados nos grupos EC

e Leish em 50% dos casos, e Co-infect em 53,33%, a intensidade variou de mínima a moderada nos cães dos grupos EC e Leish, e de mínima à severa nos cães co-infectados, nos quais foi observada diferença significativa em relação aos controles. Em condições patológicas, a proteinúria pode ser devido a danos nos glomérulos e nas células epiteliais tubulares, onde normalmente ocorreria reabsorção [29]. Tanto na EMC quanto na LVC estudos relatam que as perdas proteicas urinárias são causas de hipoalbuminemia [14, 16]. É provável que essa seja uma das causas da hipoalbuminemia observada nos cães com *E. canis*, *Leishmania* e co-infectados presente em 41,67%, 50% e 93,33%, respectivamente. Havendo diferença significante no grupo de co-infectados, que apresentou hipoalbuminemia mais expressiva comparado aos grupos EC, Leish e Controles.

Na análise histopatológica, as principais alterações observadas nos cães infectados foram glomerulonefrite, nefrite intersticial e fibrose (Tabela 2). Em menor intensidade, foram evidenciadas alterações tubulares caracterizadas por degeneração vacuolar, necrose, atrofia e dilatação dos túbulos, principalmente na região cortical. Nos cães co-infectados, a lesão tecidual era mais severa.

Tabela 2. Alterações histopatológicas em rins de cães naturalmente infectados por *E. canis*, *L. (L.) infantum*, co-infectados e controles não infectados

ALTERAÇÕES	EC	Leish	Co-infect	Controle
HISTOPATOLÓGICAS	N= 12	N=12	N=15	N=09
Glomerulonefrite	2,50 (2,00-3,00)	4,00 (3,00-4,00) ^{a,b}	4,00 (3,00-4,00) ^{a,b}	0,00 (0,0-0,0)
Nefrite intersticial	2,00 (1,00-3,75) ^a	2,00 (1,00-3,00) ^a	3,00 (2,00-4,00) ^a	1,00 (0,0-150)
Fibrose intersticial	0,00 (0,00-1,00)	1,50 (0,75-3,00) ^a	2,00 (0,00-3,00) ^a	0,00 (0,00-0,00)
Cilindros hialinos	0,00 (0,00-1,75)	0,50 (0,00-2,00)	1,00 (0,00-3,00) ^a	0,00 (0,00-0,50)

* Mediana (percentis 25 – 75).

^a P< 0,05 (testes de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação ao grupo Controle.

^b P< 0,05 (testes de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação ao grupo EC.

^c P< 0,05 (testes de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação ao grupo Leish.

A lesão renal mais frequente em nosso estudo foi a glomerulonefrite, predominando o tipo Glomerulonefrite Membranoproliferativa (GNMP) em 83,33% (10/12) no grupo EC, 70% (7/10) no grupo Leish e 73,33% (11/15) nos cães co-infectados (Fig. 1A-B e C). A GNMP é caracterizada por espessamento da membrana basal dos capilares glomerulares e da cápsula urinária, além de proliferação celular e lobulação mais evidente [30, 31] A Glomerulonefrite Proliferativa (GNP) (Fig. 1D) foi observada em 16,67% (02/12), 30% (03/10) e 20% (03/15) nos animais dos grupos EC, Leish e Co-infect, respectivamente. A sua principal característica é a proliferação de células mesangiais sem alterações da parede dos capilares glomerulares. Além disso, um cão co-infectado manifestou Glomerulonefrite Membranosa (GNM), esse caso foi o único em que a GN observada não foi o padrão proliferativo. E somente um cão do grupo Leish estava com glomeruloesclerose, caracterizada por esclerose glomerular, neste caso, na maioria dos glomérulos já se observava proliferação acentuada da matriz mesangial e hipocelularidade, havia ainda dilatação e atrofia tubulares, fibrose intersticial severa e nefrite intersticial mononuclear. Neste caso, observou-se alterações macroscópicas como redução do volume renal, superfície irregular e consistência firme.

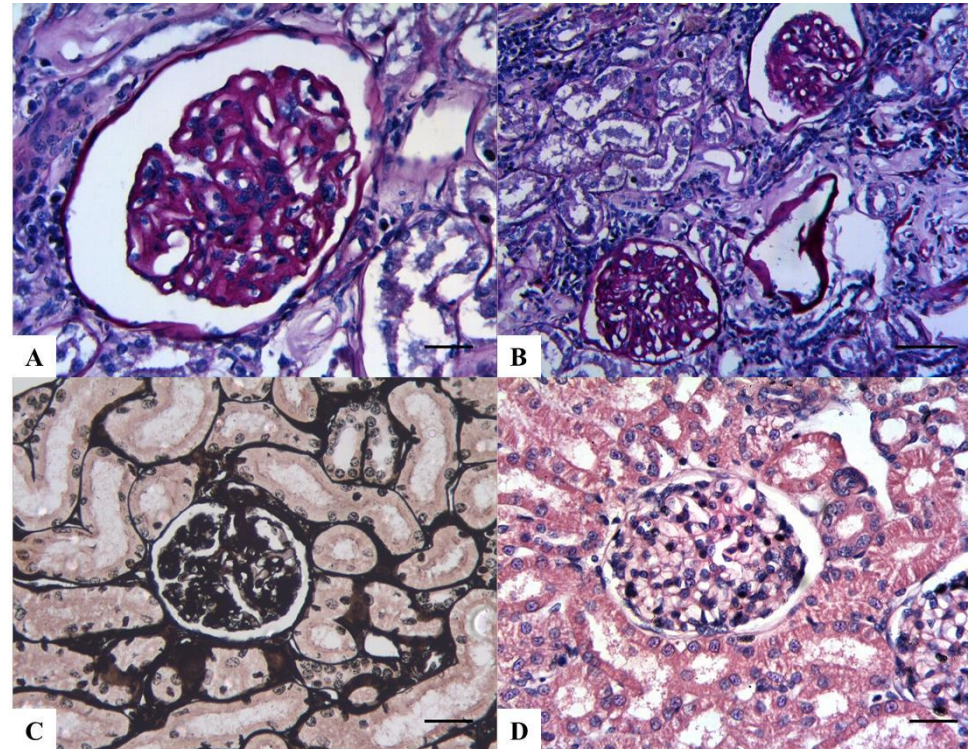


Figura 1. (A) Glomerulonefrite membranoproliferativa em cão naturalmente infectado com *E. canis* (PAS). Barra= 25 μ m. (B) Glomerulonefrite membranoproliferativa em cão naturalmente infectado com *L. (L.) infantum* (PAS). Barra= 50 μ m. (C) Glomerulonefrite membranoproliferativa em cão naturalmente co-infectado com *E. canis* e *L. (L.) infantum* (PAMS). Barra= 25 μ m. (D) Glomerulonefrite proliferativa em cão naturalmente infectado com *E. canis* (H-E). Barra= 25 μ m.

Embora a glomerulonefrite seja descrita em cães com erliquiose, são escassos os estudos sobre classificação e alterações histopatológicas renais nessa enfermidade [10, 16, 18]. Codner et al, (1992)[32] avaliando rins de cães na fase aguda da EMC observaram infiltrado perivenular e intersticial rico em linfócitos e plasmócitos principalmente no córtex renal e lesões glomerulares mínimas ou ausentes. Um caso isolado relatado por Luckschander et al., (2003) [33] sugere glomerulopatia associada a deposição de amiloide em um cão com EMC.

Em nosso estudo, a glomerulonefrite foi a principal lesão encontrada em cães infectados por *E. canis*, porém, com intensidade variando de média a moderada, sendo que em muitos casos havia infiltrado inflamatório perivascular similar ao grupo Leish e Co-infecção. Já nestes grupos, a intensidade da glomerulonefrite variou de moderada a severa, e diferiu significativamente em comparação aos cães controles e aos do grupo EC (Tabela 2). A celularidade glomerular foi avaliada por meio da contagem de células em 30 glomérulos de cada animal, sendo que o número de células foi mais elevado em todos os grupos de infectados (Fig. 2 e 3), diferindo significativamente do grupo controle. Nos cães co-infectados observou-se marcada hiperplasia em relação aos infectados por *E. canis* (Fig. 3).

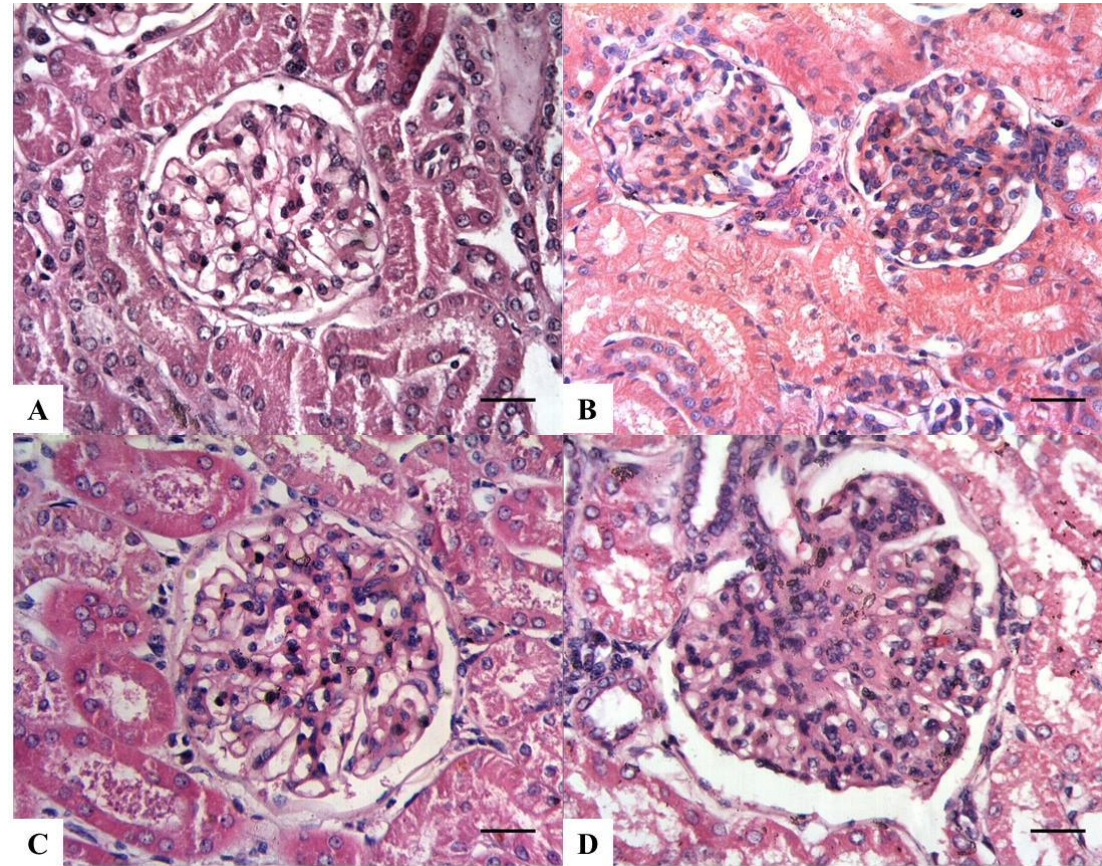


Figura 2. (A) Glomérulo normal. (B) Hipercelularidade glomerular em cão naturalmente infectado com *L. (L.) infantum*, (C) infectados com *E. canis* e (D) em cães co-infectados (H-E). Barra= 25 μ m.

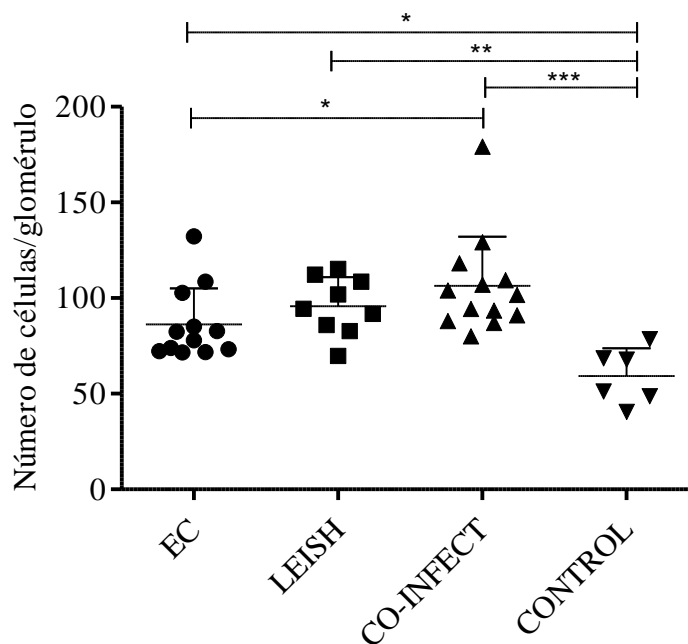


Figura 3. Proliferação celular em glomérulos de cães naturalmente infectados por *E. canis*, *L. (L.) infantum*, co-infectados e controles não infectados. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,00$. Testes de Kruskal-Wallis e Dunns.

Na EMC, a vasculite decorrente de uma inflamação imunomediada tem sido a principal causa de alterações patológicas em diversos órgãos [10, 34]. Na LVC, a lesão renal tem sido associada principalmente a glomerulonefrite membranoproliferativa e proliferativa mesangial [24]. Quanto a sua patogênese, durante muito tempo várias pesquisas afirmaram que as glomerulonefrites em cães com LV eram desencadeadas por imunocomplexos [35, 36]. No entanto, nas últimas décadas alguns grupos de pesquisa vêm demonstrando a participação da imunidade celular, particularmente, células T CD4⁺ no comprometimento renal [4, 37].

Em relação aos animais co-infectados, como a glomerulonefrite não diferiu entre os animais infectados por *Leishmania* (Tabela 2), mas estava mais severa em relação ao grupo EC, acreditamos que a co-infecção entre *E. canis* e *L. (L.) infantum* também

contribuiu para a severidade dessa alteração. Entretanto, a lesão renal na LVC parece ser mais grave do que nos outros grupos de cães infectados, corroborando com a afirmação de que glomerulopatia no cão é uma importante causa de falha renal e morte dos cães com LV [14, 38].

A nefrite intersticial foi evidenciada nos cães infectados sendo em maior intensidade na região cortical (Fig. 4A). No grupo EC, a lesão estava presente em 100% dos casos, foi caracterizada por infiltrado inflamatório mononuclear com predomínio de linfócitos, e em menor intensidade plasmócitos e histiócitos (Fig. 4B-C) em 75% dos cães (09/12), variando de intensidade mínima a severa. A localização era peritubular, perivascular e periglomerular, e em alguns casos subcapsular e a distribuição focal, multifocal e multifocal coalescente. Na EMC, um padrão um pouco diferente foi relatado na literatura que caracterizou uma glomerulonefrite intersticial crônica multifocal com presença de infiltrado mononuclear [10]. Outro estudo observou glomerulopatia de alterações mínimas e infiltrado perivascular linfoplasmocitário no córtex renal [32]. No grupo Leish, 90% dos cães apresentaram nefrite intersticial, o padrão de distribuição foi similar ao encontrado no grupo EC, mas o infiltrado inflamatório era predominante por histiócitos (Fig. 3D) e em menor quantidade linfocíticos em 55,55%, concordando com Gomes et al, (2008) [39] que também demonstraram infiltrado linfohistiocitário e com poucos plasmócitos. A intensidade variou de mínima a moderada. O mecanismo da nefrite intersticial na leishmaniose visceral é controverso, estudos sugerem que as alterações na membrana basal tubular e no interstício devido à deposição de imunocomplexos sejam as principais causas [35, 40]. Por outro lado, estudo conduzido por Gomes et al, 2008 [39] mostrou que 75% dos cães com LV apresentavam nefrite intersticial com presença de macrófagos e células T CD4⁺ e CD8⁺ sugerindo a participação dessas células no mecanismo de lesão na nefrite intersticial em cães naturalmente infectados.

Nos animais co-infectados, a nefrite intersticial foi evidenciada em 100% dos casos, e de forma mais severa, o infiltrado era predominantemente linfohistioplasmocitário, a intensidade variou de moderada à severa em 40% dos casos, onde a distribuição foi multifocal, multifocal coalescente ou difusa, o que sugere que a co-infecção com *E. canis* e *L. (L.) infantum* exacerba o comprometimento renal. Na literatura pesquisada não encontramos nenhuma abordagem que comparasse o grau da lesão renal com esses agentes co-infectantes. Foi observado em órgãos como pele e linfonodo de cães co-infectados que a intensidade do infiltrado inflamatório é variável, mas com predomínio de células mononucleares [8].

