

**PATOLOGIA E PATOGENIA DA NEFROPATIA NA INFECÇÃO POR LEPTOSPIRAS
EM OVINOS**

SÔNIA MARIA DE CARVALHO

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação, Universidade Federal do Piauí, para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração em Clínica e Cirurgia de Animais de Interesse Econômico.

TERESINA
Estado do Piauí - Brasil
2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**PATOLOGIA E PATOGENIA DA NEFROPATIA NA INFECÇÃO POR LEPTOSPIRAS
EM OVINOS**

SÔNIA MARIA DE CARVALHO

Orientador: Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa

Co-Orientador: Prof. Dr. Nicodemos Alves de Macedo

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação, Universidade Federal do Piauí, para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração em Clínica e Cirurgia de Animais de Interesse Econômico.

TERESINA
Estado do Piauí - Brasil
2005

C331

Carvalho, Sônia Maria de
Patologia e Patogenia da Nefropatia na Infecção por leptospiros em ovinos. / Sônia Maria de Carvalho. Teresina: EDUFPI, 2005.

63 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). – Universidade Federal do Piauí. 2005.

1. Gado ovino – Doenças 2. Patologia 3. Sorologia
4. Apoptose I. Título

CDD 636.308 9

**PATOLOGIA E PATOGENIA DA NEFROPATIA NA INFECÇÃO POR LEPTOSPIRAS
EM OVINOS**

SÔNIA MARIA DE CARVALHO

Aprovada em: 30/09/2005

Banca Examinadora:

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

Profa. Dra. Hiro Goto
FM/IMT-USP

Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz
CCA/UFPI

Aos Meus pais, Cícero e Amélia, que sempre estiveram presentes e nunca mediram esforços para a minha formação.

DEDICO

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Francisco Assis Lima Costa**, um exemplo de pesquisador a ser seguido, sempre indicando a direção a ser tomada nos momentos de maior dificuldade. Agradeço, principalmente pela confiança e dedicação no decorrer desta jornada.

MUITO OBRIGADA!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Nicodemos Alves de Macedo**, co-orientador, sempre prestativo e solícito;

À **Ana Lys Barradas Bezerra Mineiro**, pelo apoio constante e grande amizade;

Ao amigo **Luis Gomes da Silva**, funcionário da Pós-graduação, pela grande atenção e carinho com que sempre me atendeu durante a pós-graduação;

Aos meus **irmãos e sobrinhos**, por sempre terem acreditado em mim;

Aos Médicos Veterinários, **Nilton de Andrade Magalhães** e **Edson Egledson Andrade Ribeiro, Romualdo da Silva Ramos** e ao meu cunhado **Marcos Napoleão do Rego Paiva Dias**, pelo apoio importante na colheita do material deste estudo;

A **Manoel de Jesus**, Técnico do Laboratório de Histopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí pela confecção das lâminas para análise histopatológica;

Ao Prof. MSc. **Antonio Francisco de Sousa**, pela disponibilização do Laboratório de Análises Clínicas;

As alunas de iniciação científica do Setor de Patologia animal, pela convivência pacífica;

À Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará – ADEPARÁ, na pessoa dos Médicos Veterinários **Leandro Lopes da Silva** e **Eliana Dea Lara Costa**;

À profa. Dra. **Hiro Goto** do Laboratório de Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, pelo apoio laboratorial;

Ao Prof. Dr. **Sílvio Arruda Vasconcellos** do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ-USP, São Paulo, pelo apoio laboratorial;

Aos colegas do Mestrado pela excelente relação pessoal que criamos e espero que não se perca.

MUITO OBRIGADA.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
2 CAPÍTULO I:	
Infecção por Leptospiras em Ovinos e Caracterização da Resposta Inflamatória Renal.....	14
ABSTRACT.....	14
RESUMO	15
2.1 INTRODUÇÃO	15
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	17
2.3 RESULTADOS	18
2.4 DISCUSSÃO.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
3 CAPÍTULO II:	
Apoptose na Nefropatia da Leptospirose em Ovinos	35
RESUMO	36
ABSTRACT	36
3.1 INTRODUÇÃO	36
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.3 RESULTADOS	39
3.4 DISCUSSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
4 CONCLUSÕES GERAIS.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAL	54
ANEXO.....	59

RESUMO

A leptospirose é uma doença grave de distribuição mundial que afeta o homem e os animais. A infecção em animais, geralmente, é inaparente, ou os sintomas quando presentes são similares a outras infecções. Neste estudo foram colhidos soros de 119 ovinos e os respectivos rins durante abate em feiras livres no município de Teresina, PI. Pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) obteve-se 34 amostras sorológicas positivas para um ou mais sorovar de *Leptospira interrogans*, com taxa de ocorrência de 28,57%, com predominância do sorovar autumnalis (29,41%). A análise histopatológica revelou nefrite intersticial em 33 (71,74%) animais infectados e em 9 (19,56%) não infectados. Lesões tubulares foram observadas em 20 (55,55%) animais infectados e em 2 (20%) não infectados. A presença de leptospiras em túbulos foi observada em 8 (22,22%) das 36 amostras positivas. Nos animais infectados, o infiltrado inflamatório era significativamente mais evidente na região córtico-medular que nas regiões cortical e medular ($p = 0,0001$), mas não existia diferença entre animais infectados e não infectados. Cilindros hialinos nos túbulos proximais estavam presentes em quantidade significativamente maior nos animais infectados comparado aos não infectados ($p = 0,0001$). Em glomérulos, foi observada lesão discreta, caracterizada, principalmente, por hiperplasia focal, global e segmentar. Pelo método de ApoptTag Peroxidase, apoptose foi observada em células epiteliais tubulares das regiões cortical e medular em 30 (88,24%) animais infectados e somente na medular em 4 (80%) dos cinco, sem infecção. Quando comparamos os dois grupos de animais na presença de apoptose, verificou-se que existia marcação significativamente maior na cortical ($p = 0,035$) e medular ($p = 0,004$) nos animais infectados em relação aos não infectados. Os resultados mostram que ovinos infectados por leptospiras apresentam lesão renal túbulo-intersticial, com presença da bactéria nos túbulos, o que confere aos animais a condição de portador assintomático capazes de disseminar a infecção por eliminação de leptospiras na urina. Apoptose ocorre em ovinos naturalmente infectados por leptospiras com ação primária sobre células epiteliais tubulares. e evidencia que a mesma reduz a população de células tubulares na presença de alterações inflamatórias intersticiais.

ABSTRACT

Leptospirosis is a serious worldwide disease that affects the man and the animals. The infection in animals, generally, is symptomeless, or the symptoms when present are similar to other infections. In this study serum of 119 ovine and the respective kidneys were collected during slaughter in free fairs in the city of Teresina, PI. The microscopic agglutination tests (MAT) at 34 positive serologically animals to one or more sorovar of *Leptospira interrogans*, revealed the occurrence of 28.57% positive cases, with predominance of the serovar autumnalis (29.41%). The histopathological analysis showed interstitial nephritis at 33 (71.74%) infected animals and at 9 (19.56%) not-infected. Tubular injuries was observed in 20 (55.55%) infected animals and in 2 (20%) not-infected. The presence of leptospira in tubules was observed at 8 (22.22%) of the 36 positive samples. In the infected animals, inflammatory infiltrate was significantly more evident in the cortical-medullary region than in the cortical and medullar ($p = 0.0001$), but difference between infected and not-infected animals did not exist. The presence of hyalines casts in the proximal tubules were significantly greater in the infected compared to the not-infected groups ($p = 0.0001$). In glomeruli, discrete injury, characterized, mainly, for focal, global and segmental hypercellularity was observed. By the method of ApopTag Peroxidase, apoptosis was observed in tubular epithelial cells at the cortical and medullar regions in 30 (88.24%) infected animals and only at the medullar in 04 (80%) of the five animals, without infection. When compare the two animals groups verified that apoptosis was more evident in the cortical ($p = 0.035$) and medullar ($p = 0.004$) at the infected animals in relation to the not-infected animals. The results of this study showed that infected ovine for *Leptospira* they present tubule-interstitial renal injury, with presence of the bacterium in the tubules, what confers to the animals the condition of asymptomatic carrier capable to spread the infection for elimination of *Leptospira* in the urine. Apoptosis occurs in kidney of infected ovines by *Leptospira* with primary action on tubular epithelial cells and evidences that the same reduces the population of tubular cells at the presence of interstitial inflammatory alterations.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença bacteriana, de ocorrência mundial que afeta o homem (PLANK; DEAN, 2000), várias espécies de animais domésticos (JULIANO et al., 2000) e silvestres (MILAS et al., 2002; VANASCO et al., 2003).

A enfermidade é causada por bactéria da ordem Spirochaetales, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira* (BARANTON, 1995) compreendendo duas espécies: *Leptospira biflexa* (saprófita) e *Leptospira interrogans* (patogênica) (FARR, 1995). *L. interrogans* abrange aproximadamente 300 sorovares associados a infecções em humanos e animais (OZDENIR; EROL, 2002). Sorovares antigenicamente relacionados, são tradicionalmente agrupados em sorogrupos (LEVETT, 2001).

As leptospiras são bactérias aeróbias obrigatórias, medem de 0,1µm x 6 a 20µm de comprimento, morfologia filamentosa, espiralada, com movimentos rotacionais e de dobramento (helicoidal) (BARANTON, 1995) o que possibilita à bactéria motilidade ativa. Geralmente, uma ou ambas extremidades é dobrada ou em formato de gancho, mas a forma reta também ocorre, com movimentos mais lentos. Por causa do seu diâmetro estreito, as leptospiras são melhor visualizadas por iluminação de campo escuro ou microscópio de contraste de fase. As leptospiras de vida livre (*L. biflexa*) e parasitária (*L. interrogans*) são morfologicamente indistinguíveis (FAINE, 1982).

Cada sorovar de leptospira tem um hospedeiro preferencial que atua como reservatório, e um acidental que pode sofrer infecções esporádicas (RIET-CORREA; LEMOS, 2001). Uma espécie animal pode ser infectada por sorovares mantidos no ambiente por outras espécies, pelo contato indireto com o reservatório. Os animais podem atuar como reservatórios para alguns sorovares e acidental para outros, nos quais a infecção pode ser grave ou fatal (LEVETT, 2001). Felizmente, somente um pequeno número de sorovares é endêmico a uma região particular ou país (ELLIS, 1994).

As infecções leptospirais mais importantes em animais domésticos de interesse econômico, são devidas aos sorovares hardjo, mantido por bovinos e, possivelmente ovinos e caprinos; pomona, tarassovi e bratislava mantidos por suínos; icterohaemorrhagiae, mantidos por ratos; grippotyphosa e sejroe, por roedores e canícola pelo cão (MACEDO, 1997). No Brasil, a

associação freqüente entre reservatório e sorovar infectante mais provável, depende da área geográfica, mas, usualmente são observados: roedores sinântrópicos, icterohaemorrhagiae e copenhageni; marsupiais, grippotyphosa; bovinos, hardjo, wolffi e hebdomadis; suínos, pomona e icterohaemorrhagiae; eqüinos, icterohaemorrhagiae; caninos, canicola, icterohaemorrhagiae e copenhageni; ovinos e caprinos, icterohaemorrhagiae (VASCONCELLOS, 1997; LILENBAUM, 1998; FÁVERO et al., 2002).

Leptospirose nos animais domésticos de produção causa enormes perdas econômicas na forma de abortamentos, natimortos, diminuição da produção de leite e infertilidade (Faine, 1982). Em ovinos a infecção pode causar doença clínica no terço final da gestação e imediatamente no período pós-parto, quando as ovelhas se encontram fisiologicamente imunodeprimidas. Surto esporádicos da doença aguda são caracterizados por hematúria, hemoglobinúria, icterícia e morte, usualmente nos cordeiros (ELLIS; McDOWELL, 1993).

A prevalência de sorovares de *L. interrogans*, causadores de doença nos animais, varia entre países e regiões. Na França, estudo com 355 amostras de soro ovino revelou 9,8% positivos no teste de aglutinação microscópica (SAM), com predominância dos sorovares grippotyphosa e sejroe (TRAP; GARIN-BASTUJI, 1988); na Espanha, levantamento de 973 casos de abortamento em ovelhas, revelou que 1,7% dos animais apresentaram aglutininas antileptospíricas, sendo predominante o sorovar pomona (64,7%), seguido pelo sejroe (17,6%) (LEON-VIZCAINO, MENDOZA, GARRIDO, 1987); na Itália, 313 amostras de soro foram examinadas, sendo observada positividade de 6,1% e o sorovar prevalente foi castellonis (CICERONI et al., 2000); na Austrália, ELLIS et al. (1994), observaram que em 2.160 amostras de soro ovino, 42% foram positivas para o sorovar hardjo; na Nova Zelândia, de 928 soros ovinos testados, 20% reagiram ao sorovar hardjo (BLACKMORE, BAHAMAN, MARSHALL, 1982); na Nigéria, em 255 soros ovinos, 23,5% foram positivos para leptospira, com predominância do sorovar pomona (AGUNLOYE, 2002); no Chile, um inquérito sorológico revelou 5,7% de positividade em 629 amostras de soro, sendo os sorovares mais freqüentes, icterohaemorrhagiae, autumnalis e hardjo (ZAMORA, RIEDEMANN, TADICH, 1999); no Brasil, apesar da grande população de ovinos, existem poucos dados sobre leptospirose nesta espécie. O primeiro estudo foi publicado em 1973 no Estado de São Paulo. Soro de 400 animais revelou prevalência de 34% (SANTA ROSA; CASTRO, 1973); outros estudos foram realizados, também, no Estado de São Paulo: 356 amostras de soro ovino, revelaram 44,65% positivos, com prevalência de 51,25% para o sorovar icterohaemorrhagiae, seguido de castellonis com 20,33% (LANGONI et al., 1995); a análise de 846 amostras de soro pertencentes a 15 rebanhos, mostrou

que 8,6% eram reagentes, sendo o sorovar wolffi (5,1%) o mais freqüente (BARBUDO-FILHO et al.,1999); estudo retrospectivo realizado com 284 soros de ovinos reagiram positivamente em 0,7% e o sorovar icterohaemorrhagiae (40%) o mais freqüente (FÁVERO et al., 2002); em Pernambuco, 26,3% dos ovinos de 10 rebanhos foram positivos para leptospirose, com maior prevalência para o sorovar castellonis (BORBA et al., 2003); no Estado do Piauí, 282 amostras de soro de ovinos de 10 municípios da microrregião de Teresina, demonstrou 10,28% de positividade com predominância do sorovar castellonis (33,33%), seguido de australis (11,11%), bratislava e hardjo (8,33%) (COSTA et al., 2004).

As vias de transmissão mais freqüentes de leptospirose são urina, água de superfície, lama e solo úmido. As leptospiras penetram através de pequenas abrasões ou cortes na superfície da pele. Podem cair também diretamente na corrente sanguínea ou no sistema linfático através da conjuntiva, pulmões após inalação de aerosol, ou através da invasão da placenta para o feto, em todo o estágio de gestação nos mamíferos (LEVETT, 2001).

As lesões provocadas por *L. interrogans* são observadas, principalmente, nos rins, mas útero, fígado, coração e pulmões também são comprometidos (LIN et al., 1999; YANG; WU; PAN, 2001, SITPRIJA, LOSUWANRAK, KANJANABUCH, 2003). A leptospirose compromete várias estruturas do rim. Lesões túbulo-intersticiais são mais comuns e constitui a alteração patológica básica da doença. Observa-se nefrite intersticial crônica (OLIVEIRA et al., 2005), caracterizada por infiltrado de linfócitos, plasmócitos (YENER; KELES, 2001; SAGLAM; TEMUR; ASLAN, 2003), macrófagos (ROSSETTI et al., 2004) e raros eosinófilos (SCANZIANI; SIRONI; MANDELLI, 1989). Neutrófilos estão presente no estágio inicial da infecção (SITPRIJA et al., 1980). O infiltrado inflamatório tem localização periglomerular, perivascular e intertubular (YENER; KELES, 2001; SAGLAM; TEMUR; ASLAN, 2003; MARINHO et al., 2003) e apresenta distribuição variando de focal a difuso na região cortical e medular externa (FERREIRA ALVES et al., 1987). Embora necrose tubular e alterações intersticiais sejam observadas em pacientes com falha renal, alterações intersticiais cronologicamente precedem a necrose tubular (SITPRIJA; LOSUWANRAK; KANJANABUCH,2003). A lesão glomerular na leptospirose é, em geral, suave e transitória, entretanto, no homem (SITPRIJA et al., 1980) e camundongo (MARINHO et al. 2003), foram observadas proliferação de células mesangiais. Por outro lado, glomerulonefrite de alterações mínimas tem sido observada, sendo considerada a base anatômica para proteinúria na leptospirose (LEVETT, 2001). Ocasionalmente, são observadas atrofia glomerular, infiltrado inflamatório periglomerular com espessamento da cápsula de Bowman (MARINHO et al., 2003;

ROSSETTI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; SCHÖNBERG et al., 2005). Depósitos de C3 e IgM são vistos nas áreas mesangiais e alça capilar (SITPRIJA, LOSUWANRAK, KANJANABUCH, 2003), mas apenas depósito de C3 sem imunoglobulina é visto nas arteríolas aferentes glomerulares (SITPRIJA et al., 1980). Degeneração e necrose das células epiteliais tubulares ocorre em túbulos proximais e distais, mas as alterações decorrentes da infecção envolve primariamente os túbulos proximais (ELLIS et al., 1984; YENER; KELES, 2001; DELBEM et al., 2002; SAGLAM; TEMUR; ASLAN, 2003). Necrose tubular pode ser observada principalmente na região córtico-medular (MARINHO et al., 2003), acompanhada de ruptura da membrana basal, regeneração, proliferação (YENER; KELES, 2001) e atrofia do epitélio tubular (SCANZIANI, SIRONI, MANDELLI, 1989; HAMIR et al., 2001). Vasculite com hemorragia focal, associada a alteração da permeabilidade capilar, pode ser vista na fase aguda da doença (FARR, 1995; PLANK; DEAN, 2000). Leptospirose experimental em cobaias, mostra danos na microvascularização progredindo paralelamente com lesão tubular. A microcirculação da cortical e junção córtico-medular é afetada, bem como os vasos medulares em animais com função renal afetada (ARRIAGA et al. Apud ABDULKADER, 1997). Essas alterações são refletidas pela urinálise anormal, freqüentemente mostrando proteinúria e cilindros hialinos no lume dos túbulos (SAGLAM; TEMUR; ASLAN, 2003; ROSSETTI, et al., 2004; HAANWINCKEL, MEGID, SOUZA, 2004). A lesão tubulointersticial e fibrose tem um papel crítico na progressão da doença renal, de modo que é impressionante a correlação entre a severidade da alteração patológica tubulointersticial e o subsequente desenvolvimento e progressão da falha renal crônica (HUGHES, 2000).

Apesar do rim ser o órgão de predileção para a localização de leptospiras, a patogenia das alterações renais ainda é pouco conhecida, principalmente nos animais e, mais especificamente, em ovinos. Mas esta não é uma peculiaridade apenas da leptospirose ovina, pois mesmo em outras enfermidades infecciosas com comprometimento renal, que acometem espécies onde o problema é melhor estudado, incluindo o homem (TISHER; BRENNER, 1994) e o cão (COSTA et al., 2000), pouco se sabe sobre o mecanismo da lesão renal.

A leptospirose constitui uma enfermidade bifásica. A fase aguda tem início, após a penetração da leptospira pelas membranas mucosas ou pela pele íntegra. A leptospira invade a circulação, multiplicando-se ativamente, para posterior migração em direção aos órgãos de eleição. A fase imune se inicia após a leptospira desaparecer completamente da circulação, (LEVETT, 2001) quando ocorre mediação imunológica humoral e celular. A eliminação inicial da bactéria é feita por macrófagos. Estas células conseguem fagocitar leptospiras apatogênicas

sem a presença de anticorpos específicos, entretanto, as patogênicas precisam ser opsonizadas para que ocorra fagocitose (MARINHO et al., 2003). As leptospirosas são altamente invasivas e iniciam o processo inflamatório por meio de vários fatores antigênicos de membrana, incluindo lipopolissacarídeos (LPSs), peptidoglicanos, hialuronidases, fosfolipases e glicolipoproteínas (YANG; WU; PAN, 2001; SITPRIJA, LOSUWANRAK, KANJANABUCH, 2003). Peptidoglicano (PG) presente no arcabouço celular da leptospira, seria responsável por uma série de efeitos biológicos, *in vitro*, como ativação do complemento, estimulação da fagocitose por leucócitos e aumento da atividade mitogênica para linfócitos. Experimentos com cultura de células do endotélio de capilares umbilicais humanos, revelaram que o próprio peptidoglicano pode estimular células endoteliais a aumentar a capacidade de adesão para leucócitos polimorfonucleares. Macrófagos ativados podem liberar citocinas pró-inflamatórias, TNF α e a interleucina-1, induzindo a geração de uma cascata de mediadores vasoativos e moléculas de adesão, que resulta em alterações hemodinâmicas e lesão tecidual (ABDULKADER et al., 2002; SITPRIJA; LOSUWANRAK; KANJANABUCH, 2003). Assim, verifica-se que as lesões renais presentes na leptospirose, nem sempre são causadas pela agressão tecidual direta do agente, uma vez que nem sempre o mesmo se encontra na área lesada (MARINHO et al., 2003).

As proteínas de membrana, OmpL1 (porina), as lipoproteínas Lip41 e LipL36 e os lipopolissacarídeos (LPSs), estão presentes nas leptospirosas patogênicas e são responsáveis pela aderência das mesmas às células epiteliais tubulares renais (DOBRINA et al., 1995). Em hamster, LPS, OmpL1 e LipL41, foram mostrados no lume tubular renal 10 dias após a infecção. Em 28 dias, LPS e OmpL1 estavam presentes no interstício acompanhado por infiltração celular. A invasão bacteriana, antígenos de membrana e a infiltração celular são conseqüentemente responsáveis pelo desenvolvimento de lesões renais na leptospirose (BARNETT et al., 1999).

Em ovinos com leptospirose, observa-se um mecanismo patogênico distinto devido a hemólise direta causada por hemolisina leptospírica, em que IgM atua como uma hemaglutinina crio-reagente, podendo desencadear uma crise hemolítica, no momento em que os animais são expostos à baixa temperatura (HEATH; JOHNSON, 1994).

Por outro lado, apoptose, também conhecido como morte celular programada, é descrito em vários processos fisiológicos, com papel essencial na homeostase de organismos multicelulares, e está presente em diversas situações, dentre as quais, processos inflamatórios agudos e crônicos (BONINI, MOURA, FRANCO, 2000). A apoptose difere da morte por necrose em vários aspectos. Enquanto na necrose há destruição de todas as organelas celulares com grande reação inflamatória no tecido, ocorrendo devido à exposição da célula a estímulos

nocivos muito intensos, como por exemplo, anoxia, toxinas, calor, radiação e envolve um grupo de células; na apoptose, ocorre encolhimento celular, translocação da fosfatidilserina para a superfície externa da membrana celular, formação de bolhas citoplasmáticas na superfície da célula, perda do potencial transmembrana interno, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (DOCKRELL, 2003). Os pequenos corpos apoptóticos são fagocitados rapidamente pelos macrófagos sem reação inflamatória (MENÈ; AMORE, 1998).

A morte celular por apoptose é um fenômeno reconhecido no início do desenvolvimento renal, bem como em várias doenças renais (SAVILL, 1994). Contudo, a presença de apoptose no rim de ovinos infectados por leptospiros ainda não foi investigada, mas, sabe-se que leptospiros virulentas induzem apoptose in vivo e in vitro (MERIEN; BARANTON; PEROLAT, 1997) de hepatócitos em cobaias (MERIEN et al., 1998). Desse modo, é provável que o fenômeno de apoptose também ocorra no rim, como mecanismo indutor de lesão túbulo-intersticial.