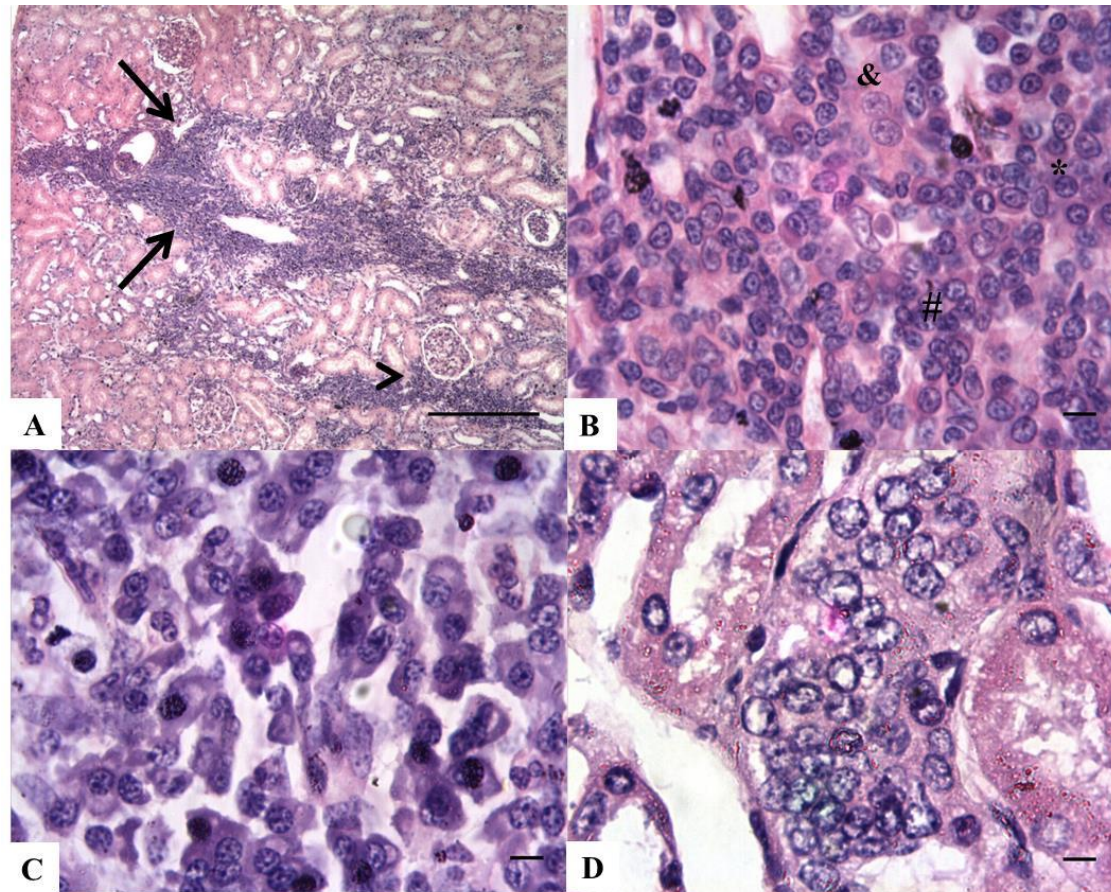


Figura 4. Rim de cão naturalmente infectado por *E. canis*: (A) infiltrado inflamatório intersticial (setas) e periglomerular (cabeça das setas); Barra= 100 μ m. (B) Infiltrado inflamatório na cortical caracterizado por predomínio de linfócitos (#) e em menor número plasmócitos (*) e histiócitos (&). (C) Infiltrado inflamatório na região cortico-medular com predomínio de plasmócitos. Rim de cão naturalmente infectado por *L. (L.) infantum*: (D) infiltrado inflamatório intersticial rico em histiócitos. Barra= 10 μ m.

A fibrose intersticial estava presente principalmente na região cortical nos três grupos de cães infectados, sendo mais discreta no grupo EC onde apenas 25% manifestaram essa alteração e com intensidade de mínima a média. No grupo Leish, a lesão foi observada em 80% e estando em intensidade média a severa em 50% destes. Já nos cães co-infectados foi observado fibrose em 73,33%, e desses 63,63% com intensidade média a moderada. Assim, a fibrose foi evidenciada em maior intensidade nos grupos Leish (Fig. 5) e co-infectados, ambos diferindo significativamente em relação ao grupo controle. Essa lesão não é frequentemente citada na EMC, particularmente nos rins [10, 16]. No entanto, a LV é classicamente descrita como uma doença sistêmica fibrótica [41], na qual as células inflamatórias e citocinas são responsáveis pelo processo fibrótico [42]. Acreditamos também que em nossos animais a participação das células inflamatórias e a produção de citocinas sejam o principal mecanismo da lesão fibrótica, uma vez que o infiltrado inflamatório estava presente em maior intensidade nos cães com fibrose moderada a severa nos grupos Leish e Co-infect.

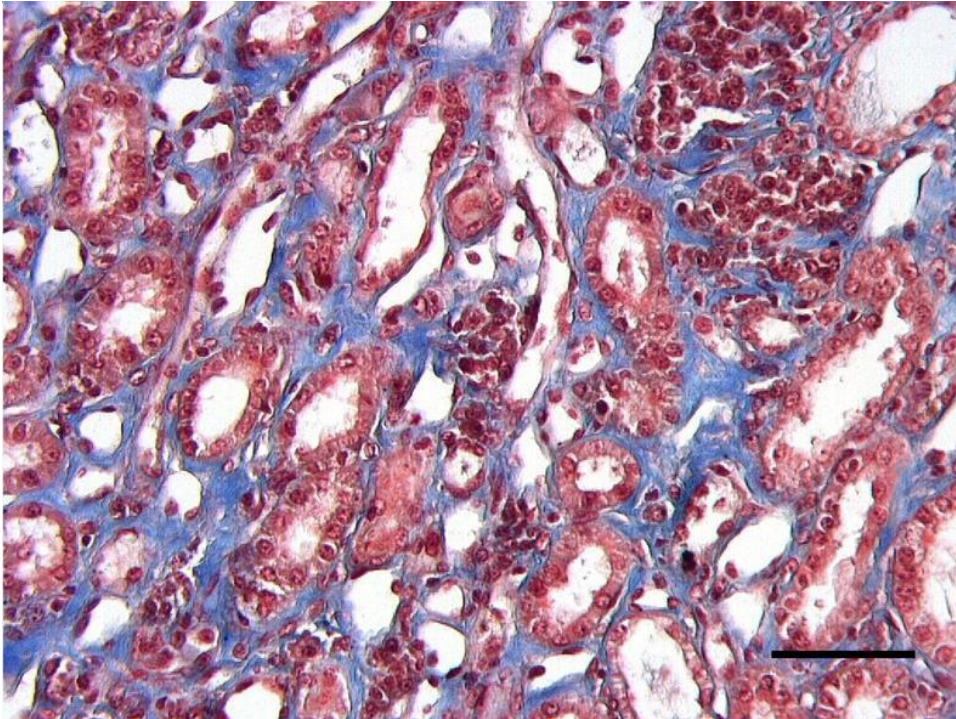


Figura 5. Fibrose intersticial (em azul) em rim de cão naturalmente infectado por *L. (L.) infantum*. Tricromio de Masson. Barra= 25 μ m.

Além de nefrite e fibrose intersticiais, outras alterações como cilindros hialinos em túbulos renais (Fig. 6), degeneração tubular vacuolar, dilatação ou atrofia tubular também foram eventualmente observadas em todos os grupos de animais infectados.

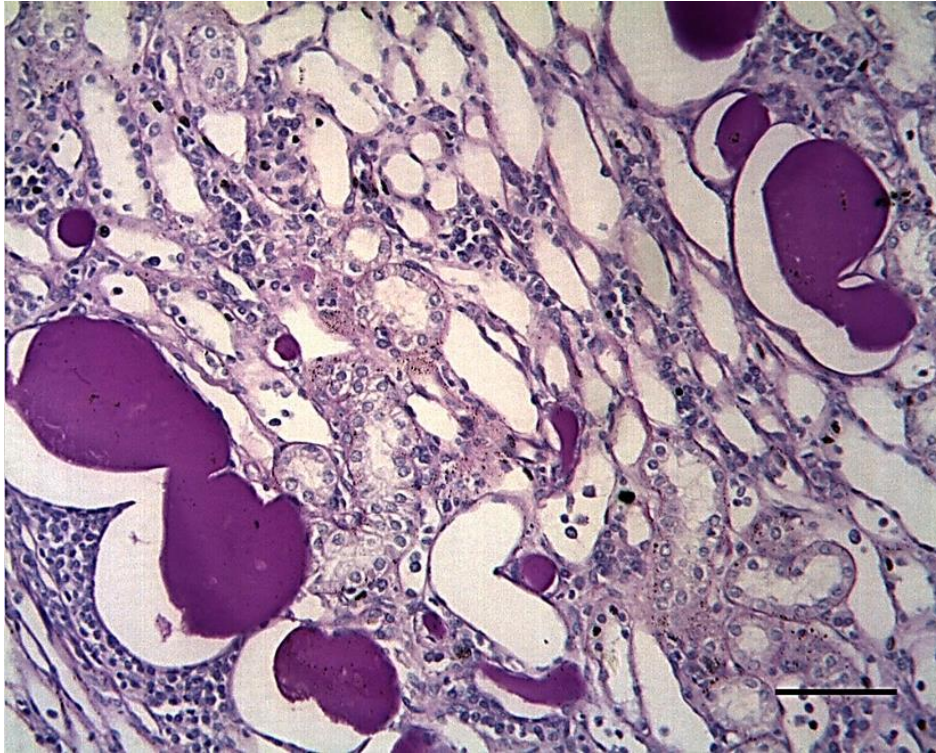


Figura 6. Cilindros hialinos em túbulos renais de cão naturalmente infectado com *E. canis* (PAS). Barra= 50 μ m.

Contagem diferencial das células inflamatórias em tecido renal

Estudos do tecido renal de cães com nefropatia apresentam alterações inflamatórias caracterizadas pela presença predominante de leucócitos da fase crônica, como linfócitos e plasmócitos no interstício renal mesmo em condições patológicas distintas [31]. Para melhor entendimento dos constituintes celulares do infiltrado inflamatório, realizamos contagem diferencial das células presentes no infiltrado da região cortical, em cortes de tecido renal coradas por H-E, pois neste compartimento a lesão era em intensidade mais severa do que nos demais.

Os nossos dados mostram um infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário. Os linfócitos estavam presentes em maior número no grupo EC, e quase em mesma intensidade no grupo Co-infect quando comparados ao grupo Leish (Fig. 7). A migração de células T para o infiltrado intersticial já é descrita nas lesões renais seja em casos

humanos e/ou experimentais [43, 44]. A participação das células inflamatórias, em particular as células T CD4⁺, parece assumir um papel importante na nefropatia uma vez que o influxo dessas células para a região glomerular e/ou intersticial acarreta na produção de elementos bioativos (p.e. citocinas e quimiocinas) que amplifica o processo inflamatório e lesão tecidual tanto pela ação direta de seus produtos quanto recrutamento de mais células inflamatórias para o local [45]. Na LVC, foi demonstrado em rins de cães naturalmente infectados que o comprometimento renal parece envolver as células T CD4⁺ e moléculas de adesão [4]. Seguindo essa hipótese e os dados do nosso estudo, acreditamos que esse mesmo mecanismo também esteja envolvido nos outros grupos de cães infectados.

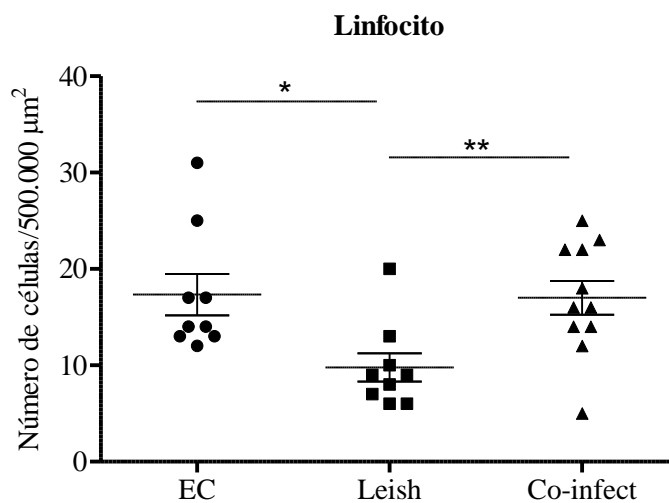


Figura 7. Contagem de linfócitos no infiltrado inflamatório presente na região cortical de rins de cães naturalmente infectados por *E. canis*, *L. (L.) infantum* e co-infectados. *P<0,05, teste Kruskal-Wallis e Dunns.

Os macrófagos tem papel multifuncional na inflamação, como a remodelação tecidual por indução de apoptose coordenada e inibição de mitose de células residentes

no tecido [46]. Encontramos número significativo de histiócitos no grupo Leish em comparação ao grupo EC e Co-infect (Fig. 8). Sabe-se que tanto na LVC e EMC, há uma hiperplasia macrofágica em diversos órgãos com lesão tecidual [9, 24, 39, 47, 48]. De acordo com nossos achados, a participação dessas células no comprometimento renal é mais pronunciada em cães infectados com LV. Em trabalho experimental com modelo murino infectado com *Leishmania* foi demonstrado um grande número de células expressando F4/80 nos glomérulos [49], esse marcador é específico para macrófago maduro de camundongo [50]. Esses achados sugerem que macrófagos poderiam estar envolvidos na geração de produtos como óxido nítrico, TNF e IL-1 nos rins [50-52], lembrando que o macrófago é a maior fonte de TNF [51]. TNF é uma citocina pró-inflamatória com capacidade de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas e de fatores tróficos que atuariam como indutores de lesão renal. Esses macrófagos poderiam ser oriundos da corrente sanguínea como foi demonstrado em glomerulonefrite experimental [53], e estariam participando na patogenia modulando a sinalização de citocinas como evidenciado por Warschkau e Kiderlen (1999) [54] na infecção por bactéria intracelular *Listeria monocytogenes*.

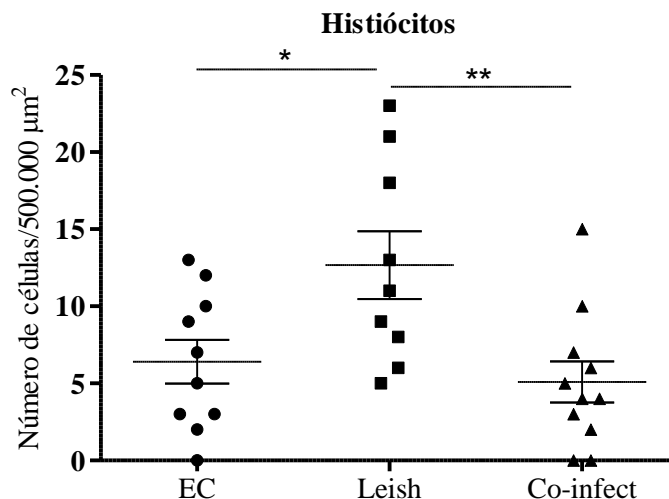


Figura 8. Contagem de histiócitos no infiltrado inflamatório presente na região cortical de rins de cães naturalmente infectados por *E. canis*, *L. (L.) infantum* e co-infectados. * $P < 0,05$, teste Kruskal-Wallis e Dunns.

A contagem de plasmócitos estava em menor número em relação aos linfócitos e histiócitos em todos os grupos, a exceção de um animal infectado com *E. canis* que teve no infiltrado inflamatório um predomínio acentuado de plasmócitos. Essas células raramente são observadas no infiltrado inflamatório em rins de cães com LV, diferente dos relatos naqueles infectados por *E. canis* sugerindo que na EMC, os plasmócitos tem um papel direto na patogênese da lesão renal. Em nossos resultados, mostramos que no grupo EC e Co-infect havia um maior número de plasmócitos no infiltrado quando comparados ao grupo Leish (Fig. 9). Ambas as doenças são caracterizadas por hiperglobulinemia acentuada [55, 56]. Na LV pode ocorrer mecanismo alternativo de lesão envolvendo IgG, como por exemplo internalização de IgG por células endoteliais de animais infectados [57]. A IgG pode participar da patogenia das lesões renais, numa fase inicial, e na fase mais crônica participaria células T [4, 49, 57]. Na EMC, acredita-se que a exposição prolongada a antígenos de *E. canis* leva a uma resposta humoral exacerbada e conseqüente dano tecidual [56].

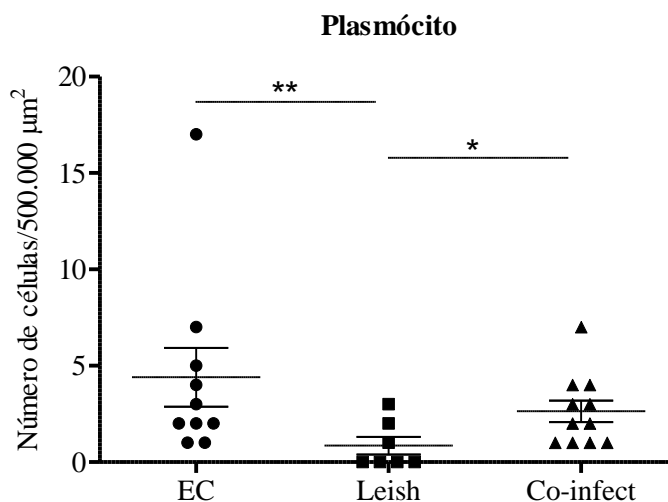


Figura 9. Contagem de plasmócitos no infiltrado inflamatório presente na região cortical de rins de cães naturalmente infectados por *E. canis*, *L. (L.) infantum* e co-infectados. * $P < 0,05$, teste Kruskal-Wallis e Dunns.

Imunomarcacão de células T CD4⁺ e CD8⁺ em tecido renal

Na lesão renal na EMC, a deposição de imunocomplexos é o principal mecanismo aceito na patogênese dessa alteração [16]. A EMC assim como a LV é caracterizada por um quadro clínico-patológico similar, inclusive com comprometimento renal. Seguindo esse raciocínio e considerando que na LVC foi constatada a participação de células T na alteração renal [4], fizemos uma análise semi-quantitativa por imunomarcacão de células T CD4⁺ e CD8⁺ no tecido renal em cães com *E. canis* e co-infectados com *L. (L.) infantum*, já que dentro do nosso conhecimento não encontramos nenhum dado na literatura que fornecesse essa informação.

Assim, em nossa análise vimos em tecido renal que no grupo EC havia um aumento significativo da imunomarcacão de células T CD4⁺ na região glomerular quando comparado ao grupo Leish e Controle, e um maior número de células T CD8⁺ em relação

ao grupo Controle (Fig.10). A participação dessas células na EMC foi demonstrada em alguns estudos, nos quais foi observada uma inversão na proporção CD4/CD8 devido ao aumento de células CD8 no sangue periférico e na região folicular e medular de linfonodos, sugerindo que a resposta imune mediada por células assume um papel importante na doença clínica [18, 58].

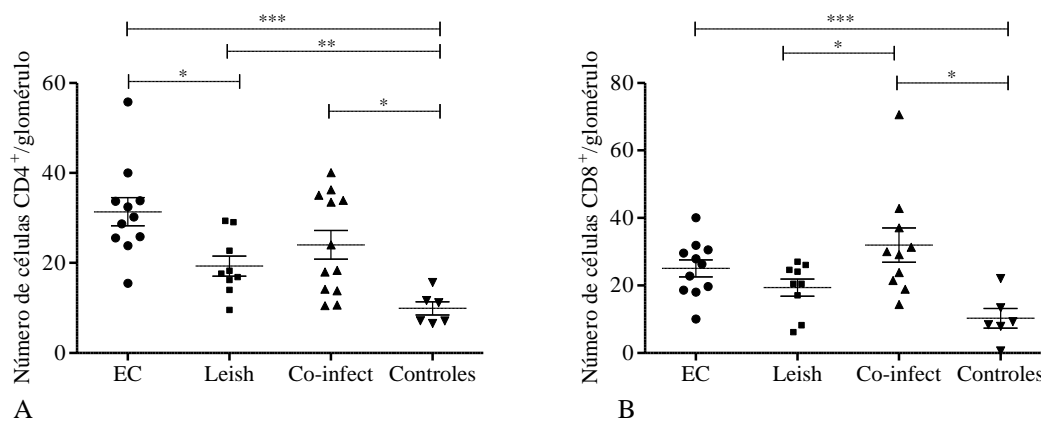


Figura 10. Imunomarcacão de células T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) em glomérulos de cães naturalmente infectados por *E. canis*, *L. (L.) infantum*, co-infectados e controles não infectados. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,00. Testes de Kruskal-Wallis e Dunns.

Nas glomerulopatias, as células T podem estar agindo por três mecanismos distintos: como células T auxiliares em resposta induzida por células T dependente de anticorpos  autoantígenos renais [59, 60]; dano glomerular devido ao infiltrado de leucócitos [59, 61]; e pela participao de célula T específica a antígenos glomerulares [62]. Dentro das nossas condioes não podemos inferir sobre o mecanismo exato responsável pela lesão glomerular na EMC, mas constatamos que as células T CD4⁺ e T CD8⁺ estavam presentes em maior número no glomérulo no grupo EC. Sabe-se que alteraoes irreversíveis no rim ocorrem principalmente quando a inflamao se expande do glomérulo para a região tubulointersticial [63, 64]. A contagem diferencial do

infiltrado inflamatório intersticial em que foi constatado um predomínio de linfócitos T corrobora com o observado pela imunomarcagem no infiltrado que era constituído principalmente por células T CD4⁺ e T CD8⁺, o que nos leva a acreditar que a inflamação mantida por essas células seja uma das causas da alteração renal. Há evidências de que o infiltrado mononuclear tubulointersticial pode levar a um processo imunopatológico contínuo com remodelamento tecidual que causa uma atrofia tubular e deposição de colágeno no interstício, ambos mantidos por um processo inflamatório local e recrutamento de fibrócitos [65].

Nos grupos Leish e Co-infectados o padrão de imunomarcagem de CD4⁺ e CD8⁺ não diferiram do grupo EC, sendo observado também na região glomerular e no infiltrado inflamatório intersticial (Fig. 11). No grupo Leish apenas células CD4⁺ estavam aumentadas significativamente em relação ao grupo Controle corroborando com os achados de Costa et al (2010) [4], reforçando assim a importância das células T CD4⁺ na lesão renal na LVC. Em contrapartida, nos grupos EC e Co-infect as células T CD8⁺ também parecem contribuir nas alterações nos rins na EMC, provavelmente, pelo mesmo mecanismo demonstrado por Walker e Dumler (2015) [66] em infecções erliquiais em que a produção exacerbada de TNF- α por células T CD8⁺ leva a apoptose e necrose nos hepatócitos.

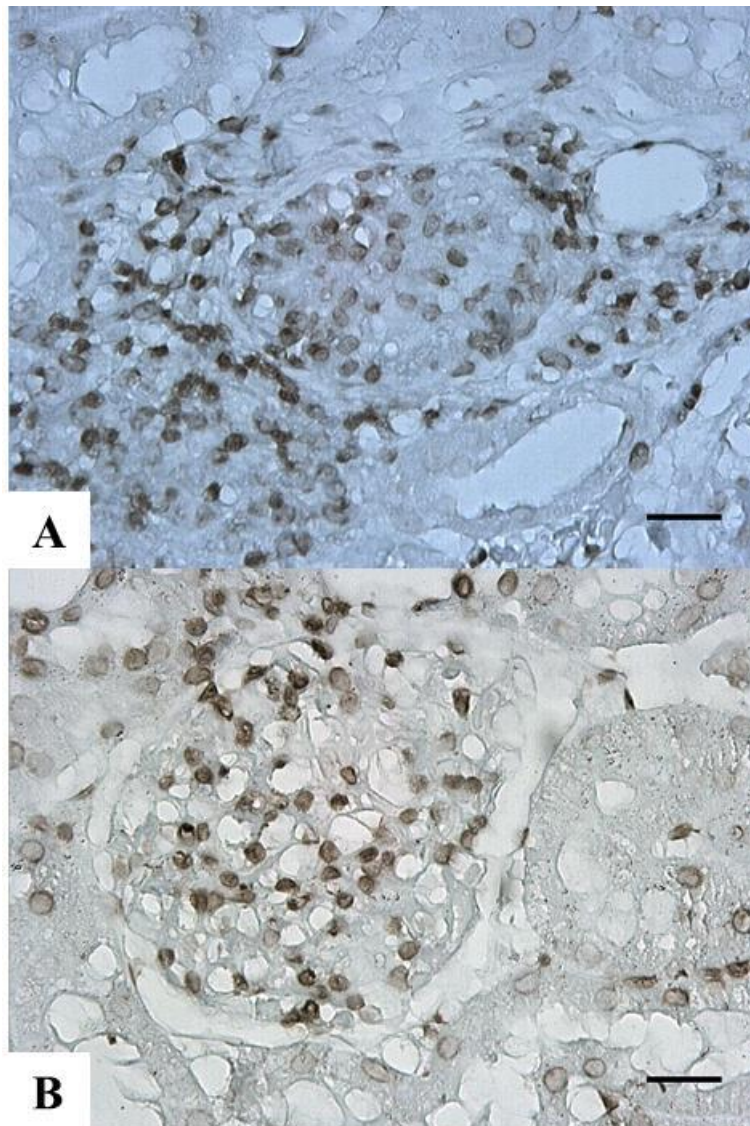


Figura 11. Cão com LV: (A) Imunomarcção de células T CD4⁺ no glomérulo e interstício. Cão co-infectado: Imunomarcção de células T CD8⁺ no glomérulo e interstício. Imunoperoxidase. Barra= 25 μ m.

A participação das células T CD4⁺ e CD8⁺ nas glomerulopatias proliferativas mesangiais tem sido largamente estudada [44, 67]. As células T CD4⁺ parecem ter um papel importante na fase inicial da lesão renal, e as células T CD8⁺ na progressão da doença, uma vez que foi demonstrado em diferentes tempos que a depleção dessas células em ratos reduz o quadro de proteinúria e previne a injúria renal. Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que a ativação de células T CD4⁺ acarreta na produção de citocinas Th1,

principalmente, IFN- γ e IL-12 que ativam macrófagos, citotoxicidade mediada por células T CD8⁺ e até mesmo células renais residentes levando ao dano tecidual. Células T CD8⁺ também podem produzir IFN- γ bem como quimiocinas que atraem mais células inflamatórias para o local amplificando assim a injúria renal [67]. Com base no exposto e nos dados obtidos nesse estudo, acreditamos que a participação das células T CD4⁺ é evidente em todos os grupos de cães infectados que desenvolveram uma glomerulonefrite membranoproliferativa na maioria dos casos, em maior intensidade nos animais com erliquiose e co-infectados. Em contrapartida, as células T CD8⁺ parecem ter um papel mais importante nos casos em que a infecção por *E. canis* estava presente.

Imunomarcção de Imunoglobulinas IgA, IgG e IgM em tecido renal

Sabe-se que a hiperglobulinemia é umas das principais alterações na EMC em consequência de uma resposta humoral acentuada [68, 69]. Esta contribui para uma extensa infiltração plasmocitária perivascular em diversos órgãos e consequente injúria tecidual [17, 70]. Em nossos achados laboratoriais e histopatológicos confirmamos o aumento acentuado de globulinas bem como o infiltrado intersticial e perivascular rico em células plasmocitárias, respectivamente, diferente dos cães com LV e co-infectados que apresentavam um infiltrado predominantemente por histiócitos e linfócitos.

Historicamente, o envolvimento do sistema imunológico nas glomerulopatias em humanos e/ou modelos animais foi demonstrado pela primeira vez em tecido renal com depósitos de anticorpos dentro do glomérulo [71]. Sabendo que os anticorpos são classicamente descritos como responsáveis pelo comprometimento renal, estendemos nossa análise por imunistoquímica na detecção de anticorpos IgM, IgG e IgA nos rins dos cães com *E. canis*, *L. (L.) infantum* e co-infectados.

Nossos resultados demonstraram em todos os grupos, ao avaliarmos as imunoglobulinas IgM, IgG e IgA, um padrão de imunomarcção granular nos glomérulos, túbulos, interstício e vasos da região cortical e na região medular, sendo a imunomarcção mais evidente nos capilares glomerulares e nos capilares e interstício da região medular. No grupo EC havia um predomínio significativo de IgG na região periglomerular quando comparados ao grupo Leish (Tabela 3). Em órgãos linfoides, o aumento de IgM e IgG em populações celulares contribui para as alterações morfológicas observadas no baço e linfonodo em cães com *E. canis* [10]. A IgG é uma imunoglobulina capaz de ativar o sistema complemento bem como as reações de hipersensibilidade do tipo III, a sua função biológica e a detecção aumentada dessa imunoglobulina na EMC fortalece a hipótese de que a vasculite seja mediada por anticorpos [10, 34].

Tabela 3. Imunomarcacão de imunoglobulinas IgA, IgM e IgG em tecido renal de cães naturalmente infectados por *E. canis*, *L. (L.) infantum*, co-infectados e controles não infectados

PARÂMETRO	<i>E. canis</i>	Leish	Co-infect	Controle
IgA	N= 12	N= 10	N= 15	N= 06
Cápsula de Bowman	1,00 (0,00-2,00)	1,50 (0,00-3,00)	1,00 (0,00-2,00)	0,50 (0,00-2,00)
Mesngio	1,00 (0,00-1,00)	1,50 (1,00-2,00)	1,00 (0,00-1,00)	1,50 (0,00-2,25)
Capilares glomerulares	2,00 (1,00-2,75)	3,00 (2,00-4,00) ^{b,d}	1,00 (0,00-2,00)	1,50 (0,00-4,00)
Periglomerular	0,00 (0,00-1,75)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-2,00)	0,00 (0,00-0,25)
Interstício	1,50 (1,00-2,00)	2,00 (1,00-2,50)	2,00 (1,00-2,00)	1,00 (1,00-1,50)
Parede tubular	1,00 (1,00-2,75)	2,00 (1,50-3,25) ^d	1,00 (0,00-2,00)	1,00 (1,00-2,00)
Luz tubular	0,00 (0,00-1,75)	2,00 (0,75-4,00) ^b	2,00 (1,00-3,00) ^b	1,00 (0,75-2,00)
Lúmen vascular	2,00 (1,00-2,75)	3,00 (2,00-4,00) ^{b,d}	2,00 (0,00-3,00)	2,50 (0,75-3,25)
Perivascular	1,50 (0,00-2,00)	0,50 (0,00-2,50)	1,00 (0,00-2,00)	1,50 (0,00-3,25)
Região medular	3,00 (2,00-3,00)	4,00 (2,75-4,00) ^{a,b,d}	2,00 (2,00-4,00)	3,00 (1,75-4,00)
IgM	N= 12	N= 10	N= 15	N= 06
Cápsula de Bowman	0,50 (0,00-2,00)	0,00 (0,00-2,00)	0,00 (0,00-2,00)	1,00 (0,00-2,50)
Mesngio	2,00 (1,00-2,00)	2,00 (1,00-2,00)	1,00 (1,00-2,00)	1,50 (1,00-2,25)
Capilares glomerulares	3,00 (3,00-3,00)	4,00 (3,00-4,00) ^{b,d}	3,00 (2,00-3,00)	4,00 (3,50-4,00) ^{b,d}
Periglomerular	1,00 (0,0-1,75)	0,00 (0,00-2,00)	1,00 (0,00-2,00)	0,00 (0,00-0,25)
Interstício	2,00 (2,00-2,00)	3,00 (1,75-4,00)	2,00 (2,00-3,00)	3,00 (1,75-3,25)
Parede tubular	0,50 (0,00-1,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-1,00)	0,00 (0,00-1,00)
Luz tubular	1,00 (0,00-2,00)	1,00 (0,00-2,25)	1,00 (0,00-2,00)	0,00 (0,00-1,25)
Lmen vascular	2,00 (2,00-2,75)	4,00 (3,00-4,00) ^{b,d}	3,00 (2,00-3,00)	3,00 (1,50-4,00)
Perivascular	1,00 (1,00-2,00)	2,00 (2,00-4,00) ^b	2,00 (2,00-3,00) ^b	2,00 (0,00-2,25)
Região medular	3,00 (2,25-3,00)	4,00 (3,00-4,00)	3,00 (2,00-4,00)	3,00 (2,75-4,00)
IgG	N= 09	N= 09	N= 15	N= 06
Cápsula de Bowman	2,00 (2,00-3,00)	3,00 (2,00-3,00)	3,00 (2,00-4,00)	3,50 (2,25-4,00) ^b
Mesngio	2,00 (1,00-2,50)	2,00 (1,00-2,00)	2,00 (1,00-2,00)	2,50 (1,00 -3,00)
Capilares glomerulares	2,00 (2,00-3,00)	3,00 (3,00-4,00) ^{b,d}	3,00 (2,00-3,00)	4,00 (2,75-4,00) ^{b,d}
Periglomerular	2,00 (1,00-2,00) ^c	0,00 (0,00-0,00)	1,00 (0,00-1,00)	0,00 (0,00-2,25)
Interstício	3,00 (2,00-3,00)	2,00 (1,50-3,50)	3,00 (2,00-3,00)	3,00 (2,75-3,25)
Parede tubular	1,00 (0,00-1,00)	2,00 (2,00-3,00) ^{a,b}	2,00 (1,75-3,00)	0,50 (0,00-1,00)
Luz tubular	2,00 (1,00-2,50)	2,00 (1,00-3,00)	2,00 (0,00-3,00)	0,50 (0,00-2,50)
Lúmen vascular	2,00 (2,00-3,50)	3,00 (3,00-4,00) ^{a,b,d}	2,00 (2,00-3,00)	2,00 (1,75-3,00)
Perivascular	2,00 (1,00-3,00)	3,00 (1,50-3,00)	3,00 (2,00-3,00)	2,50 (2,00-3,25)
Região medular	2,50 (2,00-3,00)	4,00 (3,00-4,00)	3,00 (3,00-4,00)	4,00 (3,00-4,00)

*Mediana (percentis 25 – 75).

^a P < 0,05 (testes de Kruskall-Wallis e Dunns), em relao ao grupo Controle.

^b P < 0,05 (testes de Kruskall-Wallis e Dunns), em relao ao grupo EC.

^c P < 0,05 (testes de Kruskall-Wallis e Dunns), em relao ao grupo Leish.

^d P < 0,05 (testes de Kruskall-Wallis e Dunns), em relao ao grupo Co-infect.

A maioria dos estudos sugere que a deposição de imunocomplexo seja o principal mecanismo responsável pela glomerulonefrite na EMC [13, 18]. No entanto, Codner et al. (1992)[32] avaliando cães experimentalmente infectados por *E. canis* na fase aguda, demonstraram lesões glomerulares mínimas ou ausentes acompanhadas por um aumento moderado a acentuado de IgG e IgM, e ausência de C3, descartando o papel do imunocomplexo na glomerulopatia. Não foi possível avaliarmos a participação de C3 na lesão renal nesse estudo, mas ao constatarmos o aumento das células T CD4 e CD8 e das imunoglobulinas nos rins dos cães com *E. canis*, particularmente IgG, acreditamos que a resposta imune celular e humoral são essenciais na patogênese da lesão renal nessa doença.

Considerando que na LV também ocorre uma hiperglobulinemia e que a participação das imunoglobulinas vem sendo extensivamente estudada nas glomerulopatias nessa doença, fizemos uma análise comparativa com o padrão de imunomarcção de IgA, IgG e IgM no tecido renal entre o grupo EC, grupo Leish e Co-infect. Para nossa surpresa, o grupo Leish apresentou uma intensidade na imunomarcção de IgA, IgG e IgM significativamente maior em relação ao grupo EC (Fig. 12) e ao Co-infect, particularmente, nos capilares glomerulares. Em menor grau, mas com diferença significativa observamos um predomínio de IgA na luz tubular, lúmen vascular e região medular no grupo Leish diferindo estatisticamente comparado ao EC e Co-infect. Igualmente, IgM estava presente no lúmen vascular e perivascular no grupo Leish, diferindo de EC e Co-infect. Quanto a IgG, a imunomarcção foi maior na parede tubular e lúmen vascular, no grupo Leish quando comparados aos grupos EC, Co-infect e Controles (Tabela 3). Um aspecto a se destacar é que no exame histopatológico a lesão glomerular em intensidade mais severa foi mais frequente nos cães com LV.