Vários fatores estão envolvidos na morte celular tubulointersticial. Estudos em rato Lewis mostrou que BSA (albumina do soro de bovino) injetada intraperitonealmente induz apoptose de células epiteliais de túbulos proximais, o que permite uma ligação direta entre proteinúria e lesão túbulo-intersticial (THOMAS et al., 1999). Apoptose de células epiteliais tubulares mediada por macrófagos é observada também em casos de nefrite do soro nefrotóxica em camundongos (TESCH et al., 1999). Na falha renal aguda isquêmica em ratos, apoptose observada três dias após injúria, é responsável pela perda celular tubular (JO et al., 2001). Assim, observa-se que apoptose participa do mecanismo de lesão em diversos processos de injúria renal, mas na nefropatia da leptospirose nada sabemos ainda sobre sua participação no processo de lesão dos compartimentos renais.

Este trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de infecção por leptospiros, associar a infecção com as lesões renais e avaliar a participação de apoptose na indução das alterações renais em ovinos naturalmente infectados por *Leptospira interrogans*.

Esta dissertação apresenta a seguinte estrutura formal: resumo geral, seguido de Abstract, uma introdução englobando revisão de literatura e objetivos; dois capítulos contendo artigos completos; um intitulado **“Infecção por Leptospiros em Ovinos e Caracterização da Resposta Inflamatória Renal”**, e o outro com o título **“Apoptose na Nefropatia da Leptospirose em Ovinos”**, encaminhados para publicação respectivamente na revista Pesquisa Veterinária Brasileira e Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, estruturados de acordo com as normas de cada revista; considerações finais e referências bibliográficas gerais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULKADER, R.C.R.M. Acute renal failure in leptospirosis. **Renal failure**, 19: 191-98, 1997.
- ABDULKADER, R.C.R.M. et al. Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 44: 79-83, 2002.
- AGUNLOYE, C.A. Leptospiral agglutinating antibodies in sheep and goats in South-west Nigéria. **Israel J. Vet. Med.**, 57: 28-30, 2002.
- BARANTON, G. The spirochaetes: a different way of life. **Bull. Inst. Pasteur**, 93: 63-95, 1995.
- BARBUDO-FILHO, J. et al. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira interrogans* em soros de ovinos do Estado de São Paulo. Avaliação do sorotipo *jequitiaia* de *Leptospira biflexa* como antígeno de triagem sorológica. **Ars Vet.**, 15: 26-32, 1999.
- BARNETT, J.K. et al. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. **Infec. Immunol.**, 67: 853:61, 1999.
- BLACKMORE, D.K.; BAHAMAN, A.R.; MARSHALL, R.B. The epidemiological interpretation of serological responses to leptospiral serovars in sheep. **New Zel. Vet. J.**, 30: 38-2, 1982.
- BONINI, A.L.; MOURA, A.R.; FRANCO, M. Revisão: apoptose em glomerulopatias. **J. Bras. Nefrol.**, 22: 70-7, 2000.
- BORBA, M.A. C. et al. Soroprevalência da leptospirose em ovinos e caprinos do Estado de Pernambuco – resultados preliminares. IN: CONG. LATINOAMER. DE BUIATRIA 11, CONG. BRAS. DE BUIATRIA 5, CONG. NORDEST. DE BUIATRIA 3, Salvador, Bahia, Brasil. 2003. Livro de resumos e palestras.
- CICERONI, L. et al. Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in sheep and goats in Alto Adige-south Tyrol. **J. Vet. Med.B**, 47: 217-23, 2000.
- COSTA, G. da S. et al. Anticorpos anti-leptospiras em soros de ovinos da microrregião de Teresina, PI. IN: CONBRAVET, 31. 2004, São Luís. Anais eletrônicos . . . São Luís, 2004.
- COSTA, F.A.L. et al. CD4+ T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 33:1455-58, 2000.
- DELBEM, A.C.B. et al. Leptospirosis in slaughtered sows: serological and histopathological investigation. **Braz. J. Microbiol.**, 33: 174-77, 2002.
- DOBRINA, A. et al. *Leptospira icterohaemorrhagiae* and leptospire peptidoglycans induce endothelial cell adhesiveness for polymorphonuclear leukocytes. **Infect. Immunol.**, 63: 2995-99, 1995.

- DOCKRELL, D.H. The multiple roles of Fas Ligand in the pathogenesis of infectious diseases. **Clin. Microbiol. Infect.**, 9: 766-79, 2003.
- ELLIS, T.M. et al. Kidney disease of sheep, associated with infection by leptospire of the sejroe serogroup. **Aust. Vet. J.**, 61: 304-5, 1984.
- ELLIS, G.R. et al. Seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo in merino stud rams in south Australia. **Aust. Vet. J.**, 71: 203-6, 1994.
- ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Vet. Clin. North Amer: food animal practice**, 10: 463-78, 1994.
- ELLIS, W.A.; McDOWELL, S. Leptospirosis. IN: DEWI, I.Ap. et al. (Eds.) **Pollution in Livestock Production Systems**. Wallingford (UK). CAB International. 1993. p. 167-86.
- FAINE, S. Guidelines for the control of leptospirosis. WHO, Gêneva, 1982.
- FARR, R.W. Leptospirosis. **Clin. Infect. Dis.**, 21: 1-8, 1995.
- FÁVERO, A.C.M. et al. Sorovares de leptospirosas predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, 32: 613-9, 2002.
- FERREIRA ALVES, V.A. et al. Detection of leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. **J. of Pathol.**, 151: 125-31, 1987.
- HAANWINCKEL, M.C.S.; MEGID, J.; SOUZA, L.C. Avaliação da prova de imunoperoxidase como recurso diagnóstico na leptospirose animal. **Arq. Inst. Biol.**, 71: 293-01, 2004.
- HAMIR, A.N. et al. The prevalence of interstitial nephritis and leptospirosis in 283 raccoons (*Procyon lotor*) from 5 different sites in the United States. **Can. Vet. J.**, 42: 869-71, 2001.
- HEATH, S.E.; JOHNSON, R. Leptospirosis. **JAVMA**, 205: 1518-23, 1994.
- HUGHES, J. Apoptosis in tubulointerstitial renal diseases. **Nephrol. Dial. Transplant.**, 15 (suppl): 55-7, 2000.
- JO, S.K. et al. A-MSH decreases apoptosis in ischaemic acute renal failure in rats: possible mechanism of this beneficial effect. **Nephrol. Dial. Transplant.**, 16: 1583-91, 2001.
- JULIANO, R.S. et al. Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia-GO. **Ciência Rural**, 30: 857-62, 2000.
- LANGONI, H. et al. Pesquisa de aglutininas antileptospíricas em soros de ovinos no Estado de São Paulo, Brasil, utilizando provas de macroaglutinação em placa e soroaglutinação microscópica. **R. bras. Med. Vet.**, 17: 264-68, 1995.

LEON-VIZCAINO, L.; MENDOZA, M.H.de; GARRIDO, F. Incidence of abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, 10: 149-53, 1987.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, 14: 296-26, 2001.

LILENBAUM, W. Leptospirosis on animal reproduction: IV. Serological findings in mares from six farms in RJ, BR (1993-1996). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, 35: 61-3, 1998.

LIN, C-L. et al. Leptospirosis associated with hypokalaemia and thick ascending limb dysfunction. **Nephrol. Dial. Transplant.**, 14: 193-95, 1999.

MACEDO, N. A. Aglutininas anti-leptospira em soros humanos do Estado do Piauí, com particular referência aos aspectos ocupacionais, 1994 a 1996. (Doutorado. Tese) Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 1997. 123p.

MARINHO, M. et al. Resposta humoral, recuperação bacteriana e lesões histológicas em camundongos geneticamente selecionados para bons e maus produtores de anticorpos e balb/c, frente à infecção por *L.interrogans* sorovar icterohaemorrhagiae. **Pesq. Vet. Bras.**, 23: 5-12, 2003.

MENÈ, P.; AMORE, A. Apoptosis: potential role in renal disease. **Nephrol. Dial. Transplant.**, 13: 1936-43, 1998.

MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlation with virulence. **Infect. Immunol.**, 65: 729-38, 1997.

MERIEN, F. et al. In vivo apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. **FEMS Microbiol. Letters**, 169: 95-02, 1998.

MILAS, Z. et al. The role of myomorphous mammals as reservoirs of leptospira in the pedunculate oak forests of Croatia. **Veteerinarski Arhiv.**, 72: 119-29, 2002.

OLIVEIRA, R.C. et al. Diagnóstico laboratorial da leptospirose em um cão utilizando diferentes técnicas. **Arq. Inst. Biol.**, 72: 111-13, 2005.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp in humans. **Microbes and infection**, 2: 1265-76, 2000.

RIET-CORREA, F.; LEMOS, R.A.A. Leptospirose. IN: RIET-CORREA, F. et al. (Eds.) **Doenças de ruminantes e equinos**. 2. ed., São Paulo: Varela, v.1, 426p., 2001.

ROSETTI, C.A. et al. Comparison of three diagnostic techniques for the detection of leptospire in the kidneys of wild house mice (*Mus musculus*). **Pesq. Vet. bras.**, 24: 6-10, 2004.

SAGLAM, Y.S.; TEMUR, A.; ASLAN, A. Detection of leptospiral antigens in kidney and liver of cattle. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.**, 110: 75-7, 2003.

- SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P. de. Presença de aglutinina antileptospira em soro de ovinos e caprinos do Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, 30: 93-8, 1973.
- SAVILL, J. Apoptosis and the kidney. **J. Amer. Soc. Nephrol.**, 5: 12-1, 1994.
- SCANZIANI, E.; SIRONI, G.; MANDELLI, G. Immunoperoxidase studies on leptospiral nephritis of swine. **Vet. Pathol.**, 26: 442-4, 1989.
- SCHÖNBERG, A. et al. Positive PCR for *Leptospira* spp in a sow from a German herd presenting animals with MAT titres for *L. interrogans* serovar Bratislava. **Arq. Inst. Biol.**, 72: 117-20, 2005.
- SITPRIJA, V. et al. Pathogenesis of renal disease in leptospirosis: clinical and experimental studies. **Kidney Intern.**, 17: 827-36, 1980.
- SITPRIJA, V.; LOSUWANRAK, T.; KANJANABUCH, T. Leptospiral nephropathy. **Sem. in Nephrol.**, 23: 42-8, 2003.
- TESCH, G.H.; SCHWARTING, A.; KINOSHITA, K. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis. **J. Clin. Invest.**, 103: 73-0, 1999.
- THOMAS, M.E. et al. Proteinuria induces tubular cell turnover: A potential mechanism for tubular atrophy. **Kidney Intern.**, 53: 890-98, 1999.
- TISHER, C.C.; BRENNER, B.M. **Renal pathology: with clinical and functional correlations**, 2. ed., v.1, Philadelphia: J.B. Lippincott Co., 1994, 978p.
- TRAP, D.; GARIN-BASTUJI, B. Leptospirosis in sheep. **B. Mens. Soc. Vet. Prat. France.**, 72: 283-92, 1988.
- VANASCO, N.B. et al. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. **Prev. Vet. Med.**, 60: 227-35, 2003.
- VASCONCELLOS, S. A. Leptospirose. **O Biológico**, 59: 29-32, 1997.
- ZAMORA, J.; RIEDEMANN, S.; TADICH, N. A serological survey of leptospirosis in sheep in Chile. **Rev. Latinoamer. Microbiol.**, 41: 73-6, 1999.
- YANG, C-W.; WU, M-S.; PAN, M-J. Leptospirosis renal disease. **Nephrol. Dial. Transplant.**, 16 (suppl 5): 73-7, 2001.
- YENER, Z.; KELES, H. Immunoperoxidase and histopathological examinations of leptospiral nephritis in cattle. **J. Vet. Med. A**, 48: 441-47, 2001.