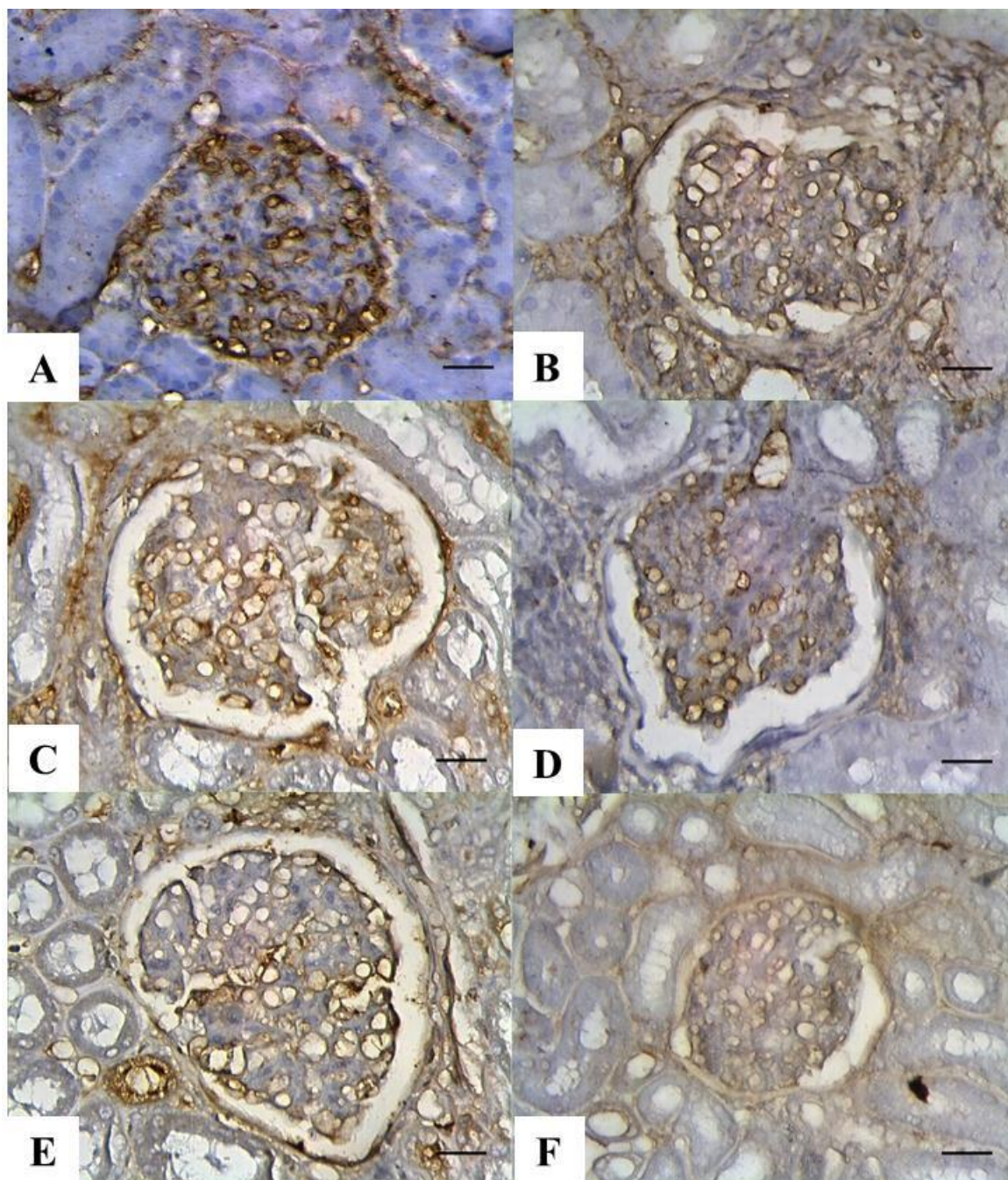


Figura 12. Imunomarcacão de imunoglobulinas em tecido renal. IgG, IgM e IgA em rim de cães do grupo Leish (A, C e E) e EC (B, D e F). Imunoperoxidase. Barra= 25 μ m.

Costa et al. (2003)[24] não conseguiram atribuir às imunoglobulinas um papel na lesão renal em cães com LV, uma vez que não observaram diferença estatística em comparao aos cães controles, diferente do nosso estudo que mostrou um maior depósito de IgG na região tubular e lúmen vascular. Considerando que a deposio de

imunoglobulinas pode causar injúria no glomérulo [72], era de se esperar um aumento da mesma em cães infectados em relação ao grupo Controle. No entanto, o glomérulo quando afetado tem sua permeabilidade alterada e conseqüente perda de macromoléculas, por exemplo, imunoglobulinas para o filtrado glomerular acarretando na expansão da injúria para o compartimento tubulointersticial [73]. Assim, não podemos descartar a hipótese da participação das imunoglobulinas na patogênese na glomerulonefrite na LV.

Nos animais co-infectados foi observado um aumento da deposição de IgA na luz tubular e IgM na região perivascular quando comparados ao grupo EC. De forma interessante, a intensidade da imunomarcção de IgA, IgG e IgM no grupo Leish também foi maior nos capilares glomerulares em comparação ao grupo Co-infect (Tabela 3). Sabe-se que os animais infectados com *E. canis* e *L. (L.) infantum* ao mesmo tempo, apresentam um quadro clínico-patológico mais severo, o que foi constatado no exame histopatológico em nosso estudo em relação ao grupo *E. canis*. Seguindo esse raciocínio, a nossa expectativa era detectar em intensidade mais severa a deposição de imunoglobulinas no grupo Co-infect, mas como as duas doenças causam uma desregulação na resposta imune celular e humoral é possível que o mecanismo envolvendo a participação de anticorpos na lesão renal também seja regulado [18, 55]. Outra possibilidade é que os animais do grupo Leish estivessem em um estágio mais avançado da infecção na qual sabidamente ocorre comprometimento renal.

Conclusões

Dentro de nosso conhecimento, esse foi o primeiro estudo envolvendo imunopatologia da nefropatia em cães co-infectados com *E. canis* e *L. (L.) infantum*. O padrão histopatológico da lesão renal em cães naturalmente infectados por *E. canis*, *L. (L.) infantum* e co-infectados não diferiram entre si, sendo a glomerulonefrite

membranoproliferativa a que mais se destacou. Com o aumento das células T CD4⁺ no glomérulo na EMC e LV, acreditamos que essas células são importantes na lesão renal. No entanto, um maior número de células T CD8⁺ foi observado nos grupos EC e Co-infect sugerindo a participação dessas células no comprometimento renal na presença da infecção por *E. canis*.

As imunoglobulinas também parecem contribuir para a injúria renal na EMC, uma vez que por imunomarcção foi demonstrado um aumento de IgG no grupo EC na região periglomerular, e no grupo Leish quando comparados ao grupo *E. canis* e Co-infect, particularmente, nos capilares glomerulares em que a deposição de anticorpos IgA, IgM e IgG estava aumentada. A deposição de IgG foi importante no grupo Leish na região tubular e lúmen vascular.

Em geral, mesmo em infecção natural podemos afirmar que o envolvimento renal é acentuado em infecções concomitantes por *E. canis* e *L. (L.) infantum*. No entanto, para melhores esclarecimentos sobre a patogenia da lesão faz-se necessário novos estudos de preferência em infecções experimentais, nas quais é possível acompanhar a progressão da doença e assim determinar marcadores que diferenciem claramente a patogênese nos cães co-infectados.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa “*in memoriam*” pela orientação e disponibilidade na execução do estudo. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas do Capítulo II

1. Dantas-Torres F. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit Vectors*. 2008;1(1):25. doi: 10.1186/1756-3305-1-25 PMID: 18691408
2. Rene-Martellet M, Lebert I, Chene J, Massot R, Leon M, Leal A, et al. Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. *Parasit Vectors*. 2015;8:3. doi: 10.1186/s13071-014-0613-4. PMID: 25561342
3. Breitschwerdt EB. Riquetsioses. In: Ettinger SJ, Feldman EC, editors. *Tratado de Medicina Interna Veterinária. Doenças do cão e do gato*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2004.
4. Costa FA, Prianti MG, Silva TC, Silva SM, Guerra JL, Goto H. T cells, adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis. *BMC Infect Dis*. 2010;10:112. doi: 10.1186/1471-2334-10-112. PubMed PMID: 20459816
5. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, Franca-Silva JC, et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*. 2006;81(1):68-75. doi: 10.1016/j.rvsc.2005.09.011. PMID: 16288789.
6. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51(Pt 6):2145-65. doi: 10.1099/00207713-51-6-2145. PMID: 11760958
7. Killick-Kendrick R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1990;65 Suppl 1:37-42. PMID: 2264679.
8. Andrade GB, Barreto WT, Santos LL, Ribeiro LR, Macedo GC, Sousa KC, et al. Pathology of dogs in Campo Grande, MS, Brazil naturally co-infected with *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2014;23(4):509-15. doi: 10.1590/s1984-29612014081. PMID: 25517530
9. Tafuri WL, de Oliveira MR, Melo MN. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol*. 2001;96(3):203-12. PMID: 11240094
10. de Castro MB, Machado RZ, de Aquino LP, Alessi AC, Costa MT. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet Parasitol*. 2004;119(1):73-86. doi: 10.1016/j.vetpar.2003.10.012. PMID: 15036578
11. Graham AL, Cattadori IM, Lloyd-Smith JO, Ferrari MJ, Bjornstad ON. Transmission consequences of coinfection: cytokines writ large? *Trends Parasitol*. 2007;23(6):284-91. doi: 10.1016/j.pt.2007.04.005. PMID: 17466597
12. Cortese L, Pelagalli A, Piantedosi D, Cestaro A, Di Loria A, Lombardi P, et al. Effects of therapy on haemostasis in dogs infected with *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, or both combined. *Vet Rec*. 2009;164(14):433-4. PMID: 19346544
13. Harrus S, Day MJ, Waner T, Bark H. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected

with *Ehrlichia canis*. Vet Microbiol. 2001;83(4):343-9. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00431-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00431-X).

14. NOLI C. Leishmaniosis canine. *Waltham Focus*. 1999;9:16-24.
15. Lopez R, Lucena R, Novales M, Ginel PJ, Martin E, Molleda JM. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1996;43(8):469-74. PMID: 8921735
16. Codner EC, Maslin WR. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *Am J Vet Res*. 1992;53(3):294-9. PMID: 1595954
17. Reardon MJ, Pierce KR. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. *Vet Pathol*. 1981;18(1):48-61. PMID: 7467072.
18. Frank JR, Breitschwerdt EB. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Intern Med*. 1999;13(3):194-201. PMID: 10357108.
19. Wen B, Rikihisa Y, Mott JM, Greene R, Kim HY, Zhi N, et al. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J Clin Microbiol*. 1997;35(7):1852-5. PMID: 9196207
20. Cianciolo RE, Mohr FC, Aresu L, Brown CA, James C, Jansen JH, et al. World Small Animal Veterinary Association Renal Pathology Initiative: Classification of Glomerular Diseases in Dogs. *Vet Pathol*. 2016;53(1):113-35. doi: 10.1177/0300985815579996. PMID: 25957358
21. Maxie MG, Newman S. The urinary system. In: Maxie M, editor. *Pathology of domestic animals*. 2. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2007. p. 425-522.
22. Maxie, M.G and Newman, S.J, Urinary System. In: Jubb, Kennedy & Palmer's, editors. *Pathology of domestic animals* . 6th ed. Philadelphia:Elsevir Saunders; 2015. pp. 376-464.
23. Tisher C, Brenner B. Renal Pathology with clinical and functional correlations. @, ed . Philadelphia JBL, editor. Philadelphia, J. B. Lippincott 1994.
24. Costa FA, Goto H, Saldanha LC, Silva SM, Sinhorini IL, Silva TC, et al. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet Pathol*. 2003;40(6):677-84. doi: 10.1354/vp.40-6-677. PMID: 14608021.
25. Rigo RS, Carvalho CM, Honer MR, Andrade GB, Silva IS, Rigo L, et al. Renal histopathological findings in dogs with visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013;55(2):113-6. PMID: 23563764
26. Waki MF, Martorelli CR, Mosko PE, Kogika MM. Classificação em estágios da doença renal crônica em cães e gatos: abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. *Ciência Rural*. 2010;40:2226-34.
27. Sousa VRF, Almeida AdBPFd, Barros LA, Sales KG, Justino CHdS, Dalcin L, et al. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. *Ciência Rural*. 2010;40:1309-13.
28. Barsanti JA, Lees GE, Willard MD, Green RA. Urinary disorders. In: Willard MD, Tvedten H, editors. *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. Philadelphia: W. B. Saunders; 2004. p. 135-64.
29. Grauer GF. Proteinuria: measurement and interpretation. *Top Companion Anim Med*. 2011;26(3):121-7. doi: 10.1053/j.tcam.2011.04.002. PMID: 21782142
30. Serakides, R. Sistema urinário. In: Santos RL, Alessi AC. *Patologia Veterinária*. São Paulo: Roca; 2010. p. 291-336.

31. ZACHARY JF, McGAVIN MD. Bases da Patologia em Veterinária: Elsevier; 2013. 1324 p.
32. Codner EC, Caceci T, Saunders GK, Smith CA, Robertson JL, Martin RA, et al. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *Am J Vet Res.* 1992;53(12):2286-91. PubMed PMID: 1476309
33. Luckschander N, Kleiter M, Willmann M. [Renal amyloidosis caused by *Ehrlichia canis*]. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2003;145(10):482-5. doi: 10.1024/0036-7281.145.10.482. PMID: 14593934
34. Simpson CF. Relationship of *Ehrlichia canis*-infected mononuclear cells to blood vessels of lungs. *Infect Immun.* 1974;10(3):590-6. PMID: 4372174
35. Poli A, Abramo F, Mancianti F, Nigro M, Pieri S, Bionda A. Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron.* 1991;57(4):444-52. PubMed PMID: 2046828
36. Mancianti F, Poli A, Bionda A. Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. *Parassitologia.* 1989;31(2-3):213-30. PMID: 2535031
37. Prianti MG, Yokoo M, Saldanha LC, Costa FA, Goto H. *Leishmania (Leishmania) chagasi*-infected mice as a model for the study of glomerular lesions in visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(6):819-23. PMID: 17581681
38. Mylonakis ME, Koutinas AF, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Billinis CD, Leontides LS, et al. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2004;40(3):174-84. doi: 10.5326/0400174. PMID: 15131097
39. Gomes LA Costa FAL, Goto H, Mineiro ALBB, Silva SMMS. Lesões renais intersticiais e tubulares na Leishmaniose Visceral. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.* 2008;103:567-8.
40. Dutra M, Martinelli R, de Carvalho EM, Rodrigues LE, Brito E, Rocha H. Renal involvement in visceral leishmaniasis. *Am J Kidney Dis.* 1985;6(1):22-7. PMID: 4025325
41. Silva LC, Castro RS, Figueiredo MM, Michalick MS, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. *Int J Exp Pathol.* 2013;94(2):133-43. doi: 10.1111/iep.12010. PMID: 23419132
42. Wick G, Backovic A, Rabensteiner E, Plank N, Schwentner C, Sgonc R. The immunology of fibrosis: innate and adaptive responses. *Trends Immunol.* 2010;31(3):110-9. doi: 10.1016/j.it.2009.12.001. PMID: 20106721
43. Liu L, Kou P, Zeng Q, Pei G, Li Y, Liang H, et al. CD4+ T Lymphocytes, especially Th2 cells, contribute to the progress of renal fibrosis. *Am J Nephrol.* 2012;36(4):386-96. doi: 10.1159/000343283. PMID: 23052013
44. Kurts C, Heymann F, Lukacs-Kornek V, Boor P, Floege J. Role of T cells and dendritic cells in glomerular immunopathology. *Semin Immunopathol.* 2007;29(4):317-35. doi: 10.1007/s00281-007-0096-x. PMID: 17955242
45. Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(10):738-53. doi: 10.1038/nri3523. PMID: 24037418
46. Duffield JS, Erwig LP, Wei X, Liew FY, Rees AJ, Savill JS. Activated macrophages direct apoptosis and suppress mitosis of mesangial cells. *J Immunol.* 2000;164(4):2110-9. PMID: 10657665
47. Hildebrandt PK, Huxsoll DL, Walker JS, Nims RM, Taylor R, Andrews M. Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia). *Am J Vet Res.* 1973;34(10):1309-20. PMID: 4542936

48. Kelly PJ. Canine ehrlichioses: an update. *J S Afr Vet Assoc.* 2000;71(2):77-86. PMID: 11030356
49. Prianti MG. Desenvolvimento e patogenia da glomerulonefrite na leishmaniose visceral em camundongos: Universidade de São Paulo; São Paulo. 2006.
50. Hume DA, Gordon S. Mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Identification of resident macrophages in renal medullary and cortical interstitium and the juxtaglomerular complex. *J Exp Med.* 1983;157(5):1704-9. PMID: 6854206
51. Tipping PG, Leong TW, Holdsworth SR. Tumor necrosis factor production by glomerular macrophages in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in rabbits. *Lab Invest.* 1991;65(3):272-9. PMID: 1890807
52. Matsumoto K, Dowling J, Atkins RC. Production of interleukin 1 in glomerular cell cultures from patients with rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Am J Nephrol.* 1988;8(6):463-70. PMID: 3265284
53. Schreiner GF, Cotran RS, Pardo V, Unanue ER. A mononuclear cell component in experimental immunological glomerulonephritis. *J Exp Med.* 1978;147(2):369-84. PMID: 146726
54. Warschkau H, Kiderlen AF. A monoclonal antibody directed against the murine macrophage surface molecule F4/80 modulates natural immune response to *Listeria monocytogenes*. *J Immunol.* 1999;163(6):3409-16. PMID: 10477612
55. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;128(1-3):87-95. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.10.307. PMID: 19054576
56. Harrus S, Waner T, Avidar Y, Bogin E, Peh H, Bark H. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Vet Parasitol.* 1996;66(3-4):241-9. PMID: 9017886
57. Mathias R, Costa FA, Goto H. Detection of immunoglobulin G in the lung and liver of hamsters with visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34(4):539-43. PMID: 11285467
58. Heeb HL, Wilkerson MJ, Chun R, Ganta RR. Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive *Ehrlichia* serology in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2003;39(4):379-84. doi: 10.5326/0390379. PMID: 12873028
59. Wu J, Hicks J, Borillo J, Glass WF, 2nd, Lou YH. CD4(+) T cells specific to a glomerular basement membrane antigen mediate glomerulonephritis. *J Clin Invest.* 2002;109(4):517-24. doi: 10.1172/jci13876. PMID: 11854324
60. Hopfer H, Holzer J, Hunemorder S, Paust HJ, Sachs M, Meyer-Schwesinger C, et al. Characterization of the renal CD4+ T-cell response in experimental autoimmune glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2012;82(1):60-71. doi: 10.1038/ki.2012.73. PMID: 22437418
61. Tipping PG, Huang XR, Qi M, Van GY, Tang WW. Crescentic glomerulonephritis in CD4- and CD8-deficient mice. Requirement for CD4 but not CD8 cells. *Am J Pathol.* 1998;152(6):1541-8. PMID: 9626058
62. Kalluri R, Danoff TM, Okada H, Neilson EG. Susceptibility to anti-glomerular basement membrane disease and Goodpasture syndrome is linked to MHC class II genes and the emergence of T cell-mediated immunity in mice. *J Clin Invest.* 1997;100(9):2263-75. doi: 10.1172/jci119764. PMID: 9410904
63. Bohle A, Kressel G, Muller CA, Muller GA. The pathogenesis of chronic renal failure. *Pathol Res Pract.* 1989;185(4):421-40. doi: 10.1016/s0344-0338(89)80058-5. PMID: 2690036