CAPÍTULO 1

Infecção por Leptospiras em Ovinos e Caracterização da Resposta Inflamatória Renal¹

Infection for Leptospire in Ovine and Characterization of Inflammatory Renal Response

Sônia Maria de Carvalho², Nicodemos Alves de Macedo³, Francisco Assis Lima Costa³

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

²Mestre em Ciência Animal – CCA-UFPI

³Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí
Campus da Socopo
64046-550 Teresina - PI

RESUMO.-A leptospirose é uma doença grave de distribuição mundial que afeta o homem e os animais. A infecção em animais, geralmente, é inaparente, ou os sintomas quando presentes são similares a outras infecções. Neste estudo foram colhidos soros de 119 ovinos e os respectivos rins durante abate em feiras livres no município de Teresina-Piauí. Pela técnica de soroglutinação microscópica (SAM) obteve-se 34 amostras sorológicas positivas para um ou mais sorovares de *Leptospira interrogans*, com taxa de ocorrência de 28,57% de anticorpos anti-leptospiras, sendo 23 casos de infecção simples e 11 infecção múltipla. Dentre os sorovares patogênicos, o de maior ocorrência foi o autumnalis (29,41%). A análise histopatológica revelou nefrite intersticial em 33 (71,74%) animais infectados e em 9 (19,56%) não infectados. Lesões tubulares foram observadas em 20 (55,55%) animais infectados e em 2 (20%) não infectados. A presença de leptospiras em túbulos foi observada em 8 (22,22%) das 36 amostras positivas. Nos animais infectados, o infiltrado inflamatório era significativamente mais evidente na região córtico-medular que nas regiões cortical e medular ($p = 0,0001$), mas não existia diferença entre animais infectados e não infectados. Cilindros hialinos nos túbulos proximais estavam presentes em quantidade significativamente maior nos animais infectados comparado aos não infectados ($p = 0,0001$). Em glomérulos, foi observada lesão discreta, caracterizada, principalmente, por hiperplasia focal, global e segmentar. Os resultados deste estudo mostram que ovinos infectados por leptospiras apresentam lesões renais túbulo-intersticiais, com presença da bactéria nos túbulos, o que confere aos animais a condição de portadores assintomáticos capazes de disseminar a infecção por eliminação de leptospiras na urina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Leptospirose, sorologia, nefrite intersticial, ovino.

ABSTRACT

Leptospirosis is a serious illness of world-wide distribution that affects the man and the animals. The infection in animals, generally, is asymptomatic, or the symptoms when present

¹ Recebido em

² Mestranda em Ciência Animal, CCA-UFPI(soniacarvalhoet@hotmail.com)

³ Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, CCA-UFPI, Campus Socopo, 64046-550 Teresina-PI.

are similar to other infections. In this study serum of 119 ovines and the respective kidneys were collected during slaughter in free fairs in the city of Teresina-Piauí. For the Microscopic Agglutination Test (MAT) 34 positive serologically samples for one or more serovar of *Leptospira interrogans* were obtained, with occurrence of 28.57% of antibodies anti-leptospira, being 23 cases of simple infection and 11 of multiple infection. The serovar pathogenic, of greater occurrence it was the autumnalis (29.41%). The pathological analysis showed interstitial nephritis in 33 (71.74%) infected animals and in 9 (19.56%) not-infected animals. Tubular lesions were observed in 20 (55.55%) infected animals and in 2 (20%) not-infected. The presence of leptospira in tubules was observed in 8 (22.22%) of the 36 positive samples. In the infected animals, the infiltrate inflammatory was significantly more evident in the cortical-medullary region than in the cortical and medullary ($p = 0.0001$), but difference between infected and not infected animals did not exist. Hyalines casts in the proximal tubules were significantly greater in infected animals compared with to the not-infected ($p = 0,0001$). In glomeruli, discrete injury was observed, it was characterized, mainly for focal, global and segmental hypercellularity. The results of this study show that ovines infected for leptospira they present renal tubulo-interstitial lesion, with presence of the bacteria in the tubules, what it confers to the animals the condition of assymptomatic carrier capable to spread the infection for elimination of leptospira in the urine.

INDEX TERMS: Leptospirosis, serology, interstitial nephritis, ovine

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença grave de distribuição mundial que afeta o homem e os animais (Juliano et al. 2000, Plank & Dean 2000). A infecção em animais, geralmente, é inaparente, ou os sintomas, quando presentes, são similares a outras infecções, o que torna difícil o reconhecimento da doença. O diagnóstico depende de uma combinação de testes, envolvendo a demonstração de leptospiras por microscopia, isolamento por meio de cultivo, e teste sorológico com destaque para a soroaglutinação microscópica (SAM) por ser sorovar específico (Vasconcellos, 2004).

As leptospiras têm como órgão preferencial de localização, os rins, onde provocam lesões severas e de onde são eliminadas pela urina para contaminar o ambiente e serem transmitidas para o homem e outros animais (Levett 2001).

A nefropatia causada pela leptospirose tem sido estudada de modo mais consistente no homem (Sitprija et al. 1980), mas, nos animais e, especialmente, em ovinos, quase nada se sabe sobre os padrões morfológicos da lesão e sobre sua patogenia.

O ovino por ser um animal de produção bastante explorado na região nordeste do Brasil, tem importância econômica destacada na economia regional, porque muitas famílias sobrevivem dessa atividade. O fato de leptospiros se localizarem e se multiplicarem nos rins, coloca em risco a sanidade de todo o rebanho e a saúde do homem, pois a mesma é uma zoonose severa transmitida via contaminação ambiental pela urina de animais infectados (Levett 2001). Lesões renais túbulo-intersticiais são consideradas as alterações patológicas básica da doença (Maxie 1993). Nefrite intersticial crônica (Oliveira et al. 2005) é caracterizada por infiltrado de linfócitos, plasmócitos (Yener & Keles 2001, Saglam et al. 2003), macrófagos (Rossetti et al. 2004) e raros eosinófilos (Scanziani et al. 1989). Degeneração e necrose de células epiteliais tubulares ocorre em túbulos proximais e distais, mas, as alterações decorrentes da infecção envolvem primariamente os túbulos proximais (Ellis et al. 1984, Yener & Keles 2001, Delbem et al. 2002, Saglam et al. 2003). Essas alterações se manifestam pela urinálise anormal, freqüentemente mostrando proteinúria e cilindros hialinos no lume dos túbulos (Saglam et al. 2003, Rossetti, et al. 2004, Haanwinckel et al. 2004). A lesão túbulo-intersticial e fibrose têm um papel crítico na progressão da doença renal, de modo que é impressionante a correlação entre a severidade da alteração patológica túbulo-intersticial e o subsequente desenvolvimento e progressão da falha renal crônica (Hughes 2000).

O presente trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de infecção por leptospiros em ovinos, caracterizar a natureza e extensão das lesões renais e associa-las com a infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados 119 ovinos de ambos os sexos, adultos, provenientes de diversos municípios do Estado do Piauí, abatidos no município de Teresina para consumo, no período de junho de 2003 a março de 2004.

O diagnóstico de leptospirose foi realizado por soroaglutinação microscópica em placa (Galton et al. 1965), no Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo.

Amostras de sangue foram coletadas da veia jugular em tubos vacutainer de 10 ml, sem anti-coagulante. No laboratório, o soro obtido foi armazenado em tubo eppendorf e estocado a -20°C até o processamento. Amostras de urina foram coletadas da bexiga com seringa e agulhas descartáveis de 5 ml, colocadas em tubos de ensaio de 10 ml e armazenadas a -20°C até a realização da análise laboratorial.

Foi utilizada a técnica de soroaglutinação microscópica (Galton et al 1965), com coleção de antígenos vivos que incluiu 25 variantes sorológicas (sv) de leptospiras patogênicas e duas saprófitas. Amostras que apresentaram reação de aglutinação com título de 100 ou superior foram consideradas positivas. O sorovar registrado foi o que apresentou maior título; na eventualidade do maior título ser apresentado para dois ou mais sorovares, o animal foi excluído da análise de ocorrência, mas não da casuística das alterações histopatológicas.

Foram realizadas dosagens bioquímicas no soro utilizando kits LABTEST (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil): creatinina (catálogo nº 35), uréia (catálogo nº 27-500). A concentração de proteína e creatinina na urina foi avaliada com o uso do kit LABTEST (catálogo nº 36 e 35, respectivamente).

Imediatamente ao abate dos animais, foi realizado exame macroscópico minucioso dos rins e colhidos fragmentos da regiões cortical e medular, fixados em solução de Dubosq-Brasil por 60

minutos e posteriormente mantidos em formol neutro a 10%, tamponado com fosfato, 0,01 M pH 7,4 (formol tamponado) até o processamento.

Os fragmentos de rim fixados em formol tamponado foram processados seguindo técnicas de rotina e os cortes corados com hematoxilina-eosina (H-E), ácido periódico de Schiff (PAS), tricrômico de Masson (TM), ácido periódico prata metanamine (PAMS) e Warthin-Starry (WS). Na avaliação histopatológica, ao microscópio óptico, foram analisadas as alterações utilizando-se as diferentes colorações histoquímicas. A intensidade das lesões foi classificada semi-quantitativamente, numa escala de 0 a 5 em que 0 = normal, 1 = mínima, 2 = média, 3 = moderada, 4 = moderadamente severa, 5 = severa (Pirani, 1994).

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

RESULTADOS

Do total de 119 amostras de soro analisadas pela prova de SAM, 34 foram reagentes para um ou mais sorovar de *Leptospira interrogans*, obtendo-se uma ocorrência de anticorpos anti-leptospira em 28,57% dos animais..

Dentre os animais reagentes, 23 apresentaram reação para um único sorovar, o de maior ocorrência foi patoc (13/34), seguido de autumnalis (5/34), castellanis (3/34) e grippotyphosa e pyrogenes (1/34). Todos os animais apresentaram títulos de anticorpos iguais ou inferiores a 400, com exceção de um animal que apresentou título de 800.

Onze animais reagiram para mais de um sorovar. Desses, sete com aglutinação para dois sorovares, dois para três e dois para cinco. Nestes casos, considerou-se como infectante aquele

em que a reação apresentou maior título. Em razão desse critério, em dois animais não foi possível determinar qual o sorovar era o infectante.

Os animais que reagiram ao sorovar patoc corresponderam a 38,24% (13/34), seguidos dos sorovares patogênicos autumnalis, 29,41% (10/34), castellonis, 17,65% (6/34), grippothyphosa 5,88% (2/34), pyrogenes 2,94% (1/34), butembo 2,94% (1/34) e pomona 2,94% (1/34) (Tab. 1). Outros sorovares reagentes foram: bratislava, australis, hebdomadis, hardjo (hardjo bovis), sentot e cynopteri.

Tabela 1. Distribuição de títulos de anticorpos em animais reagentes, segundo o sorovar infectante*, para *L. interrogans*, ovinos, Estado do Piauí.

Sorovar \ Título	100	200	400	800	1.600	3.200	Total (%)
Patoc	7	3	3	0	0	0	13 (38,24%)
Autumnalis	2	2	4	0	1	1	10 (29,41%)
Castellonis	1	2	2	1	0	0	6 (17,65%)
Grippothyphosa	1	0	0	1	0	0	2 (5,88%)
Pyrogenes	0	1	0	0	0	0	1 (2,94%)
Butembo	0	1	0	0	0	0	1 (2,94%)
Pomona	1	0	0	0	0	0	1 (2,94%)
Total	12	9	9	2	1	1	34 (100)

* O sorovar registrado foi o que apresentou maior título; na eventualidade do maior título ser apresentado por dois ou mais sorovares, o animal foi excluído da análise.

Em dez casos foram avaliados parâmetros bioquímicos. Desses, sete apresentaram nefrite intersticial, mas os parâmetros bioquímicos estavam dentro dos limites normais, exceto para uréia. As concentrações de creatinina, uréia e proteína na urina são mostrados na tabela 2.

Tabela 2. Alterações renais e análise bioquímica de 10 ovinos sorologicamente reagentes para *L. interrogans*, Estado do Piauí.