64. Markovic-Lipkovski J, Muller CA, Risler T, Bohle A, Muller GA. Association of glomerular and interstitial mononuclear leukocytes with different forms of glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 1990;5(1):10-7. PMID: 2109281
65. Niedermeier M, Reich B, Rodriguez Gomez M, Denzel A, Schmidbauer K, Gobel N, et al. CD4+ T cells control the differentiation of Gr1+ monocytes into fibrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(42):17892-7. doi: 10.1073/pnas.0906070106. PMID: 19815530
66. Walker DH, Dumler JS. The role of CD8 T lymphocytes in rickettsial infections. *Semin Immunopathol*. 2015;37(3):289-99. doi: 10.1007/s00281-015-0480-x. PMID: 25823954
67. Ikezumi Y, Kanno K, Karasawa T, Han GD, Ito Y, Koike H, et al. The role of lymphocytes in the experimental progressive glomerulonephritis. *Kidney Int*. 2004;66(3):1036-48. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00852.x. PMID: 15327397
68. Breitschwerdt EB, Woody BJ, Zerbe CA, De Buysscher EV, Barta O. Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis. *J Vet Intern Med*. 1987;1(1):2-9. PMID: 3506617
69. Rungsipipat A, Oda M, Kumpoosiri N, Wangnaitam S, Poosonthontham R, Komkaew W, et al. Clinicopathological study of experimentally induced canine monocytic ehrlichiosis. *Comp. Clin Pathol*. 2009; 18:13-22. doi 10.1007/s00580-008-0759-6
70. Troy GC, Forrester SD. Canine ehrlichiosis. In: Greene CE, editor. *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1990. p. 48-59.
71. Theofilopoulos A, Dixon F. Immune complexes in human diseases: a review. *Am J Pathol*. 1980; 2:529-94.
72. Moriyama T, Shimizu ARI, Takei T, Uchida K, Honda K, Nitta K. Characteristics of immunoglobulin A nephropathy with mesangial immunoglobulin G and immunoglobulin M deposition. *Nephrology*. 2010; 15(8):747-54. doi: 10.1111/j.1440-1797.2010.01296.x.
73. Matovinović M. Pathophysiology and classification of kidney diseases. *The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2009; 20:1-10.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

AGUIAR, D. M. et al. Prevalence of Ehrlichia canis (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **J Med Entomol**, v. 44, n. 1, p. 126-32, 2007.

ALEXANDRE-PIRES, G. et al. Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 137, n. 3-4, p. 275-83, 2010.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ALVES, G. B. et al. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with Leishmania (Leishmania) chagasi. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 3, p. 310-5, 2010.

ANDRADE, G. B. et al. Pathology of dogs in Campo Grande, MS, Brazil naturally co-infected with Leishmania infantum and Ehrlichia canis. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 23, n. 4, p. 509-15, 2014.

BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol**, v. 24, n. 7, p. 324-30, 2008.

BAPTISTA-FERNANDES, T. et al. Intra-specific variability of virulence in Leishmania infantum zymodeme MON-1 strains. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 30, n. 1, p. 41-53, 2007.

BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 28, n. 7, p. 329-37, 2006.

BONFANTI, U. et al. Free light-chain proteinuria and normal renal histopathology and function in 11 dogs exposed to Leishmania infantum, Ehrlichia canis, and Babesia canis. **J Vet Intern Med**, v. 18, n. 5, p. 618-24, 2004.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L. Z.; FERREIRA, F. A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de Ehrlichia spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 566-571, 2009.

BOURDOISEAU, G. et al. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 56, n. 3-4, p. 345-51, 1997.

BREITSCHWERDT, E. B. **Riquetsioses**. ETTINGER, S. J. e FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária. Doenças do cão e do gato**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 422-429 p. 2004.

CARDOSO, L. et al. Anti-Leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 117, n. 1-2, p. 35-41, 2007.

CARLOS, R. S. A. et al. Frequência de anticorpos anti-Ehrlichia canis, Borrelia burgdorferi e antígenos de Dirofilaria immitis em cães na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 117-120, 2007.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 67-70, 2009.

CIARAMELLA, P. et al. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet J**, v. 169, n. 3, p. 465-7, 2005.

CODNER, E. C. et al. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **Am. J. Vet. Res**, v.53, n.12, p.2286-91,1992.

CODNER, E. C.; MASLIN, W. R. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **Am J Vet Res**, v. 53, n. 3, p. 294-9, 1992.

CORTESE, L. et al. Effects of therapy on haemostasis in dogs infected with *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, or both combined. **Vet Rec**, v. 164, n. 14, p. 433-4, 2009.

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

COSTA, J. O. et al. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte – Brazil. **Arquivo da Escola de Veterinária, UFMG**, v. 25, p. 199-200, 1973.

COSTA, M. et al. Bioquímica sérica de cães infectados por *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Leishmania* sp. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, p. 1-7, 2015.

COUTO, C. G. **Doença riquetsiais**. BIRCHARD, S. J. e SHERDING, R. G. **Manual Saunders clínica de pequenos animais**. São Paulo: Editora Roca: 947-948 p. 2003.

DAGNONE, A.; MORAIS, H.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Semina Agrárias**, v. 22, p. 191-201, 2001.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasit Vectors**, v. 1, n. 1, p. 25, 2008.

DE CASTRO, M. B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Vet Parasitol**, v. 119, n. 1, p. 73-86, Jan 2004.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral Ceará. **O Hospital**, v. 47, p. 75-87, 1955.

DRUMOND, K. O.; COSTA, F. A. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 53, n. 1, p. 3-11, 2011.

DUMLER, J. S. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 51, n. Pt 6, p. 2145-65, 2001.

ELSHAFIE, A. I. et al. Cystatin C as a marker of immune complex-associated renal impairment in a Sudanese population with visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 75, n. 5, p. 864-8, 2006.

FARIA, A.; ANDRADE, H. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, p. 47-57, 2012.

FONSECA, L. S. **Erliquiose e anaplasmoses canina e humana em Teresina -PI, Brasil**. 2014. 59 p (Tese). Doutorado em Ciência Animal. Universidade Federal do Piauí. Teresina-PI.

FRANK, J. R.; BREITSCHWERDT, E. B. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **J Vet Intern Med**, v. 13, n. 3, p. 194-201, 1999.

FREITAS, J. C. C. D. et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by Leishmania chagasi. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 24-29, 2012.

GOMES, A. P. S.; CORDEIRO, R. L. R. Reação cruzada no diagnóstico sorológico de leishmaniose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 138, 2004.

GRAHAM, A. L. et al. Transmission consequences of coinfection: cytokines writ large? **Trends Parasitol**, v. 23, n. 6, p. 284-91, 2007.

GUARGA, J. L. et al. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. **Res Vet Sci**, v. 69, n. 3, p. 249-53, 2000.

HARRUS, S. et al. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with Ehrlichia canis. **Veterinary Microbiology**, v. 83, n. 4, p. 343-349, 2001.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): an overview. **Vet J**, v. 187, n. 3, p. 292-6, 2011.

HARRUS, S. et al. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 9, p. 2745-9, 1999.

HARRUS, S. et al. Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with Ehrlichia canis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, n. 3-4, p. 239-243, 2003.

HASEGAWA, W. **Dinâmica da infecção experimental de cães por Ehrlichia canis: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral celular**. 2005. 134 p (Tese). Doutorado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo-SP.

HEEB, H. L. et al. Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive Ehrlichia serology in a dog. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 39, n. 4, p. 379-84, 2003.

HILDEBRANDT, P. K. et al. Ultrastructure of Ehrlichia canis. **Infect Immun**, v. 7, n. 2, p. 265-71, 1973a.

HILDEBRANDT, P. K. Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia). **Am J Vet Res**, v. 34, n. 10, p. 1309-20, 1973b.

IKEDA-GARCIA, F. A. et al. Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Res Vet Sci**, v. 83, n. 1, p. 105-8, 2007.

KAKOMA, I. et al. Autologous lymphocyte-mediated cytotoxicity against monocytes in canine ehrlichiosis. **Am J Vet Res**, v. 38, n. 10, p. 1557-9, 1977.

KARRAS, A. et al. Renal involvement in monoclonal (type D) cryoglobulinemia: two cases associated with IgG3 kappa cryoglobulin. **Am J Kidney Dis**, v. 40, n. 5, p. 1091-6, 2002.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Ann Parasitol Hum Comp**, v. 65 Suppl 1, p. 37-42, 1990.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to Leishmania infantum/chagasi. **Vet Pathol**, v. 51, n. 2, p. 527-38, 2014.

KURTS, C. et al. Role of T cells and dendritic cells in glomerular immunopathology. **Semin Immunopathol**, v. 29, n. 4, p. 317-35, 2007.

KURTS, C. et al. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 10, p. 738-53, 2013.

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

LEWIS, G. E., JR.; HILL, S. L.; RISTIC, M. Effect of canine immune serum on the growth of *Ehrlichia canis* within nonimmune canine macrophages. **Am J Vet Res**, v. 39, n. 1, p. 71-6, 1978.

LOPEZ, R. et al. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 43, n. 8, p. 469-74, 1996. 0514-7166.

LUCKSCHANDER, N.; KLEITER, M.; WILLMANN, M. [Renal amyloidosis caused by *Ehrlichia canis*]. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 145, n. 10, p. 482-5, 2003.

MANCIANTI, F.; POLI, A.; BIONDA, A. Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. **Parassitologia**, v. 31, n. 2-3, p. 213-30, 1989.

MATHIAS, R.; COSTA, F. A.; GOTO, H. Detection of immunoglobulin G in the lung and liver of hamsters with visceral leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 4, p. 539-43, 2001.

MCGAVIN, M. D., ZACHARY, J. F.; **Bases da patologia em veterinária**. Elsevier, 2013. 1324 p.

MENDONÇA, C. et al. Erliquiose canina: alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Bioscience Journal**, v. 21, p. 167-174, 2005.

MENEZES-SOUZA, D. et al. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Vet Parasitol**, v. 177, n. 1-2, p. 39-49, 2011.

MIGUEL, P.; RODRIGUEZ PUYOL, D. R. Glomerulopatías. concepto, clasificación, etiopatogenia. **Medicine**, v. 80, p. 5125-5130, 2007.

MOREIRA, S. M. et al. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 141-147, 2003.

MORENO, J. et al. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 71, n. 3-4, p. 181-95, 1999.

MOURA, R. O. D.; PAULA, V. V.; SOARES, M. J. V. Alterações renais em cães (*Canis familiaris*) soropositivos para leishmaniose: aspectos clínicos, laboratoriais e histopatológicos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 4, p. 61-64, 2002.

MYLONAKIS, M. E. et al. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 40, n. 3, p. 174-84, 2004.

NAKAGHI, A. C. H. et al. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v. 38, p. 766-770, 2008.

NASR, S. H. et al. Proliferative glomerulonephritis with monoclonal IgG deposits. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, n. 9, p. 2055-64, 2009.

NICHOLSON, W. L. et al. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. **Trends Parasitol**, v. 26, n. 4, p. 205-12, 2010.

NIETO, C. G. et al. Pathological changes in kidneys of dogs with natural Leishmania infection. **Vet Parasitol**, v. 45, n. 1-2, p. 33-47, 1992.

NOLI, C. Leishmaniosis canine. **Waltham Focus**, v. 9, p. 16-24, 1999.

ORIÁ, A. P.; PEREIRA, P. M.; LAUS, J. L. Uveitis in dogs infected with Ehrlichia canis. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1289-1295, 2004.

PAHO/OMS. Leishmaniasis. 2013. website
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=21608&Itemid= Acesso em: 26/10/2015.

PAULAN, S. D. C. et al. Seroprevalence rates of antibodies against Leishmania infantum and other protozoan and rickettsial parasites in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 162-166, 2013.

PEDCHENKO, V. et al. Molecular architecture of the Goodpasture autoantigen in anti-GBM nephritis. **N Engl J Med**, v. 363, n. 4, p. 343-54, 2010.

POLI, A. et al. Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. **Nephron**, v. 57, n. 4, p. 444-52, 1991.

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

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915-34, 2009.

QUINNELL, R. J. et al. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 91, n. 3-4, p. 161-8, 2003.

REARDON, M. J.; PIERCE, K. R. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. **Vet Pathol**, v. 18, n. 1, p. 48-61, 1981.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res Vet Sci**, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006a.

REIS, A. B. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 112, n. 3-4, p. 102-16, 2006b.

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, 2009.

RENE-MARTELLET, M. et al. Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 3, 2015.

RIGO, R. S. et al. Renal histopathological findings in dogs with visceral leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 55, n. 2, p. 113-6, 2013.

RISTIC, M.; HOLLAND, C. **Canine ehrlichiosis**. WOLDEHVIET, Z. e RISTIC, M Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals. Oxford: Pergamon Press: 169-186 p. 1993.

RODRIGUEZ-CORTES, A. et al. Leishmania-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 116, n. 3-4, p. 190-8, 2007.

ROQUEPLO, C. et al. Canine ehrlichiosis in the Ivory Coast and Gabon: alteration of biochemical blood parameters based on Ehrlichia canis serology. **Clin Microbiol Infect**, v. 15 Suppl 2, p. 41-2, 2009.

ROSA, F. A. et al. Cardiac lesions in 30 dogs naturally infected with *Leishmania infantum chagasi*. **Vet Pathol**, v. 51, n. 3, p. 603-6, 2014.

SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia Veterinária**. In: SERAKIDES, R. Sistema urinário. ROCA (Ed.), 2010. 291-336p.

SILVA, L. S. **Erliquiose e anaplasmoze canina em Teresina, Piauí**. 2010. 92 p (Dissertação). Mestrado em Ciência Animal. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI. Teresina-PI.

SIMPSON, C. F. Relationship of Ehrlichia canis-infected mononuclear cells to blood vessels of lungs. **Infect Immun**, v. 10, n. 3, p. 590-6, 1974.

SOARES, M. J. V. et al. Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, p. 579-593, 2005.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural Leishmania infection. **Vet Parasitol**, v. 90, n. 1-2, p. 37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 2, p. 560-3, 2001.

SOUSA, V. R. F. et al. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1309-1313, 2010.

TAFURI, W. L.; DE OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 96, n. 3, p. 203-12, 2001.

TAJIMA, T.; RIKIHISA, Y. Cytokine responses in dogs infected with Ehrlichia canis Oklahoma strain. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1063, p. 429-32, 2005.

TANIKAWA, A. et al. Ehrlichia canis in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: serology, molecular detection and associated factors. **Res Vet Sci**, v. 94, n. 3, p. 474-7, 2013.

TIPPING, P. G. et al. Crescentic glomerulonephritis in CD4- and CD8-deficient mice. Requirement for CD4 but not CD8 cells. **Am J Pathol**, v. 152, n. 6, p. 1541-8, 1998.

TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. **Res Vet Sci**, v. 72, n. 1, p. 83-6, 2002.

TROTZ-WILLIAM, L. A.; TREES, A. J. Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. **Veterinary Record**, v. 152, n. 4, p. 97-105, 2003.

TROY, G. C.; FORRESTER, S. D. **Canine ehrlichiosis**. GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: W.B. Saunders: 48-59 p. 1990.

UNVER, A.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in dogs experimentally infected with a new virulent strain of Ehrlichia canis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1078, p. 482-6, 2006.

VAN VELTHUYSEN, M. L.; FLORQUIN, S. Glomerulopathy associated with parasitic infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 1, p. 55-66, 2000.

VIEIRA, T. S. W. J. et al. Serosurvey of tick-borne pathogens in dogs from urban and rural areas from Parana State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 104-109, 2013.

VILAS, V. J. et al. Visceral leishmaniasis: a One Health approach. **Vet Rec**, v. 175, n. 2, p. 42-4, 2014.

WANER, T. et al. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by Ehrlichia canis. **Vet Parasitol**, v. 95, n. 1, p. 1-15, 2001.

WATANABE, M. et al. Experimental inoculation of beagle dogs with Ehrlichia species detected from Ixodes ovatus. **Vet Parasitol**, v. 136, n. 2, p. 147-54, 2006.

WELLS, M. Y.; RIKIHISA, Y. Lack of lysosomal fusion with phagosomes containing Ehrlichia risticii in P388D1 cells: abrogation of inhibition with oxytetracycline. **Infect Immun**, v. 56, n. 12, p. 3209-15, 1988.

WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, p. 644-645, 2010.

WU, J. et al. CD4(+) T cells specific to a glomerular basement membrane antigen mediate glomerulonephritis. **J Clin Invest**, v. 109, n. 4, p. 517-24, 2002.

APÊNDICE

FICHA DE EXAME CLÍNICO

Identificação

Animal nº _____ Proprietário: _____
Sexo: Macho () Fêmea (); Cor: _____ Raça _____
Peso: _____ Kg; Idade: _____
Procedência: _____
Resultado LVC: Parasitológico _____ Sorológico: _____ IMH _____
Resultado EMC: PCR _____ Sorológico _____
Data : ____/____/____

Exame clínico

Sem alterações clínicas: Sim () Não ()
Anorexia/Hiporexia: Sim () Não ()
Linfadenopatia: Sim () Não ()
Esplenomegalia: Sim () Não ()
Perda de peso: Sim () Não ()
Claudicação(poliartrite): Sim () Não ()
Edema: Sim () Não () local: _____
Apatia: Sim () Não ()
Febre: Sim () Não ()
Onicogribose: Sim () Não ()
Mucosas pálidas: Sim () Não ()
Poliúria Sim () Não ()
Polidipsia: Sim () Não ()
Epistaxe: Sim () Não ()
Petéquias: Sim () Não () local: _____
Conjuntivite: Sim () Não ()
Alterações nervosas: _____
Alterações oftálmicas: _____
Alterações digestivas: _____
Alterações respiratórias: _____
Alterações urinárias: _____
Alterações reprodutivas: _____
Alterações dermatológicas:
-Alopecia: Sim () Não (), local: _____
-Lesões: Sim () Não (), local: _____
-Úlceras: Sim () Não (), local: _____
-Descamação furfurácea na pele (seborréia): Sim () Não ()
-Infestação por carrapatos: () Sim () Não; atual () anterior ()

ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO COM ANIMAIS
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 32155734 – e-mail: ceeapi@ufpi.br

Teresina, 02 de outubro de 2012.

Ao (A)

Prof (a): Dr. Francisco Assis Lima Costa
Departamento: CCA/DCCV

Sr. (a) Pesquisador (a),

Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado: **“Imunopatologia da nefropatia em cães com Leishmaniose Visceral e Erliquiose”**, foi avaliado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais – CEEA/UFPI teve parecer **APROVADO sob o nº. 070/12**. Esclarecemos que o mesmo se encontra de acordo com os requisitos exigidos para apreciação de projetos de pesquisa.

Atenciosamente,


Prof. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora



Original Full Paper

Renal histopathological changes in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*

Lucilene S. Silva^{1*}, Flaviane A. Pinho¹, Maria G. Prianti², Juliana F. V. Braga³, Lidiany V. Pires¹,
Sílvia A. França¹, Silvana M. M. S. Silva¹

¹Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, UFPI.

²Instituto de Ensino Superior Múltiplo, IESM.

³Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG.

* Corresponding author: Rua Antonio Marques, 1461, São Benedito, Timon-MA, Brazil. E-mail: vetluc@hotmail.com.

Submitted December 28th 2015, Accepted March 20th 2016

Abstract

Renal involvement in Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) has been demonstrated in chronic cases without histopathological classification of patterns of glomerulopathy. Thus, in this study we proposed to evaluate the histopathological pattern, focusing on the types of glomerulonephritis in kidneys of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. Twelve dogs naturally infected with *E. canis* and six healthy dogs were used. After clinical evaluation and diagnostic confirmation, the animals were euthanized and kidney fragments were obtained for histopathological examination, including hematoxylin and eosin (HE), Masson's trichrome, periodic acid-Schiff (PAS), periodic acid-methenamine silver (PAMS) and Congo red stain. Histopathological analysis of dogs with CME demonstrated that major lesions were present in the glomerulus and tubulointerstitial region in 100% of cases. The type of glomerular injury was membranoproliferative in 83.33%, and proliferative in 16.67%. Interstitial nephritis was present in the cortical region of all infected dogs. Minimal to marked lymphohistioplasmacytic inflammatory infiltrate was present in the interstitial, perivascular and periglomerular areas. Differential count of inflammatory cells indicated that lymphocytes predominated in comparison to plasma cells and histiocytes. Interstitial fibrosis and hyaline casts of lower intensity were observed. There was a negative correlation between serum albumin levels and severity of glomerulopathy. In conclusion, membranoproliferative glomerulopathy and interstitial nephritis are the major renal lesions in CME. It has been suggested that the presence of inflammatory infiltrates rich in lymphocytes indicates participation of these infiltrates in the immunopathogenesis of renal lesion in dogs with CME. Furthermore, hypoalbuminemia also seems to be a marker of renal damage in dogs infected with *E. canis*.

Key words: dog, *Ehrlichia canis*, kidney, histopathology.

Introduction

Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) is considered one of the main infectious diseases in dogs (34). It is a cosmopolitan disease with a higher prevalence in areas of tropical and subtropical climate (47). The causative agent of CME is *Ehrlichia canis*, an obligate intracellular bacillus that infects mononuclear cells and disseminates throughout various tissues of the host (11). It is a tick-borne disease and the vector responsible for transmission is the *Rhipicephalus sanguineus* (11).

Although primarily pathogenic to dogs, the pathogen also has a zoonotic potential (32).

The disease is characterized by three phases: acute, subclinical and chronic. Clinical manifestations are nonspecific: apathy, fever, vomiting, skin lesions, ocular and nasal secretion, splenomegaly, pale mucosa, lymphadenopathy, and hemorrhage. In severe cases, damage to the bone marrow may occur with pancytopenia, leading to death of the animal (5, 14, 28, 38). Laboratory abnormalities including anemia, thrombocytopenia, hypoalbuminemia, and hyperglobulinemia are commonly

associated with *E. canis* infection. Increased serum blood levels of urea, creatinine and phosphorous have also been cited (44).

Despite many existing research studies that contribute to the elucidation of mechanisms involved in the pathogenesis of CME, there are still few studies focused on renal disease in dogs with *E. canis* infection. It is known that in the acute phase, infected circulating mononuclear cells invade mainly the lungs, kidneys, and meninges, adhering to the vascular endothelium leading to vasculitis and subendothelial tissue infection (39).

Renal failure is not commonly associated with ehrlichiosis. However, studies have demonstrated that deposition of immune complexes in the kidneys may trigger glomerulonephritis and predispose the animal to proteinuria (15, 17). Renal failure was characterized in the experimental dog infection with *E. canis*. These animals developed transitory proteinuria, with loss of albumin, during two or three weeks following infection (10). In some cases, increased serum concentrations of urea and creatinine were also observed, suggestive of prerenal azotemia (3) and/or glomerulopathy in chronic cases (40).

Major histopathological findings are characterized by multifocal chronic glomerulonephritis (14) with lymphoplasmacytic infiltrate (9, 10). Furthermore, perivascular plasma cell infiltrate has also been reported in the corticomedullary junction, perivenular/periglomerular edema and focal necrosis followed by cellular infiltration (20, 33). It is believed that infection due to *E. canis* may lead to amyloidosis-associated kidney disease (25).

Renal damage is evident in chronic cases of dogs with CME. However, the morphological characterization of renal lesions, particularly glomerulopathy, has not been fully explored. Thus, we were the first to propose a detailed study of the histopathological pattern emphasizing the type of glomerular lesion in dogs naturally infected with *E. canis* from the endemic area of Teresina-PI. We showed that renal disease in CME is characterized by both glomerular and tubulointerstitial lesions. The predominant pattern of lesion was membranoproliferative glomerulonephritis.

Material and methods

Animal screening

Eighteen male and female mixed-breed adult dogs, of unknown age were selected from the Zoonosis Control Center in Teresina (State of Piauí, Brazil) for this study. Twelve infected dogs with *E. canis* and six healthy dogs were evaluated. Inclusion criteria for positive dogs were serological and *nested*-PCR (nPCR) molecular test positive for ehrlichiosis, and negative for leptospirosis (SAM) and visceral leishmaniasis (direct test, DPP, ELISA and immunohistochemistry). Noninfected control animals were stray dogs, which were captured for sacrifice due to rabies control. These animals were kept under the usual

housing conditions (i.e., housing, food, temperature regulation, and ventilation) at the Zoonosis Control Center in the city of Teresina, until euthanasia. Control dogs were asymptomatic and negative in all diagnostic tests performed.

After physical examination, 5 mL of peripheral canine blood obtained by venous cannulation were placed in EDTA anticoagulant tubes (BD Vacutainer) for hematological analysis and molecular diagnosis of *E. canis*. Another 10 mL of peripheral blood were drawn and placed in tubes without anticoagulant (BD Vacutainer) for serologic and biochemical analysis. The animals were sacrificed for the collection of kidney fragments destined for histopathological test, immunohistochemistry and DNA detection of *E. canis*.

Ethical considerations

Experimental protocol was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Universidade Federal do Piauí (protocol numbers 070/12, 026/14, and 076/14), in compliance with guidelines formulated for procedures related to animal euthanasia, established by the Federal Council of Veterinary Medicine, Resolution number 714, in June 20, 2002.

Diagnosis of CME

Serology - ELISA (Immunocomb-ELISA, Biogal, Israel) was used to detect *E. canis* IgG antibodies. The technique was performed according to the manufacturer's recommendations (Biogal Galed Laboratories Acs Ltd.).

In peripheral blood samples, DNA was obtained using the *Illustra blood genomic Prep Mini Spin Kit* (GE Healthcare Life Sciences, UK). For kidney tissue samples, the *Gene Jet Genomic DNA Purification* kit (Thermo Scientific, USA) was used, following the manufacturer's protocols.

Molecular detection of *E. canis* was performed by the nPCR technique, in which two pairs of initiator oligonucleotides were used according to Wen et al. (1997). Sequences of the first step of PCR reaction were "EC1 sense" AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC and "EC1 antisense" CGTATTACCGCGGCTGCTGGC reaction. Sequences of the second step were "EC2 sense" CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA and "EC2 antisense" TATAGGTACCGTCATTATCTTCCTAT. The reaction was prepared for a total volume of 25 µL containing 0.625 U of Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA) enzyme, 1.5 mM MgCl₂, 1x Taq buffer, 0.2 mM of dNTP (Invitrogen, USA), 400 nM of primers and 15.05 µL of sterile ultra-pure water. Amplification was performed in a thermocycler (Bioer Gene pro), at 94°C for five minutes, subsequently for 40 cycles: at 94°C for one minute, at 60°C for one minute and at 72°C for one minute and a final cycle of five minutes at 72°C. Reaction cycles were similar for both steps. The only difference were the initiator

oligonucleotide pairs “EC1 sense” and “EC1 antisense” for the first round of amplification, and “EC2 sense” and “EC2 antisense” for the second round (48).

The PCR product was approximately 390 base pairs (bp) long, which was visualized by ethidium bromide staining (0.5µg/mL) and 1.5% agarose gel electrophoresis on an UV transilluminator (BioAgency).

Diagnosis of leptospirosis and VL

Microscopic Agglutination serum technique (SAM) was performed in the Laboratory of Bacterial Diseases of the Reproductive System at the São Paulo Institute of Biology for detection of anti-*Leptospira* antibodies against 24 serovars.

Serologic tests used for VL diagnosis were: DPP (immunochromatography test with rK39 antigen), and immunoenzymatic test (*Enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA) using total *L. major-like* antigens, both produced by the Bio-Manguinhos Biotechnology Institute. For confirmation of VL, popliteal lymph nodes and/or sternal bone marrow aspiration were obtained for direct research of *Leishmania* spp. amastigotes.

Furthermore, immunohistochemical analysis was also performed in renal tissue to exclude samples positive for *Leishmania*. Renal tissue sections were processed and submitted to endogenous peroxidase block, subsequently treated with Tris-HCl, pH 1.0 solution. Tissues were then incubated with the following primary antibodies: polyclonal mouse antibody anti-*Leishmania amazonensis* [Laboratory of Seroepidemiology and Immunobiology-IMT-USP-SP] (13). After incubation, amplification stages of the reaction occurred using the *Envision+System-HRPLabelled polymer, anti-mouse*, DAKO. The reaction was developed with 3,3'-diaminobenzidine (Sigma Chemical, USA) in PBS with hydrogen peroxide. Counterstaining was performed with Harry's hematoxylin.

Laboratory tests.

Five mL of peripheral blood obtained by venipuncture were placed into a tube containing ethylene diamine tetraacetic acid – EDTA (BDVacutainer) for complete blood cell (CBC) count. Blood samples were analyzed in an automated blood counter (ABC Vet, ABX Diagnostics, Montpellier, France).

Serum dosage was determined by an automated system (Thermoplate TP Analyzer) using specific commercial kits (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil), according to the manufacturer's instructions for quantitative measurement of total serum protein (Ref. 99-250), albumin (Ref. 19-1/250), urea (Ref. 27), creatinine (Ref. 35-100) and alanine aminotransferase (ALT) (Ref. 53-200).

Anesthetic procedure and euthanasia

Under deep venous anesthesia associated with acepromazine (2 mg/Kg) and sodium tiopental

(25 mg/kg), the dogs were sacrificed with a 20% solution of potassium chloride. Kidney fragments were collected for histopathological exam. Fragments were maintained in 10% buffered formalin with phosphate 0.01M pH 7.2, and/or in Duboscq-Brazil fixative solution for one hour and then transferred to buffered formalin for 24 hours until processing.

Histopathological analysis

Renal tissue samples were processed by routine histological technique and stained with hematoxylin and eosin (HE). Eighty glomeruli for characterization of glomerular changes were evaluated (8). Three sections were prepared for the evaluation and classification of renal lesions. Histologic sections were also submitted to specific staining with Periodic acid-Schiff (PAS), since PAS delineates in great detail glomerular capillary basement membranes and tubular epithelial cells, the mesangial matrix and potential expansion(1); Masson's trichrome stain (MT) for the detection of collagen-based fibrous elements; periodic acid methenamine silver (PAMS), specific for basal membrane, was used for visualization of reticular fibers of the connective tissue; and Congo red stain for visualization of amyloid deposit (43). On histopathological exam, lesions were semi-quantitatively evaluated, measuring the intensity of glomerular and tubulointerstitial lesions on a scale of 0 to 4, where: 0 = normal, 1 = minimal; 2 = mild; 3 = moderate; 4 = marked (8). Glomerular diseases were classified according to Maxie and Newman (2007), as follows: 1) Membranous glomerulonephritis: basement membrane thickening predominates; 2) Proliferative (mesangioproliferative) glomerulonephritis: cellular proliferation predominates; 3) Membranoproliferative (mesangiocapillary) glomerulonephritis: both basement membrane thickening and cellular proliferation are present; and 4) Sclerotic glomerulonephritis: increased mesangial matrix combined with obliteration of capillary lumina. In this case, progressive hyalinization sometimes results in glomerular obsolescence and the glomerulus became a shrunken, eosinophilic, hypocellular mass. Glomerular location of the lesion was characterized as segmental or global. Lesion distribution was categorized as focal or diffuse (7). Glomerular cellularity and glomerular size were assessed in 30 randomly selected glomeruli on HE-stained paraffin sections (12, 42). Differential quantification of inflammatory cells in the renal cortical region was manually performed in 10 random fields in the Leica Qwin D-1000 computerized image analyzer, version 4.1 (Cambridge, UK). Data was exposed in cells/500.000 µm².

Quantitative results were analyzed by parametric or nonparametric tests using the GraphPad Prism 6 demo statistical software (GraphPad Software Inc., USA). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results and discussion

In kidney disease of dogs with CME, pathological aspects have still not been fully elucidated (9, 10, 14, 33.) despite evidence in some studies that *E. canis* infection may cause renal lesion (16, 17, 20). Given that CME is endemic in our region and knowledge of profile of renal lesion can contribute to therapeutics, we proposed to characterize renal histopathological patterns correlated with clinical and laboratory aspects in 12 dogs naturally infected with *E. canis*. It is worth mentioning that all dogs with CME tested negative for visceral leishmaniasis and leptospirosis.

Clinical and laboratory evaluation

Clinical evaluation of 12 dogs with CME was nonspecific. Lymphadenopathy and skin lesions were the main findings, both observed in 83.33% of dogs. These signs are commonly described in different stages of canine ehrlichiosis (5, 30, 38). All twelve dogs suspected of having *E. canis* infection tested positive on serological and molecular tests.

The hematological profile of 12 dogs with CME primarily showed anemia and thrombocytopenia. Normocytic normochromic anemia and a decrease in platelets was present in 80% and 41.67% of cases, respectively. Leukopenia and leukocytosis were also observed in 25% and 33.33% of cases. In CME, hematological alterations are frequently reported and a multifactorial mechanism has been implicated (2, 6, 14, 29).

In CME, an increase in serum creatinine and urea levels has been reported (45). Based on these data, we also evaluated blood serum urea and creatinine in dogs infected with CME. Circulating levels of urea and creatinine were unaltered in these dogs (Table 1). Prerenal azotemia may occur in acute cases of ehrlichiosis due to severe dehydration (3) and renal azotemia may appear in chronic cases with severe glomerulonephritis (40). Nevertheless, the lack and/or low rate of increasing levels of these analytes into the circulation do not exclude renal lesion, since renal azotemia is detected when more than 75% of glomeruli are affected (46). In addition, the study dogs had been naturally infected. Therefore, the exact phase of infection and consequent level of kidney damage in these animals was unknown.

Hyperglobulinemia and hypoalbuminemia were also observed in our dogs, occurring in 91.67% and 41.67% of dogs, respectively (Table 1). These alterations are classically described in CME. Hyperglobulinemia in CME is caused mainly by polyclonal gammopathy. An increase in gamma globulin concentration occurs, reaching its peak in the febrile stage and persisting in the subclinical and chronic phases (35). Hypoalbuminemia in ehrlichiosis seems to result from increased vascular permeability,

hemorrhage, and hepatic (49) and/or glomerular and tubular damage (9, 10).

Renal histopathology in dogs with CME and correlation with clinical and laboratory findings

It is well known that *E. canis* infection may affect different organs, including the kidneys (14, 33). However, there are few studies evaluating the renal histopathological pattern in dogs with CME, particularly characterizing glomerular diseases (9, 10, 14).

In our study, 12 dogs with CME showed glomerular and tubulointerstitial changes in 100% of the cases, exhibiting minimal to moderate lesions. The importance of microscopic examination became clear, since gross changes are minimal in some cases of the disease, as observed in the majority of animals in this study. Only one case with moderate histopathological alterations showed kidneys with a focal pale red and irregular surface that was firm due to fibrosis. Interestingly, we detected *E. canis* DNA in renal tissue of two dogs with more marked glomerular lesion and interstitial nephritis, suggesting that the presence and/or persistence of bacteria may contribute to pathological alterations in this organ (Table 2). It is noteworthy that these samples were negative for *Leishmania* detection on immunohistochemical analysis. In VL, renal lesions are classically described and associated with different types of glomerulopathies with varying degrees of severity (13).