Animal n ^o	Nefrite	Creatinina mg/dl		Uréia	Proteína	U _{Pr} :U _{Cr}
		Soro	Urina	mg/dl	mg/dl	
61	2*	1,14	273,28	30,80	19,98	0,07
64	0	1,22	384,58	34,90	38,85	0,10
72	2	0,64	121,38	35,80	53,96	0,44
73	0	1,00	49,00	22,10	6,19	0,13
74	2	0,80	96,60	21,70	16,13	0,17
75	1	1,33	371,28	22,00	82,47	0,22
76	1	0,98	301,98	32,10	45,51	0,15
78	1	0,83	269,08	49,60	23,15	0,09
110	3	0,87	49,28	37,90	25,87	0,52
127	0	0,63	99,68	47,70	4,09	0,04

* = intensidade da lesão (escore): 0= ausente; 1 = mínima; 2 = média; 3 = moderada; 4 = moderadamente severa; 5 = severa. U_{Pr} = concentração de proteína na urina, U_{Cr} = concentração de creatinina na urina. Valores normais de referência (Coles, 1984): Creatinina = 1,2-1,9mg/dl, Uréia = 8-20mg/dl. Valor normal de referência (Garry et al., 1990): U_{Pr}:U_{Cr} = 0,86 ± 0,66

Para a análise das lesões renais, 46 ovinos foram utilizados: 36 com infecção naturalmente adquirida, dos quais 33 (71,74%) apresentaram alterações túbulo-intersticiais e 10 sorologicamente negativos, dos quais nove (19,56%) apresentaram alterações túbulo-intersticiais (Tab.3). Nefrite intersticial, observada em 26 animais infectados, foi caracterizada pela presença de linfócitos, macrófagos, plasmócitos e raros neutrófilos (Fig. 1). A lesão localizava-se, principalmente, na região córtico-medular, mas também na região cortical e medular, de distribuição focal perivascular, periglomerular e peritubular, com intensidade variando de mínima a moderada. O infiltrado inflamatório na região córtico-medular era significativamente mais evidente que nas regiões cortical e medular ($p = 0,0001$, Teste de Kruskal Wallis, Student-Newman-Keuls) (Fig. 2), nos animais infectados. Em glomérulos, foi observada hiperplasticidade, principalmente, focal, global e segmentar. O tufo glomerular apresentava-se lobulado e, em casos raros, constatou-se espessamento segmentar da membrana basal do capilar glomerular (Fig. 3) e do mesângio e presença de material protéico gótico no citoplasma das células epiteliais viscerais e parietais. Observou-se ainda espessamento da cápsula de Bowman e esclerose glomerular. Nos túbulos constatou-se a presença de cilindros hialinos em dez animais

infectados (Fig. 4), necrose de membrana basal (Fig. 5), atrofia (Fig. 6), degeneração hialina goticular, pigmentar e calcificação de túbulos coletores. Fibrose renal foi observada em 3 animais (9,3%) (Fig. 7) e vasculite (Fig. 8) em 5 animais (14,3%).

Nos animais negativos foram observadas alterações renais semelhantes às observadas nos animais positivos; contudo, eram de intensidade mínima, havendo diferença significativa em relação à presença de cilindros hialinos ($p = 0,0001$, Teste de Mann-Whitney) (Fig. 9). Hiper celularidade glomerular e infiltrado inflamatório estavam presentes em ambos os grupos sem diferença significativa.

Tabela 3. Alterações túbulo-intersticiais observadas em rim de 46 ovinos infectados e não infectados por *L. interrogans* abatidos em Teresina, Estado do Piauí.

	SAM \geq 100*	%	Negativos**	%	Total	
Presença de alterações histopatológicas	33	71.74	09	19.56	42	91.30
Ausência de alterações histopatológicas	03	6.53	01	2.17	04	8.70
Total	36	78.27	10	21.73	46	100

* = animais com títulos \geq 100 SAM; ** = animais sorologicamente negativos no SAM; % = porcentagem em relação ao número total de amostras. SAM = Teste de soroaglutinação microscópica.

Em oito casos, leptospira foi detectada através da técnica de Warthin-Starry somente no lume de túbulos proximais; apresentavam-se agrupadas em massas de cor negra aderida à superfície das células epiteliais tubulares(Fig. 10) e livres no lume.

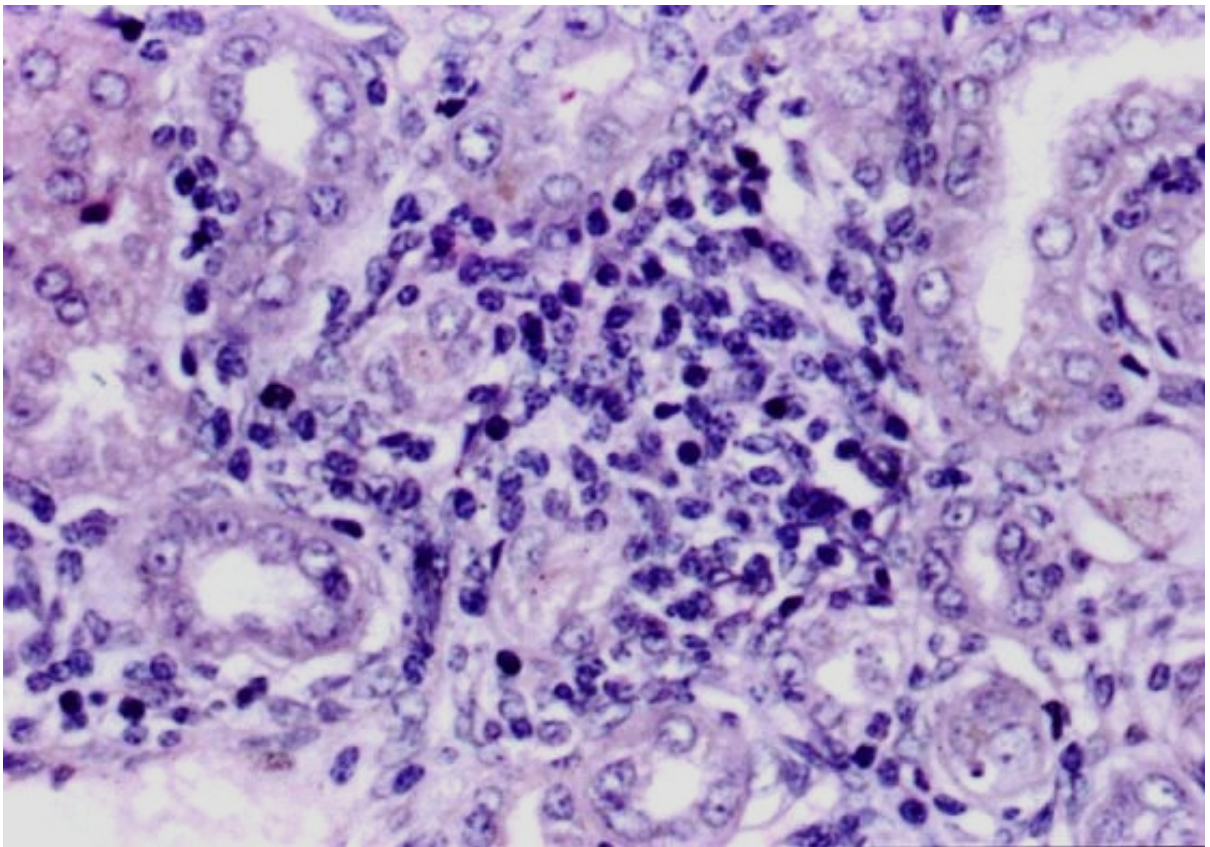


Figura 1. Rim. Ovino infectado naturalmente por *L. interrogans*. Infiltrado inflamatório de células mononucleares. H-E. 140x.

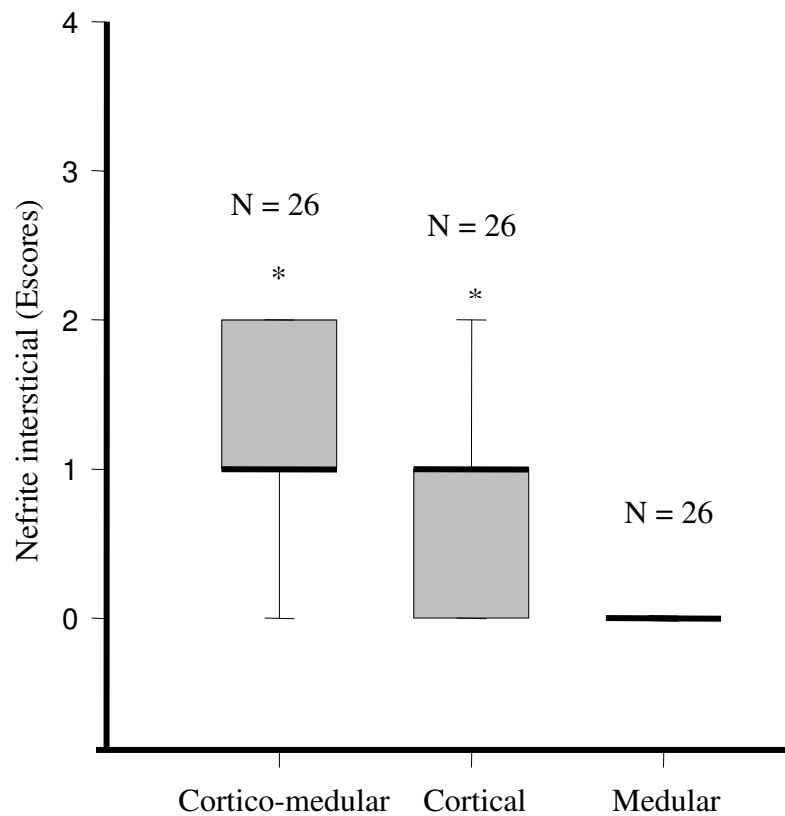


Figura 2. Análise semi-quantitativa da intensidade da presença de nefrite intersticial (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em ovinos infectados por *Leptospira interrogans*. N = N^o de animais por grupo. * p = 0,0001 em relação a cortical e medular (Teste de Kruskal Wallis e Student-Newman-Keuls).

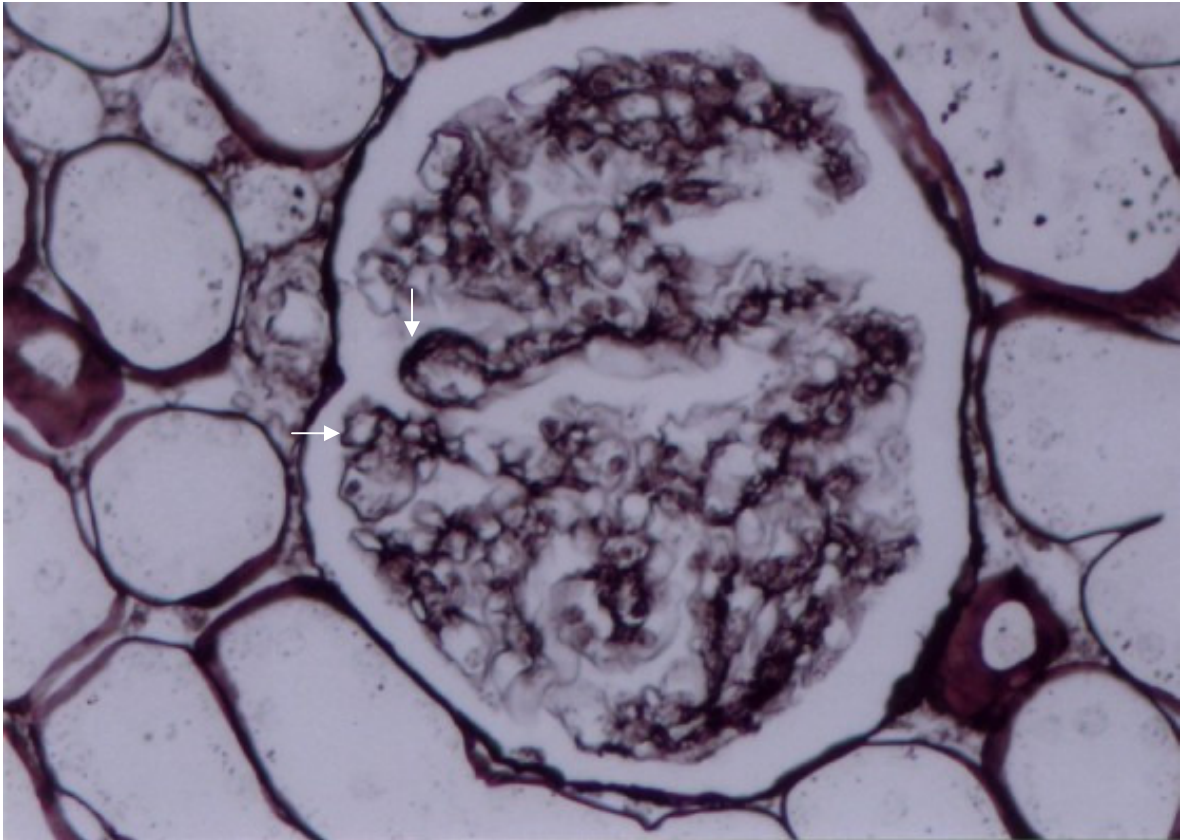


Figura 3. Rim. Ovino infectado naturalmente por *L. interrogans*. Espessamento da membrana basal do capilar glomerular. PAMS. 140x.

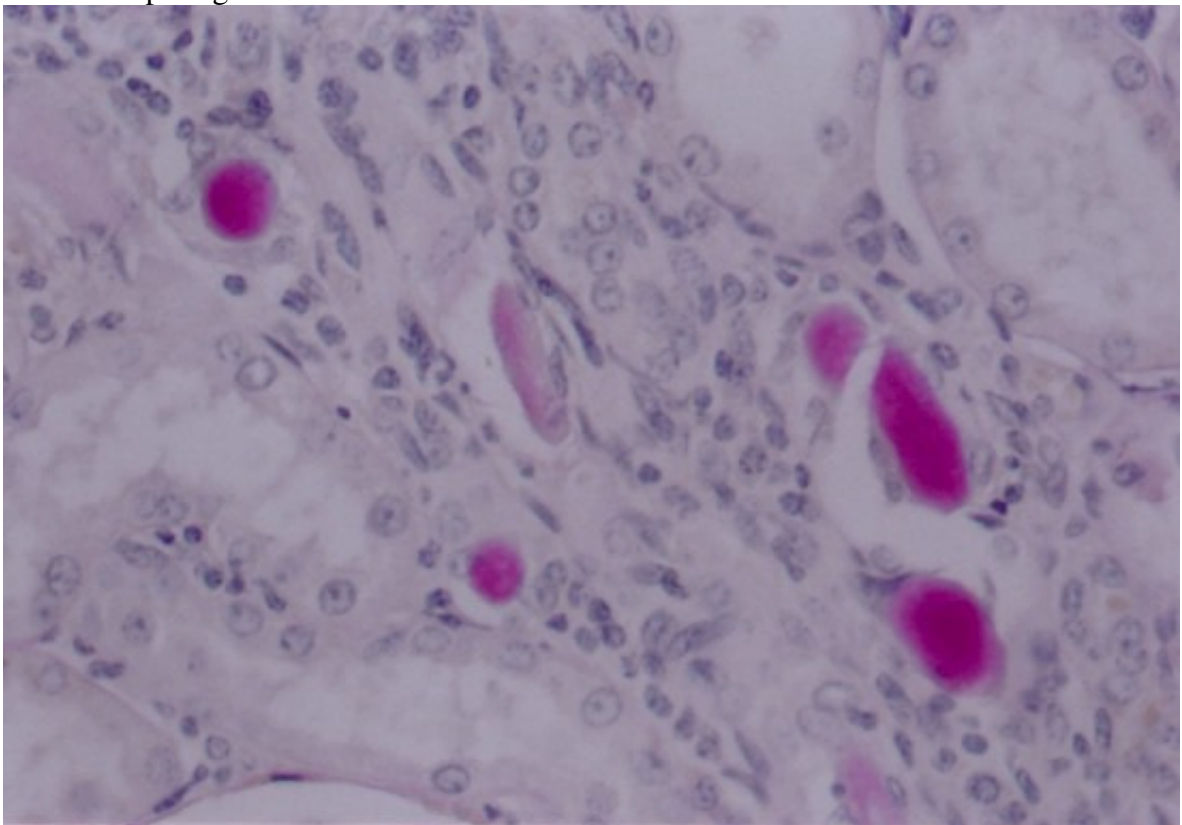


Figura 4. Rim. Ovino infectado naturalmente por *L. interrogans*. Presença de cilindros hialinos nos túbulos proximais. PAS. 140x.

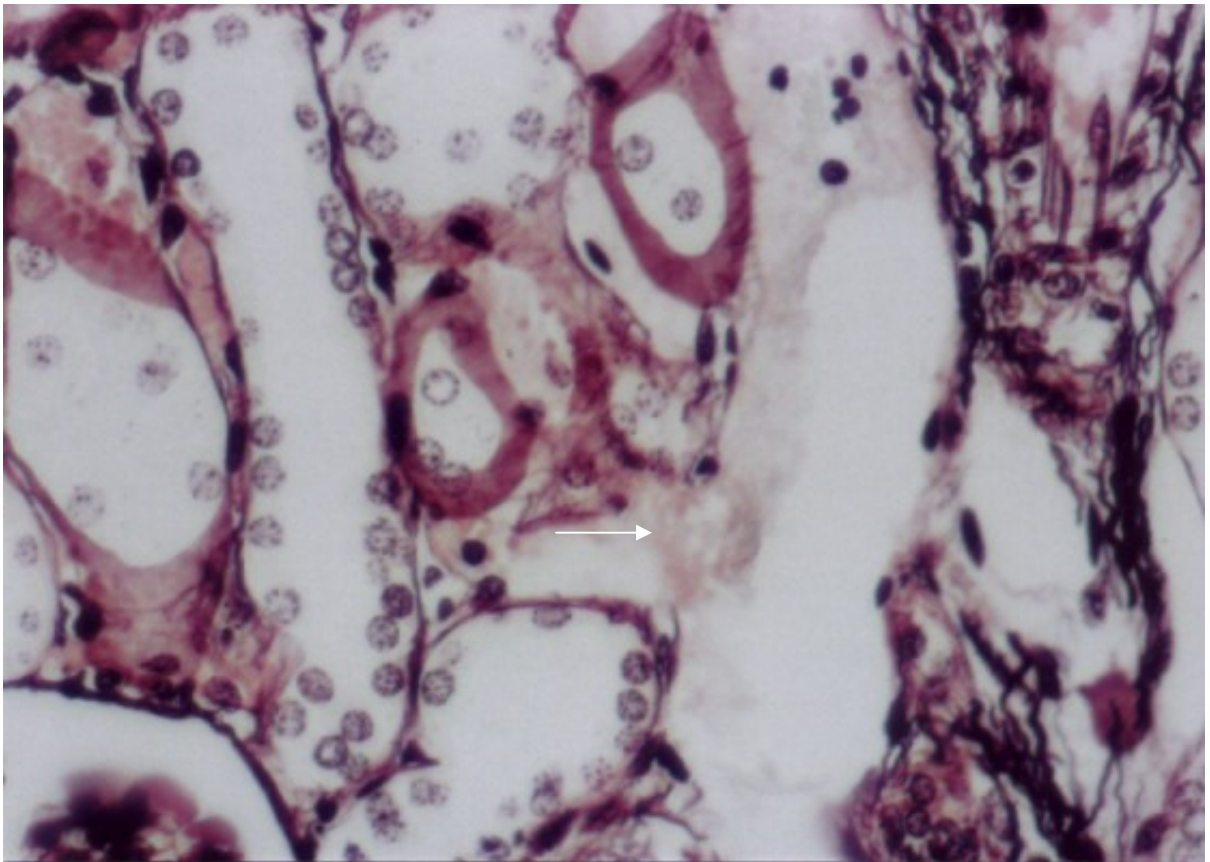


Figura 5. Rim. Ovino infectado naturalmente por *L. interrogans*. Necrose tubular. PAMS. 140x.

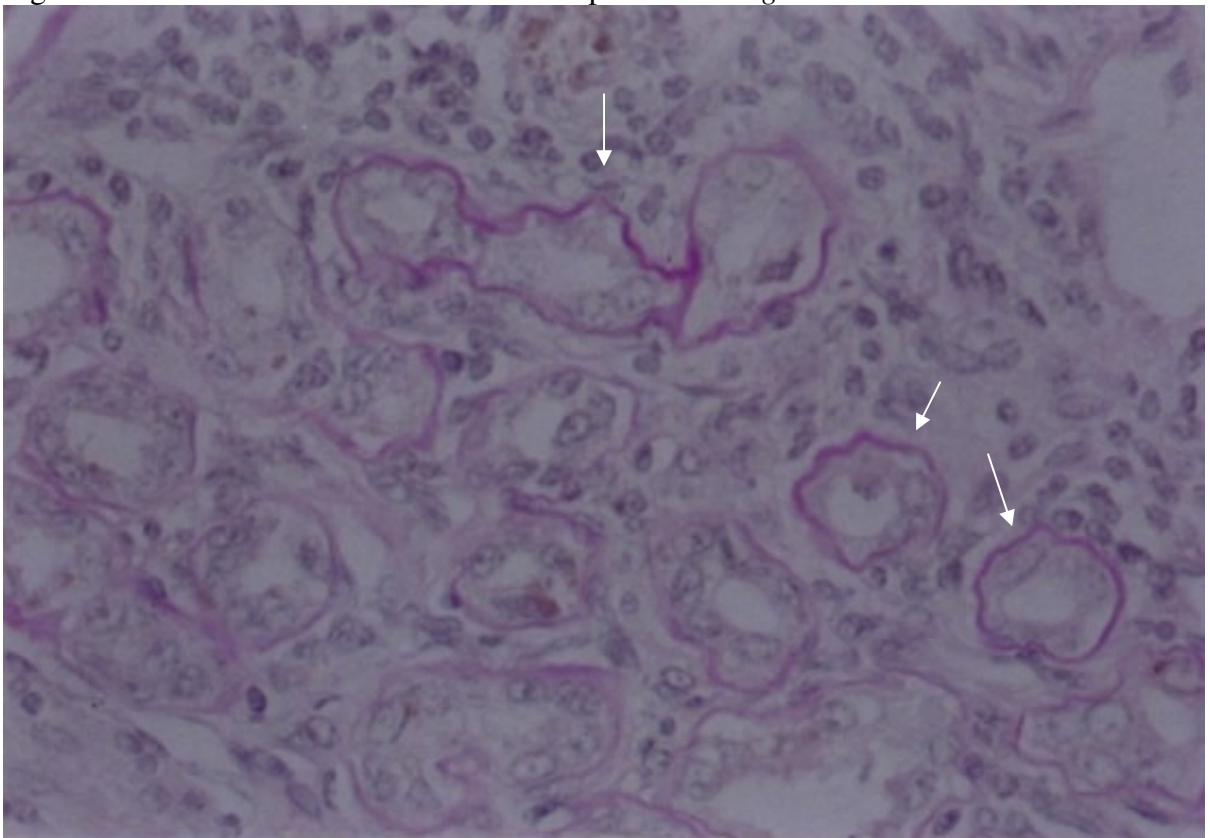


Figura 6. Rim. Ovino infectado naturalmente por *L. interrogans*. Atrofia tubular. PAS. 140x.