In the chronic phase, the magnitude of clinical pathological alterations is variable and depends on host immune response and strain inoculated. A study carried out by Hasewaga (2005) in dogs experimentally infected with *E. canis* assessed disease progression for 70 days. The clinical and laboratory picture of these animals showed improvement after the 20th day of infection. However, persistent infection was confirmed by PCR positivity and splenomegaly until the 10th week after *E. canis* inoculation. In this study, no clinical signs suggestive of renal damage were cited during the acute and/or chronic phase. In our dogs, clinical signs suggestive of renal lesion, e.g. mucosal ulcerations, polydipsia and/or polyuria, as well as uremic breath were not observed. Clinical manifestations were nonspecific and unrelated to renal damage evidenced in these animals. It is noteworthy that renal tissue lesions observed in the study dogs, even in those with moderate lesions, was not necessarily representative of the entire organ and clinical signs may not develop. The clinical phase of natural *E. canis* dog infection is extremely difficult to determine. A variety of nonspecific clinical signs appear as a result of infection, which makes diagnosis difficult (31).

Table 1. Hematological and biochemical profile* of 12 dogs naturally infected with *E. canis*.

Dogs	RBC (x 10 ⁶ /mm ³)	HGB (g/dL)	HT (%)	MCV (fL)	MCHC (%)	Leuk (x 10 ³ /mm ³)	Platelets (x 10 ³ /mm ³)	Urea (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Total Protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	Globulin (g/dL)	ALT# UI/L
1	5.11	11.9	36.5	73	31.8	5.7	124	33.00	1.50	8.03	2.94	5.09	25.80
2	5.38	13.1	35.0	65	36.0	8.3	25	59.00	1.54	8.33	3.87	4.46	37.80
3	3.49	9.5	24.2	69	33.6	5.6	46	50.00	0.76	9.00	2.84	6.16	39.30
4	5.32	12.4	33.2	61	35.5	7.7	382	52.00	0.65	7.60	1.90	5.70	12.00
5	4.12	10.1	23.9	58	32.1	3.2	111	34.00	0.88	8.85	3.44	5.41	38.76
6	6.41	14.0	44.1	69	31.7	11.2	27	23.00	1.35	8.90	1.40	7.50	23.40
7	7.83	14.6	47.9	61	32.4	8.2	364	24.40	1.00	7.40	2.60	4.80	68.49
8	4.10	11.4	27.9	67	32.1	23.5	67	20.32	1.01	8.06	3.35	4.71	26.97
9	3.97	8.4	25.8	65	32.4	33.1	273	20.00	1.25	4.10	2.60	1.50	31.80
10	5.00	7.4	23.4	59	31.7	11.7	298	14.00	0.58	8.50	2.20	6.30	36.30
11	5.31	11.0	33.5	63	32.9	20.0	470	51.00	1.02	8.80	2.10	6.70	15.00
12	4.62	9.0	27.8	60	32.3	32.4	219	26.40	0.84	7.05	1.40	5.65	10.89

*Reference values: RBC (red blood cells)= 5.5-8.5 (x10⁶/mm³);HGB (hemoglobin)= 12-18 g/dL;HT (haematocrit)= 37-55%; MCV= 60-77 fL; MCHC= 32-36 %; Leuk (leukocytes)= 6-17 x 10³/mm³; Platelets= 200-500 x10³/mm³ (24); urea: 21,40-59,92 mg/dL; creatinine: 0,50-1,50 mg/dL; Total protein: 5,40-7,10 g/dL; albumin: 2,60-3,30 g/dL; globulin: 2,70-4,40 g/dL; ALT:21-73 UI/L. # ALT= alanine aminotransferase [22, 27].

Table 2. Detection of *E. canis* in renal tissue by nPCR and histopathological analysis in kidneys of dogs with CME.

Dogs	Type and intensity of Glomerulopathy	Interstitial nephritis ‡		nPCR
		Mononuclear inflammatory cell infiltrate		
		Corticomedullary	Cortical	
1	Mild diffuse membranoproliferative	0	1	+
2	Moderate focal membranoproliferative	3	4	+
3	Moderate focal membranoproliferative	4	4	+
4	Mild focal membranoproliferative	3	1	-
5	Mild focal membranoproliferative	2	2	-
6	Moderate focal membranoproliferative	1	1	-
7	Mild diffuse membranoproliferative	2	4	-
8	Moderate focal membranoproliferative	1	2	+
9	Moderate focal membranoproliferative	1	1	-
10	Mild diffuse proliferative	1	2	-
11	Mild focal proliferative	0	1	-
12	Moderate focal membranoproliferative	0	1	-

‡ = Scale of lesion intensity (0 = normal, 1 = minimum, 2 = mild, 3 = moderate and 4 = marked).

Hypoalbuminemia was also a common alteration that may be indicative of renal and/or hepatic lesion (10, 47). Notably, hypoalbuminemia was negatively correlated with severity of glomerular disease in our study population, suggesting that a decrease in serum albumin level is associated with glomerular damage according to lesion intensity (Fig. 1). Hypoalbuminemia caused by liver damage apparently did not occur in these cases, since according to Thrall et al. (2007), decreased serum albumin levels due to liver disease is only observed when there is a loss of 60 to 80% of liver function. In these cases, ascites normally occurs. However, these animals did not show ascites in both the clinical examination and autopsy.

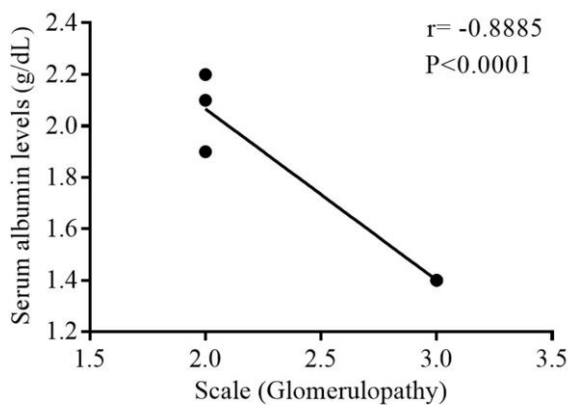


Figure 1. Negative correlation between serum albumin levels and severity of glomerulopathy in dogs naturally infected with *E. canis*. Spearman's test.

In this study, dogs with CME did not have altered serum levels of urea and creatinine. Therefore, a correlation between analyte levels and histopathologic renal findings was not evidenced in these dogs. It is noteworthy that more than 70% of the kidneys need to be involved for serum detection of these analytes (46).

Studies with dogs naturally infected with *E. canis* failed to observe glomerular lesions (20). However, in experimental infections minimal glomerular and tubular lesions have been described (9, 10, 14). Thus, we highlight the importance of our research study, the first to demonstrate that natural *E. canis* infection in dogs may cause significant glomerular damage. We confirmed that 50% of dogs with CME had moderate glomerulopathy accompanied by a minimal to moderate interstitial nephritis (Table 2).

Glomerular alterations in dogs with CME

To better understand the histopathological renal findings in dogs with CME, we characterized glomerulopathies according to the classification described by Maxie and Newman (26), as follows: membranous,

proliferative, membranoproliferative and sclerotic. In addition, we evaluated the distribution of glomerular lesions. It is worth mentioning that we failed to find any information in the literature pertaining to this approach in dogs naturally infected with *E. canis*.

Glomerulopathy was present in 100% of infected animals. The distribution of glomerular lesion was focal and diffuse in 75% and 25% of cases, respectively (Table 3). Membranoproliferative glomerulopathy predominated in 83.33% (10/12) of dogs with CME. In the glomerulus, we observed a striking increase in mononuclear cells in the mesangium accompanied by thickening of the mesangial matrix and glomerular capillary basement membrane, confirmed by PAS staining (Fig. 3). Furthermore, we observed an increase in the glomerular tuft and a decrease in the urinary space, particularly in moderate lesions. Glomerular hypercellularity was confirmed by the number of cells counted in 30 glomeruli. Dogs infected with *E. canis* had higher glomerular cellularity compared to noninfected control dogs (Fig. 2). Capillary damage was absent and/or minimal. Other glomerular injuries of lower intensity were: protein deposits in the urinary space, thickening of the urinary capsule, and mild glomerular sclerosis (Fig. 4). Proliferative glomerulopathy of mild intensity was present in only two dogs (Fig. 4). Both cases showed a global lesion, whose distribution was diffuse in one case and focal in the other. In this type of glomerular lesion, we observed an increased number of mononuclear cells in the mesangium and expansion of the mesangial matrix. Membranoproliferative glomerulonephritis has a poor prognosis and progresses to end-stage renal failure (4).

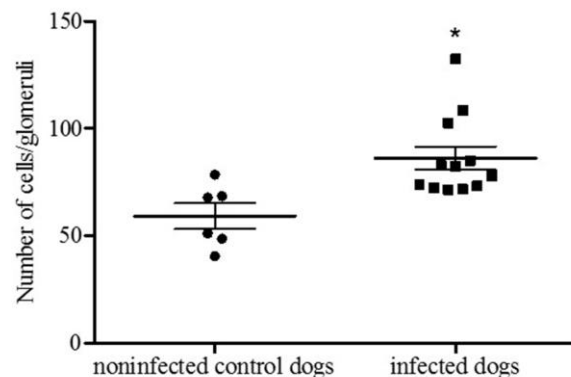


Figure 2. Glomerular cellularity. Number of cells per glomerulus is higher in kidneys of dogs infected with *E. canis* when compared with noninfected control dogs. * $p < 0.05$, Mann-Whitney test.

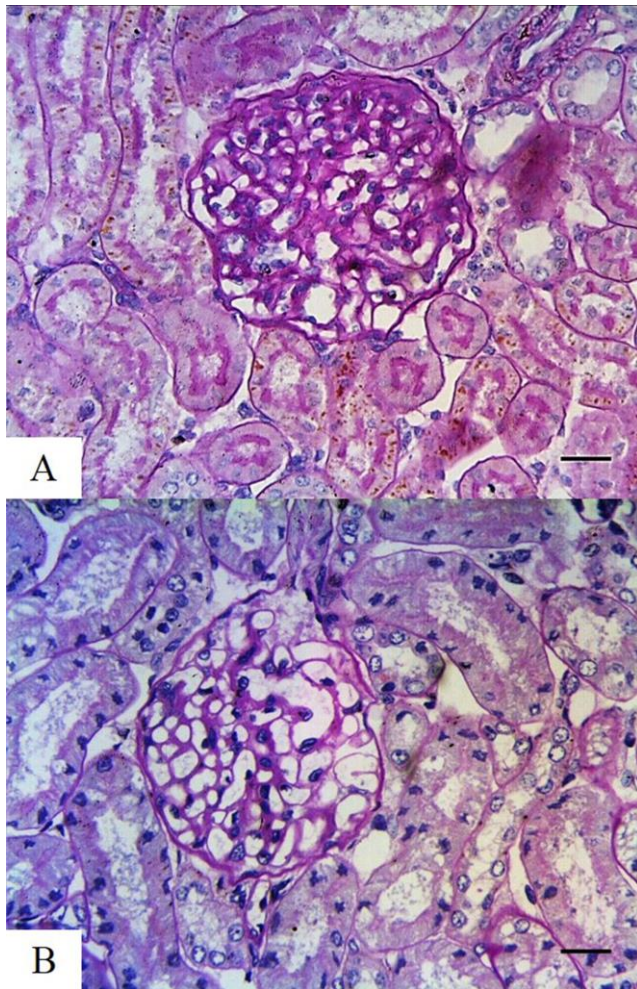


Figure 3. Membranoproliferative glomerulopathy in dogs naturally infected with *E. canis*. (A) Glomerular capillary basement membrane and mesangial matrix thickness; (B) Glomerulus without glomerular capillary basement membrane thickness. PAMS. Bar = 25 µm.

In chronic kidney disease, renal injury is associated with a direct or indirect action of the immune system. In general, a lesion directly mediated by the immune system affects the glomerulus causing different profiles of glomerulonephritis (37). Based on our data, *E. canis* infection seems to induce a particular type of membranoproliferative glomerular lesion. In studies evaluating renal lesion in dogs infected with *E. canis* either naturally and/or experimentally, the intensity of any alteration was minimal and the type of glomerulonephritis was not characterized (9, 10, 15).

Interstitial alterations in dogs with CME

In addition to glomerular alterations, we also observed tubulointerstitial lesions in all dogs with CME. Interstitial nephritis predominated in 100% of cases, with intensity ranging from minimal to marked. Inflammatory

infiltrates occurred more intensely in the cortex of the interstitial, perivascular and/or periglomerular regions (Table 4; Fig. 5). Codner et al. (10) observed lymphoplasmacytic infiltrate especially in the cortical region. Another study conducted in dogs naturally infected with *E. canis* demonstrated that 98% of animals exhibited plasma cell infiltration surrounding veins and arteries of the corticomedullary region (20). Plasma cell and histiocytic infiltrates were also present in the perivascular cortical region, extending to the corticomedullary region in the acute phase of experimental infection (33).

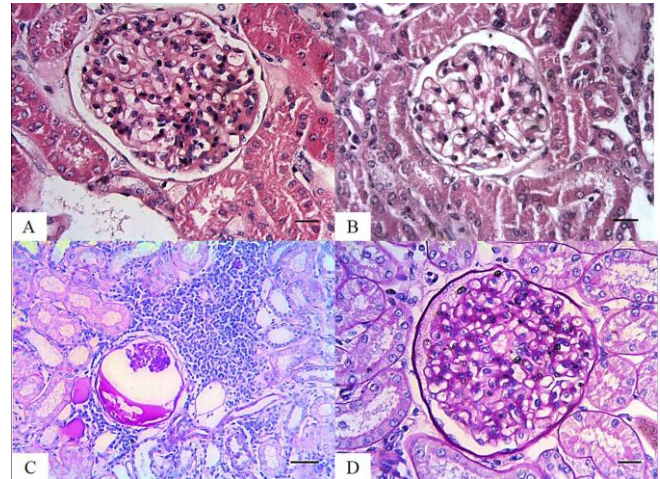


Figure 4. Glomerular lesion in kidney of dogs naturally infected with *E. canis*. (A) PGN. Glomerular hypercellularity (H&E). Bar = 25 µm. (B) Normal glomerulus (H&E). Bar = 25 µm. (C) Protein deposits in the urinary space (arrow) and glomerular sclerosis (arrowhead) (PAS). Bar= 50 µm. (D) PGN. Reduced of urinary space and mesangial matrix thickness (PAS). Bar = 25 µm.

The pathogenesis of CME appears to be related to antibody-dependent cytotoxicity (14, 21). According to Hildebrandt et al. (20), this leads to intense vasculitis in different organs, where perivascular plasma cell inflammatory infiltration predominates. In our analysis, we observed a perivascular lymphohistioplasmacytic infiltrate in the cortical region of kidney without evidence of vessel wall damage, suggesting that other mechanisms may be involved in the development of CME renal lesions.

In the cortical region, inflammatory infiltrates were mainly lymphohistioplasmacytic in 58.33% of cases, where there was a significant predominance of lymphocytes compared to plasma cells and histiocytes on differential tissue count (Fig. 6). In experimental infection induced by Codner et al. (10), cell infiltrates mainly composed of lymphocytes and plasma cells predominated in the cortical region. A perivascular lymphohistioplasmacytic infiltrate was also observed in the corticomedullary region in 33.33% of dogs, similar to findings obtained by other studies on natural infection

(20). In the pathophysiology of glomerulonephritis, glomerular lesion may alter homeostasis in the tubulointerstitial region through diverse mechanisms. One mechanism is T-cell recruitment, resulting from the production of inflammatory cytokines and chemotactic factors by kidney-resident dendritic cells (23). Since the disease causes immunoregulation, it may be inferred that T lymphocyte predominance contributes to the pathogenesis of interstitial nephritis in CME.

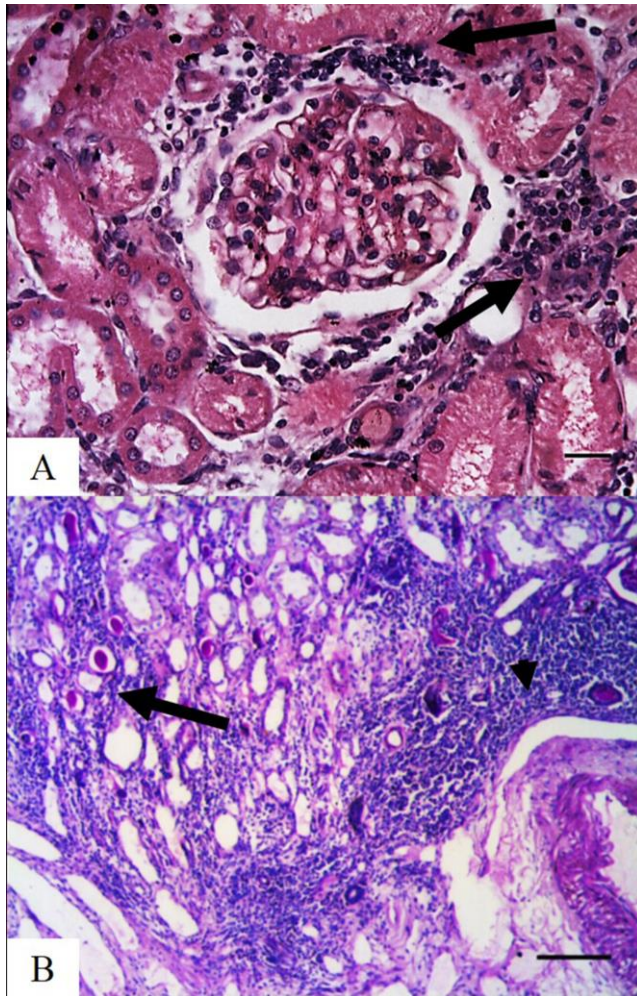


Figure 5. Inflammatory infiltrate in kidney of dogs naturally infected with *E. canis*. (A) Periglomerular mononuclear inflammatory infiltrate (arrows). H&E. Bar = 25 μm . (B) Interstitial (arrow) and perivascular (arrowhead) mononuclear inflammatory infiltrate. H&E. Bar = 100 μm .