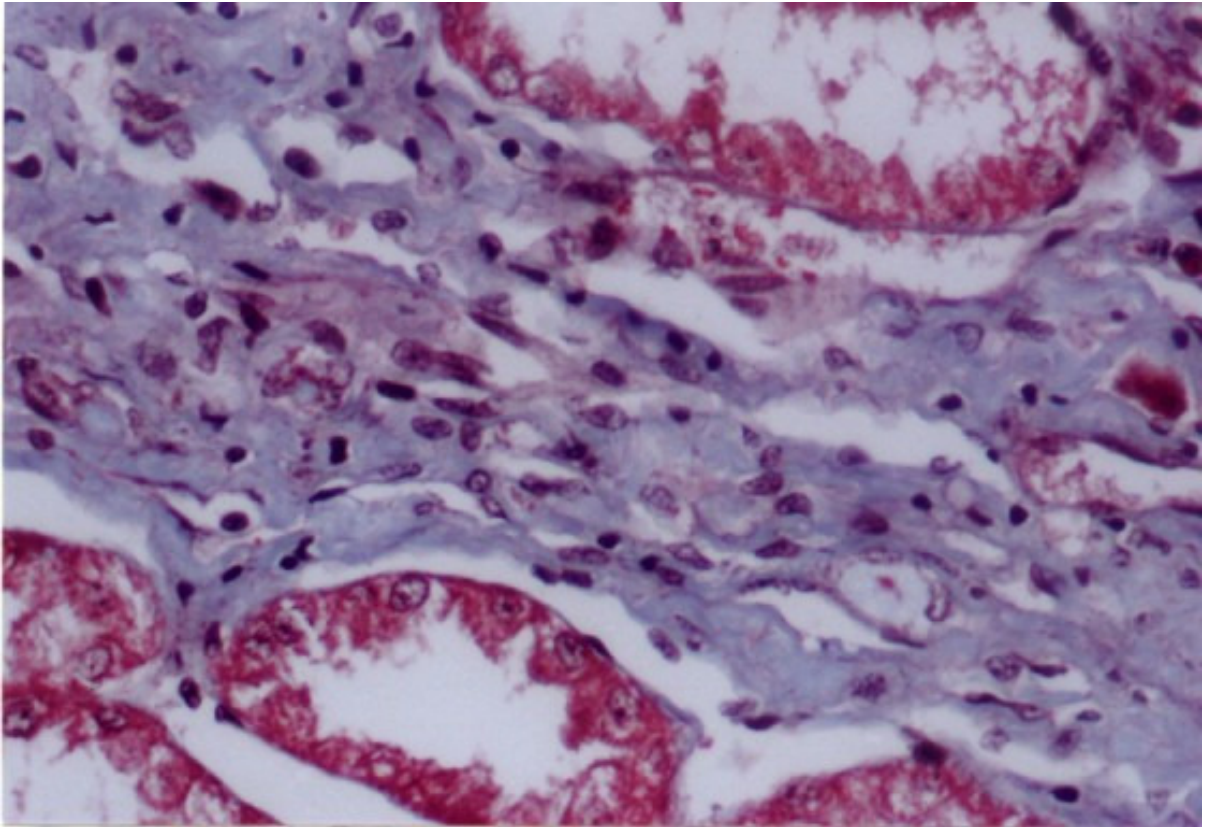


Figura 7. Rim. Ovino infectado naturalmente por *L. interrogans*. Proliferação de tecido conjuntivo (fibrose) na região córtico-medular. Tricrômio de Masson. 140x.

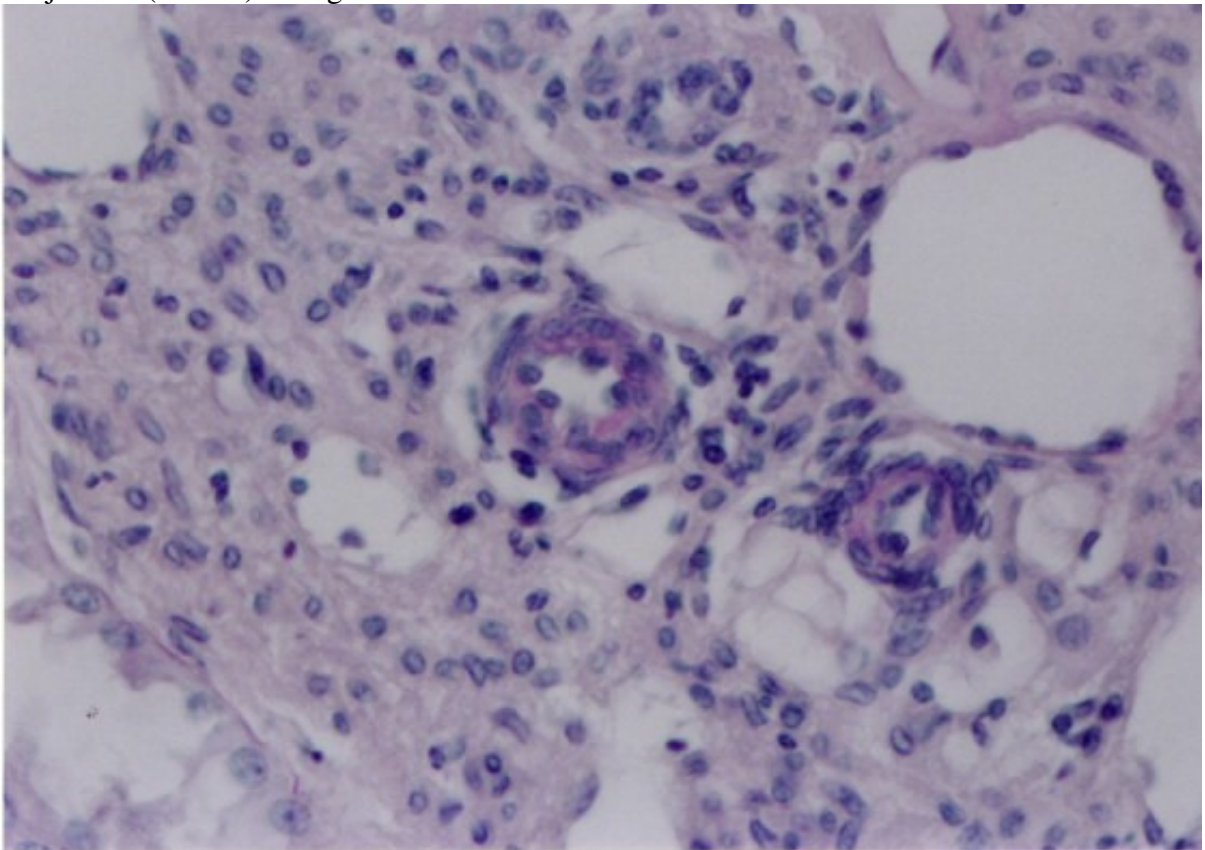


Figura 8. Rim. Ovino infectado naturalmente por *L. interrogans*. Presença de células inflamatórias na parede de arteríolas (vasculite) da região córtico-medular. H-E. 140x

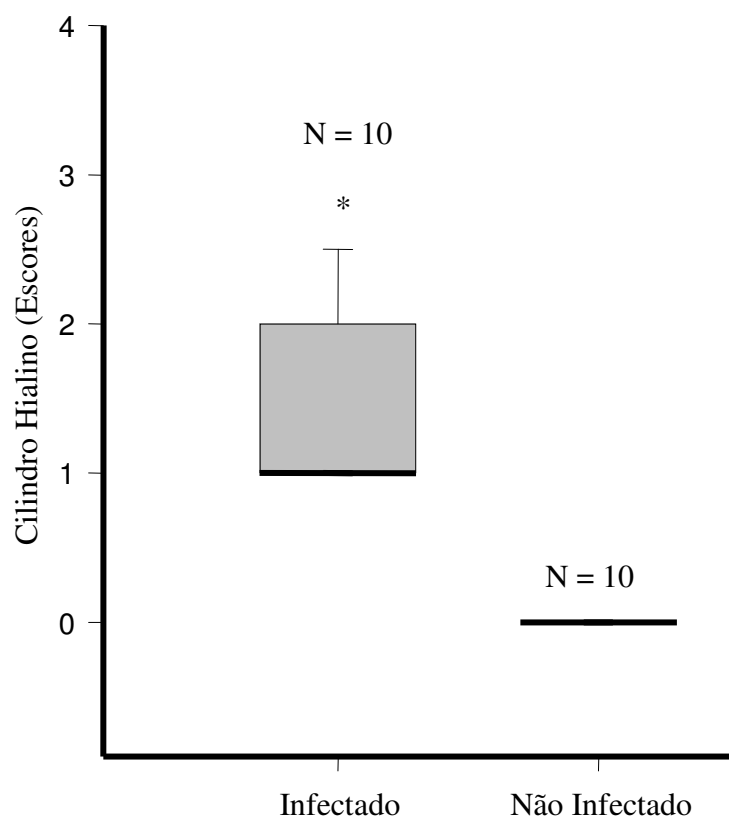


Figura 9. Análise semi-quantitativa da intensidade da presença de cilindros hialinos (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em ovinos infectados por *Leptospira interrogans* e controle não infectados. N = N^o de animais por grupo. * p = 0,00 em relação ao grupo controle (testes de Mann-Whitney).

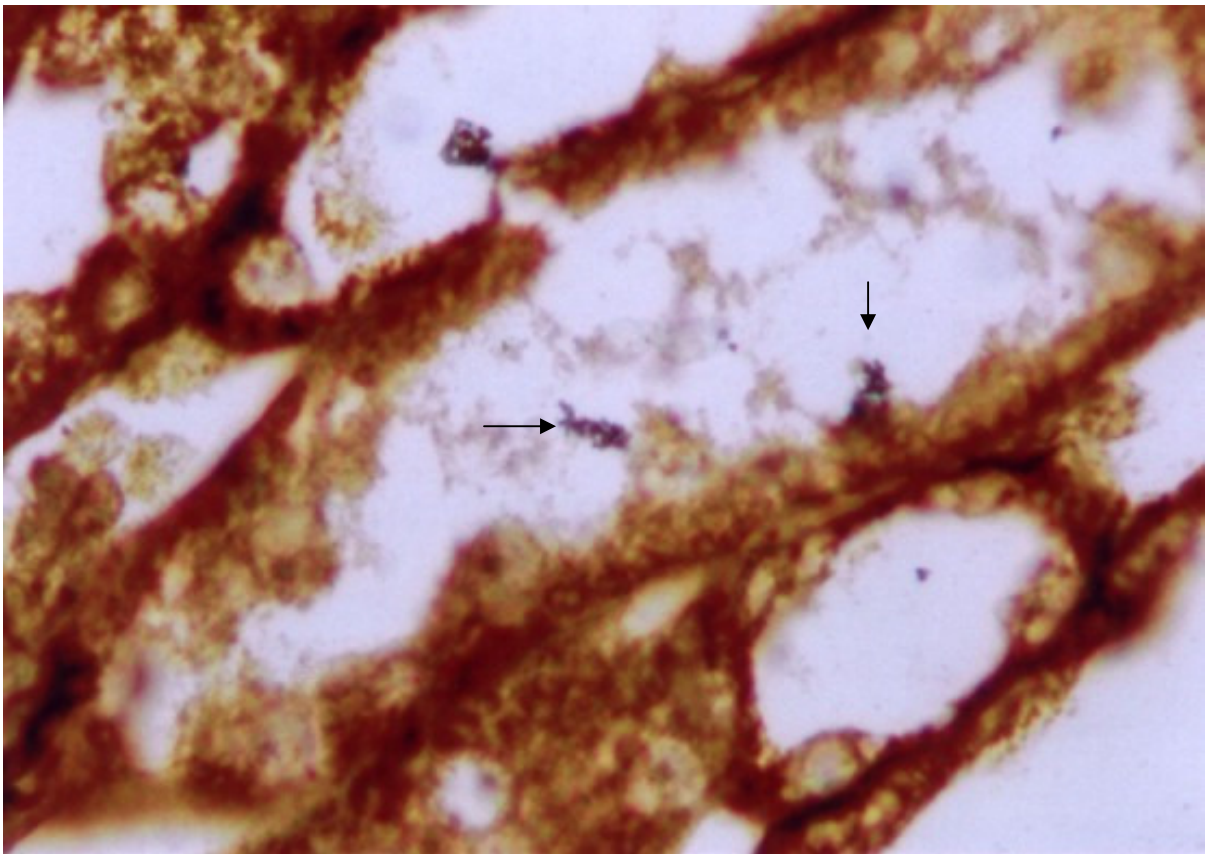


Figura 10. Rim. Ovino naturalmente infectado por *Leptospira interrogans*. Presença de leptospira aderida às células epiteliais tubulares, em forma de aglomerado. Warthin Starry. 350x.