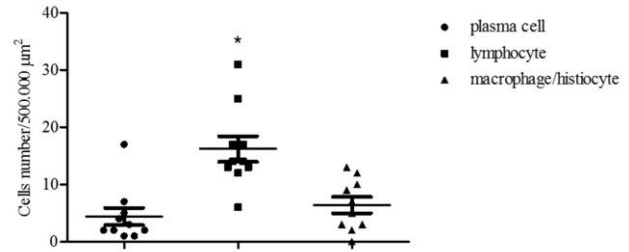


Figure 6. Differential tissue count of inflammatory infiltrate in kidney of dogs naturally infected with *E. canis*. Significant predominance of lymphocytes in inflammatory infiltrate in cortical area. * $p < 0.05$, Kruskal-Wallis and Dunns tests.

Minimal or moderate interstitial fibrosis was present in 33.33% of dogs in this study (Table 4). Fibrosis is not a lesion commonly described in CME, probably because analyses were conducted in the acute or subclinical phase of the disease (9, 10, 14, 20, 32). It is widely known that renal injury produced by *E. canis* occurs more commonly in the chronic phase (15). In our findings, fibrosis was more evident in cases with more intense inflammatory cell infiltration. Only one animal showed moderate fibrosis (Fig. 7), which was associated with multifocal to coalescing infiltration of inflammatory cells. In this case, there was tubular dilatation or atrophy in areas exhibiting more intense fibrosis. Moderate membrane proliferative glomerulopathy was also observed. However, the animal did not show any alterations in urea and creatinine serum levels, probably because fibrosis failed to affect the full length of the kidney.

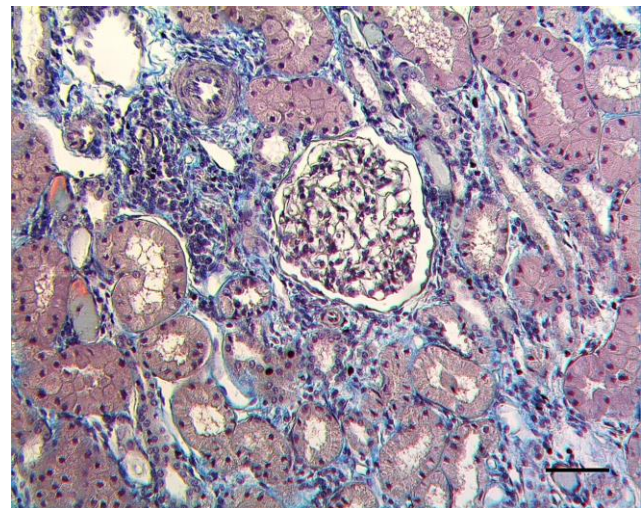


Figure 7. Interstitial fibrosis in kidney of dogs naturally infected with *E. canis*. Presence of moderate interstitial fibrosis in the peritubular and periglomerular region. Masson's trichrome. Bar = 50 μm .

Table 3. Glomerular alterations observed in kidneys of dogs naturally infected with *E. canis*.

Dogs	Glomerulopathy		Glom hypercell#	Glomerular Sclerosis	Mesang thick¥	Urinary capsule thick£	Urinary space thick∞	Protein dep urinary spaceΩ	Reduced BM space α	GM lob β
	Type	Intensity								
1	MPGN	2*	4	1	2	4	2	0	4	1
2	MPGN	3	3	2	1	0	0	0	1	0
3	MPGN	3	2	1	3	3	3	3	3	3
4	MPGN	2	4	0	3	2	4	1	4	0
5	MPGN	2	3	1	3	2	3	0	4	2
6	MPGN	2	3	2	3	1	4	0	4	0
7	MPGN	3	2	0	0	0	2	0	2	0
8	MPGN	3	3	2	3	1	2	0	2	1
9	MPGN	3	2	2	2	2	2	0	1	3
10	PGN	2	3	2	3	1	3	0	1	0
11	PGN	2	3	0	3	1	3	0	3	3
12	MPGN	3	4	0	3	2	2	0	2	3

MPGN= membranoproliferative glomerulonephritis. PGN= proliferative glomerulonephritis. * scale of lesion intensity (0 = normal, 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderate and 4 = marked). # = glomerular hypercellularity; ¥ = mesangial matrix thickness; £ = glomerular capillary basement membrane thickness; ∞ = Urinary capsule thickness; Ω = protein deposits in the urinary space; α = reduced urinary space; β = glomerular lobulation.

Table 4. Histological characteristics of interstitial nephritis and other lesions observed in kidney of dogs naturally infected with *E. canis*.

Dog	Interstitial nephritis			Other lesions
	Inflammatory infiltrate type	Distribution	Intensity	
1	Lymphohistioplasmacytic	Interstitial, perivascular, periglomerular focal	Minimum	Tubular vacuolar degeneration, necrosis, dilatation and atrophy; hyaline casts
2	Lymphohistioplasmacytic	Interstitial, perivascular, periglomerular multifocal tocoalescing	Marked	Tubular vacuolar degeneration, necrosis, dilatation and atrophy; hyaline casts; interstitial fibrosis
3	Lymphoplasmahistiocytic	Interstitial, perivascular, periglomerular, subcapsular multifocal tocoalescing	Marked	Tubular vacuolar degeneration, necrosis, dilatation and atrophy; hyaline casts; interstitial fibrosis
4	Lymphohistioplasmacytic	Interstitial, perivascular, periglomerular Multifocal	Mild	Interstitial fibrosis
5	Lymphohistioplasmacytic	Interstitial, perivascular multifocal	Minimum	Tubular vacuolar degeneration
6	Lymphohistioplasmacytic	Interstitial, perivascular multifocal	Minimum	Tubular vacuolar degeneration, necrosis and atrophy; hyaline casts
7	Plasmalymphocytic	Interstitial focal	Marked	Hyaline casts
8	Lymphohistioplasmacytic	Interstitial, perivascular, subcapsular Multifocal	Mild	Tubular vacuolar degeneration; hyaline casts; interstitial fibrosis
9	Lymphohistioplasmacytic	Interstitial, perivascular, periglomerular multifocal	Minimum	Tubular vacuolar degeneration
10	Lymphoplasmacytic	Interstitial, perivascular, periglomerular multifocal	Mild	Tubular vacuolar degeneration and dilatation
11	Histiolympocytic	Interstitial focal	Minimum	Tubular vacuolar degeneration, necrosis and dilatation
12	Histioplasmalymphocytic	Interstitial focal	Minimum	None

Renal hyaline casts were found in 50% of our dogs. In two cases, hyaline casts of marked intensity were present (Table 4; Fig. 8). Urinalysis was not possible in this study, but this finding confirmed proteinuria in these animals. According to Troy and Forrester (44) proteinuria, with or without azotemia, may occur in dogs with ehrlichiosis. In the acute phase of CME, it was observed that proteinuria was inversely correlated with serum albumin levels, suggesting that hypoalbuminemia in CME may be due to protein loss from the kidneys (10).

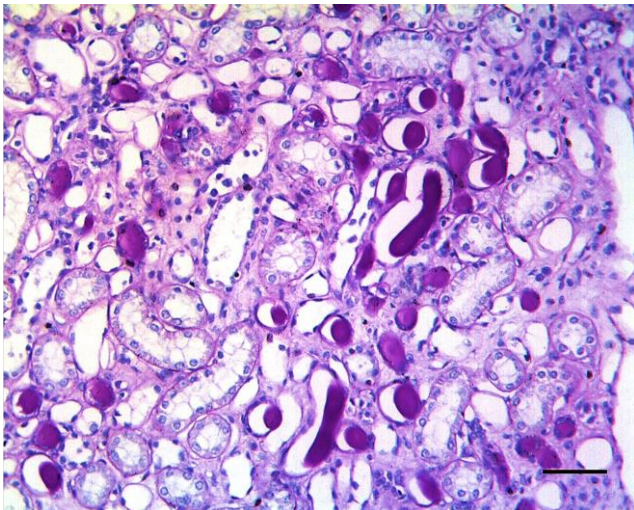


Figure 8. Presence of hyaline casts in kidneys of dogs naturally infected with *E. canis*. Hyaline casts in renal tubules (arrows). PAS. Bar = 50 μ m.

Circulatory changes including vascular congestion, hemorrhage and edema were also occasionally observed. Furthermore, in the medullary region there were two cases of lymphocytic pyelitis ranging in intensity from minimal to mild, and four cases of pyelonephritis, with mild to marked intensity.

Conclusions

This study provides first data on the characterization of glomerulopathy in renal lesions of dogs naturally infected with *E. canis*. Our findings showed that membranoproliferative glomerulonephritis was the main glomerular lesion associated with infection by this bacterium. Although we did not find any cases with clinical manifestations due to renal damage, our data demonstrate the importance of histological renal findings associated with protein loss before the occurrence of clinical disease. Thus, mild glomerular changes seem to suffice for hypoalbuminemia even in cases of focal lesions. The pathogenesis of membranoproliferative glomerulonephritis in dogs is often associated with immunocomplex deposition. However, interstitial nephritis associated with lymphocyte infiltrate suggests that these cells may also play an important role in the immunopathogenesis of renal lesion in dogs with CME, as

shown in this study. Therefore, further studies to clarify the involvement of these cells in the pathogenesis of nephropathy associated with infection by *E. canis* in dogs are needed to provide more accurate information for the diagnosis, treatment and prognosis of CME.

Acknowledgment

We would like to thank Prof. FAL Costa (*in memoriam*) for providing the basis for this study and CAPES (Coordination for Personal Improvement in Higher Education) for funding the fellowship.

References

1. AGARWAL SK., SETHI S., DINDA AK. Basics of kidney biopsy: a nephrologist's perspective. **Indian J. Nephrol.**, 2013, 23, 243-252.
2. ALMOSNY NRP., MASSARD CL., SILVA GVO., XAVIER MS. Avaliação hematológica de cães infectados experimentalmente por *Ehrlichia canis*. **Rev. Bras. Cienc. Vet.**, 2000, 7, 111-112.
3. ALMOSNY NRP. **Ehrlichia canis (Donatien & Lestoquard, 1935): Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados.** Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.
4. BARROS RT., ALVES MAVFR.; DANTE, M. **Glomerulopatias: patogenia, clínica e tratamento.** 5 ed., Sarvier, 2006.
5. BORIN S., CRIVELENTI LZ., FERREIRA FA. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia spp.* naturalmente infectados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 2009, 61, 566-571.
6. BULLA C., TAKAHIRA RK., ARAÚJO Jr. JP., TRINCA LA., LOPES RS., WIEDMEYER CE. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Vet. Res.**, 2004, 35, 141-146.
7. CIANCIOLO RE., MOHR FC. Urinary System. MAXIE MG. **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of domestic animals.** 6 ed., vol. 2, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2015: 376-464.
8. CIANCIOLO RE., MOHR FC., ARESU L., BROWN CA., JAMES C., JANSEN JH., SPANGLER WL., VAN DER LUGT JJ., KASS PH., BROVIDA C., COWGILL LD., HEIENE R., POLZIN DJ., SYMES H., VADEN SL., VAN DONGEN AM., LEES GE. World Small Animal Veterinary Association Renal Pathology Initiative: classification of glomerular diseases in dogs. **Vet. Pathol.**, 2016, 53, 113-135.
9. CODNER EC., CACECI T., SAUNDERS GK., SMITH CA., ROBERTSON JL., MARTIN RA., TROY GC. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia*

- canis* infection. **Am J. Vet. Res.**, 1992, 53, 2286-2291.
10. CODNER EC., MASLIN WR. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **Am. J. Vet. Res.**, 1992, 53, 294-299.
 11. COHN LA. Ehrlichiosis and related infections. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, 2003, 33, 863-884.
 12. COSTA FAL. **Patologia e imunopatogenia da nefropatia da leishmaniose visceral canina.** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
 13. COSTA FAL., GOTO H., SALDANHA LC., SILVA SM., SINHORINI IL., SILVA TC., GUERRA JL. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Vet. Pathol.**, 2003, 40, 677-684.
 14. DE CASTRO MB., MACHADO RZ., DE AQUINO LP., ALESSI AC., COSTA MT. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Vet. Parasitol.**, 2004, 119, 73-86.
 15. FRANK JR., BREITSCHWERDT EB. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **J. Vet. Intern. Med.**, 1999, 13, 194-201.
 16. GRAUER GF. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. **J. Small Anim. Pract.**, 2005, 46, 469-478.
 17. GRAUER GF. Proteinuria: measurement and interpretation. **Top. Companion. Anim. Med.**, 2011, 26, 121-127.
 18. HARRUS S., DAY MJ., WANER T., BARK H. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Vet. Microbiol.**, 2001, 83, 343-349.
 19. HASEWAGA MY. **Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular.** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
 20. HILDEBRANDT PK., HUXSOLL DL., WALKER JS., NIMS RM., TAYLOR R., ANDREWS M. Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia). **Am. J. Vet. Res.**, 1973, 34, 1309-1320.
 21. KAKOMA I., CARSON CA., RISTIC M., HUXSOLL DL., STEPHENSON EH., NYINDO MB. Autologous lymphocyte-mediated cytotoxicity against monocytes in canine ehrlichiosis. **Am. J. Vet. Res.**, 1977, 38, 1557-1559.
 22. KANEKO JJ., HARVEY JW., BRUSS ML. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals.** 5ed., Academic Press, 1997.
 23. KURTS C., PANZER U., ANDERS HJ., REES AJ. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. **Nat. Rev. Immunol.**, 2013, 13, 738-753.
 24. JAIN, NC. **Essentials of veterinary hematology,** Wiley-Blackwell, 1993.
 25. LUCKSCHANDER N., KLEITER M., WILLMANN M. Renal amyloidosis caused by *Ehrlichia canis*. **Schweiz. Arch. Tierheilkd.**, 2003, 145, 482-485.
 26. MAXIE MG., NEWMAN S. The urinary system. MAXIE MG. **Pathology of domestic animals.** 5 ed. vol. 2, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007: 425-522.
 27. MEYER DJ., HARVEY JW. **Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis.** 2 ed., Saunders, 2004.
 28. MYLONAKIS ME., KOUTINAS AF., BREITSCHWERDT EB., HEGARTY BC., BILLINIS CD., LEONTIDES LS., KONTOS VS. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, 2004, 40, 174-184.
 29. NAKAGHI ACH., MACHADO RZ., COSTA MT., ANDRÉ MR., BALDANI CD. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciênc. Rural**, 2008, 38, 766-770.
 30. ORIÁ AP., DÓREA NETO FA., MACHADO RZ., SANTANA AE, GUERRA JL., SILVA VLD, BEDFORD PGC, LAUS JL. Ophthalmic, hematologic and serologic findings in dogs with suspected *Ehrlichia canis* infections. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, 2008, 15, 94-97.
 31. ORIÁ AP., PEREIRA PM., LAUS JL. Uveitis in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **Ciênc. Rural**, 2004, 34, 1289-1295.
 32. PEREZ M., BODOR M., ZHANG C., XIONG Q., RIKIHISA Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 2006, 1078, 110-117.
 33. REARDON MJ., PIERCE KR. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. **Vet. Pathol.**, 1981, 18, 48-61.
 34. RENE-MARTELLET M., LEBERT I., CHENE J., MASSOT R., LEON M., LEAL A., BADAVELLI S., CHALVET-MONFRAY K., DUCROT C., ABRIAL D., CHABANNE L., HALOS L. Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. **Parasit. Vectors.**, 2015, 8, 1-10.
 35. RISTIC M., HOLLAND C. Canine ehrlichiosis. WOLDEHVIET Z, RISTIC M. **Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals.** Pergamon Press, 1993: 169-186.
 36. ROQUEPLO C., CHEMINEL V., BOURRY O., GOMEZ J., PREVOSTO JM., PARZY D., DAVOUST B. Canine ehrlichiosis in the Ivory Coast

- and Gabon: alteration of biochemical blood parameters based on *Ehrlichia canis* serology. **Clin. Microbiol. Infect.**, 2009, 15, 41-42.
37. SERAKIDES R. Sistema urinário. SANTOS RL., ALESSI AC. **Patologia veterinária**, Roca, São Paulo 2010: 291-336.
 38. SILVA LS. **Erliquiose e anaplasose canina em Teresina, Piauí**. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.
 39. SIMPSON CF. Relationship of *Ehrlichia canis*-infected mononuclear cells to blood vessels of lungs. **Infect. Immun.**, 1974, 10, 590-596.
 40. SOUSA VRF., ALMEIDA ADBPFD., BARROS LA., SALES KG., JUSTINO CHDS., DALCIN L., BOMFIM TCBD. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. **Ciênc. Rural**, 2010, 40, 1309-1313.
 41. THRALL MA. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**, Roca, São Paulo, 2006.
 42. TISHER CC., BRENNER BM. **Renal Pathology with clinical and functional correlations**. 2 ed, JB Lippincott, Philadelphia 1994.
 43. TOLOSA CMC., RODRIGUES CJ., BEHMER AO., FREITAS NETO A. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Manole, São Paulo, 2003.
 44. TROY GC., FORRESTER SD. Canine ehrlichiosis. In: GREENE CE. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3 ed., Saunders, Philadelphia, 2006: 404-418.
 45. TROY GC., FORRESTER SD. Canine ehrlichiosis. GREENE CE. **Infectious diseases of the dog and cat**. WB Saunders, Philadelphia, 1990: 48-59.
 46. WAKI MF., MARTORELLI CR., MOSKO PE., KOGIKA MM. Classificação em estágios da doença renal crônica em cães e gatos: abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. **Ciênc. Rural**, 2010, 40, 2226-22.
 47. WANER T., HARRUS S., JONGEJAN F., BARK H., KEYSARY A., CORNELISSEN AW. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Vet. Parasitol.**, 2001, 95, 1-15.
 48. WEN B., RIKIHISA Y., MOTT JM., GREENE R., KIM HY., ZHI N., COUTO GC., UNVER A., BARTSCH R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **J. Clin. Microbiol.**, 1997, 35, 1852-1855.
 49. WOODY BJ., HOSKINS JD. Ehrlichial diseases of dogs. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, 1991, 21, 75-98.