DISCUSSÃO

Apesar da pesquisa de anticorpos anti-leptospira em animais de abatedouro, não constituir parâmetro dos mais adequados para determinar a prevalência da doença em uma área ou região, em função, geralmente, do limitado número de animais, a mesma permite o registro seguro da infecção, bem como os sorovares de *Leptospira* sp. de maior ocorrência na região de origem dos animais. Neste contexto pode-se assegurar que 28,57% de um total de 119 ovinos oriundos de diversos municípios do Estado do Piauí, incluindo alguns da região semi-árida, estão infectados por *Leptospira interrogans*. A resposta sorológica observada, provavelmente, reflete exposição natural à infecção, porque a vacinação de ovinos não é praticada no estado. É importante destacar que esses animais eram abatidos para consumo em feiras livres, o que de certo modo, coloca o homem em estreito contato com produtos potencialmente capazes de transmitir a infecção, durante o manuseio da carcaça. Outros estudos registram percentual de 34,26% em ovinos do Rio Grande do Sul (Herrmann et al. 2004); 8,6% (Barbudo Filho et al. 1999) e 44,65% (Langoni et al. 1995) em São Paulo; 6,1% na Itália (Ciceroni et al. 2000) e 23,5% na Nigéria (Agunloye 2002). Estes dados revelam que a infecção por leptospira em ovinos é variável, dependendo da região. Como observado no presente estudo, mesmo no semi-árido, região de clima seco e altas temperaturas, ocorre infecção por leptospiros em ovinos, provavelmente devido à restrição a água, que obriga os animais a se concentrarem nos poucos locais de retenção de águas da chuva (aguadas, barreiros), contaminadas por urina de outros animais, inclusive roedores silvestres.

As evidências sorológicas obtidas neste estudo indicam maior importância para os sorovares patogênicos autumnalis (29,41%), castellanis (17,65%), grippothyphosa (5,88%), pyrogenes (2,94%), butembo (2,94%) e pomona (2,94%), presentes em 21 animais em infecção simples e múltiplas, enquanto o único sorovar saprófita (patoc) diagnosticado estava presente em 13 animais em infecção simples. O sorovar autumnalis foi o de maior ocorrência. Resultados

similares ou percentualmente superiores ou inferiores, foram encontrados em outros estudos (Langoni et al. 1995, Barbudo Filho et al. 1999, Ciceroni et al. 2000, Agunloye 2002, Herrmann et. 2004) revelando que o diagnóstico de sorovares infectantes para ovino varia também na dependência da região.

Os títulos sorológicos encontrados 100, 200, 400, 800, 1.600 e 3.200, sugerem infecção crônica nos três primeiros e recentes nos últimos. A ausência de sinais clínicos nos animais com anticorpos anti-leptospira, sugere infecção inaparente e os sorovares infectantes parecem ser bem tolerados.

Ao lado do estudo sorológico avaliou-se os níveis de creatinina sérica, apresentando-se, os mesmos, dentro dos valores normais sugeridos por Coles (1984) e Carlson (1993). Contudo, níveis considerados elevados de creatinina foram encontrados em ovinos infectados (Ellis et al. 1984). Desse modo, a normalidade dos níveis de creatinina no soro dos animais, indica que a lesão ainda não havia comprometido uma área tecidual suficiente para determinar alteração da função renal, a ponto de promover retenção de creatinina. Aliás, a intensidade da lesão variava de mínima a moderada.

O nível de uréia estava acima da variação normal sugerida por Coles (1984) e Carlson (1993), embora o nitrogênio sanguíneo derivado da uréia (BUN) seja influenciado mais diretamente por fatores nutricionais, comparativamente à creatinina. O BUN é indicador menos confiável de função renal em ruminantes, porque o nitrogênio derivado da uréia é metabolizado pela microbiota rumenal (Carlson 1993).

Apesar de ter sido observado proteína na urina, este achado isoladamente não pode ser traduzido como proteinúria, visto que proteína pode ser detectada sem que necessariamente haja presença de lesão renal (Coles 1984, Carlson 1993). Proteinúria em animais é determinada normalmente pelo índice proteína/creatinina na urina ($U_{Pr}:U_{CR}$). No presente estudo, a taxa

U_{Pr}:U_{CR} apresentou-se dentro dos valores normais ($0,86 \pm 0,66$) sugeridos por Garry et al. (1990).

Em 42 (91,30%) animais foram observadas alterações histopatológicas no rim. As lesões localizavam-se tanto na região cortical, quanto na região córtico-medular e medular. Sabe-se que o local preferencial de lesão renal na leptospirose é no espaço túbulo-intersticial, com maior evidência de comprometimento nos túbulos proximais (Sitprija et al. 1980, Barnett et al. 1999), onde as leptospiros aderem e liberam toxinas, incluindo produtos da lise do microrganismo, que danificam as células epiteliais tubulares (Ferreira Alves et al. 1987). Contudo, apesar de existir maior intensidade do processo inflamatório nos animais positivos, não existia diferença significativa em relação aos animais não infectados. Observou-se, também, que o comprometimento intersticial era significativamente maior na região córtico-medular quando comparado às regiões cortical e medular ($p = 0,0001$). Nos túbulos renais de oito animais, constatou-se, pela coloração de Warthin Starry, a presença de leptospiros com a característica conformação filamentosa contorcida, em aglomerados ou em formas únicas, de coloração escura, tanto aderida ao epitélio quanto presente no lume tubular, o que sugere que ovinos infectados naturalmente por sorovares de *Leptospira interrogans*, sem manifestação clínica da doença, podem eliminar leptospira pela urina e, assim, constituir-se em reservatório assintomático capaz de contaminar o ambiente, o homem e outros animais, como é observado em outras espécies (Faine 1982). O percentual de amostras de rim com leptospiros (22,22%) é inferior ao observado por Scanziani et al. (1989) em suínos, Yener & Keles (2001) em bovinos, Rossetti et al. (2004) em camundongos e superior ao observado por Saglam et al. (2003) em bovinos. Cabe enfatizar que a detecção de leptospiros por técnicas de coloração pela prata não é um método muito sensível, conforme depreende-se da literatura consultada (Ferreira Alves et al. 1987, Grégoire et al. 1987, Hamir et al. 2001). Desse modo, estudos estão em andamento para aplicação de

técnicas mais sensíveis de detecção de leptospiras em tecido renal desses animais, como imunistoquímica e reação em cadeia de polimerase (PCR).

Verificou-se que lesões túbulo-intersticiais estavam presentes em 71,74% dos animais com sorologia positiva e em 19,56% dos animais com sorologia negativa para infecção por leptospiras, o que demonstra que a ocorrência de lesões renais era 3,66 vezes maior nos animais infectados quando comparados aos não infectados. Este dado é importante do ponto de vista da patologia, pois confirma a associação entre a infecção por leptospiras e injúria renal em ovinos aparentemente saudáveis e indica o grau de severidade da lesão. Observou-se, também, a presença de cilindros hialinos em túbulos da região cortical e medular em 30,30% dos animais infectados, demonstrando que estava ocorrendo um desequilíbrio no processo de filtração e reabsorção de proteína, mas, ainda, sem manifestação de alteração da função renal. Conforme demonstrado na análise bioquímica do sangue e urina, os valores estavam dentro do limite de normalidade, apesar da presença de lesões, o que sugere que alteração da função renal somente se manifesta quando 2/3 ou 3/4 do tecido de ambos os rins apresenta-se comprometido (Carlson, 1993, Tisher & Brenner, 1994). No presente estudo a intensidade do comprometimento túbulo-intersticial variou de mínimo a moderado.

Vasculite foi observada apenas em cinco animais positivos (14,3%). Esta lesão é citada como parte do quadro patológico da leptospirose em sua fase aguda, portanto, normalmente não é observada na fase crônica (Plank & Dean 2000, Levett 2001, Sitprija et al. 2003). Entretanto, esta lesão estava presente nos animais que apresentavam sorologia e quadro anátomo-patológico típico de animais na fase crônica da infecção.

O processo inflamatório observado foi classificado como crônico, pois era caracterizado pela presença de macrófagos, linfócitos, plasmócitos e fibrose intersticial, sem evidência de edema. Aliás, títulos de anticorpos anti-leptospira de 100 a 400 caracterizam a infecção na fase

crônica (Ellis 1994, Ciceroni et al. 2000), como observado neste estudo. Ao lado disso, sabe-se que leptospiras se localizam nos rins após o estágio agudo inicial (Marinho et al. 2003).

As lesões glomerulares foram discretas, conforme a literatura registra (De Brito et al. 1965, Sitprija & Evans 1970, Sitprija et al. 1980), mas chamou a atenção a lobulação do tufo glomerular, a constante proliferação de células mesangiais, o espessamento do mesângio e, em casos raros, espessamento da membrana basal do capilar glomerular. Tais alterações parecem caracterizar os padrões de glomerulonefrite mesangioproliferativa e glomerulonefrite membranoproliferativa, de acordo com a classificação da organização mundial de saúde (OMS) para a caracterização de lesões glomerulares na espécie humana (Churg et al. 1985), muito embora esta classificação não seja, aparentemente, adequada para a espécie ovina, pois as lesões não se manifestaram com as particularidades exigidas para se enquadrar nessa classificação.

Os resultados deste estudo sugerem que ovinos infectados por leptospiras apresentam lesão renal túbulo-intersticial, com presença da bactéria nos túbulos, o que confere aos animais a condição de portador assintomático capazes de disseminar a infecção por eliminação de leptospiras na urina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agunloye, C.A. Leptospiral agglutinating antibodies in sheep and goats in South-west Nigéria. *Israel J. Vet. Med.*, 57: 28-30, 2002.
- Barbudo-Filho, J., Girio, R.J.S., Mathias, L.A., Oliveira, A.V. & Marinho, M. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira interrogans* em soros de ovinos do Estado de São Paulo. Avaliação do sorotipo *jequitaiá* de *Leptospira biflexa* como antígeno de triagem sorológica. *Ars Vet.*, 15: 26-32, 1999.
- Barnett, J.K., Barnett, D., Bolin, C.A., Summers, T.A., Wagar, E.A., Cheville, N.F., Hartskeerls, R.A. & Haake, D.A. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infec. Immunol.*, 67: 853:61, 1999.
- Carlson, G.P. Testes de química clínica. IN: Smith, B.P. (Eds.) *Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais*. v.1. São Paulo: Manole, 1993, p. 395-23.

- Ciceroni, L., Lombardo, D., Pinto, A., Ciarrocchi, S. & Simeoni, J. Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in sheep and goats in Alto Adige-south Tyrol. J. Vet. Med. B, 47; 217-23, 2000.
- Chung, J., Bernstein, J. & Glasscock, R.J. Renal disease: classification and atlas of glomerular disease. 1. ed. New York: Igaku-Shoin, 1985, 541 p.
- Coles, E.H. Patologia Clínica Veterinária. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984. 566p.
- De Brito, T., Freymüller, E., Penna, D.O., Santos, H.S., Almeida, S.S. de, Galvão, P.A.A. & Pereira, V.G. Electron microscopy of the biopsied kidney in human leptospirosis. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 14: 397-03, 1965.
- Delbem, A.C.B., Freitas, J.C. de, Bracarense, A.P.F.R.L., Müller, E.E. & Oliveira, R. C. de Leptospiriosis in slaughtered sows : serological and histopathological investigation. Braz. J. Microbiol., 33: 174:77, 2002.
- Ellis, T.M., Hustas, L., Robertson, G.M. & Mayberry, C. Kidney disease of sheep, associated with infection by leptospirae of the sejroe serogroup. Aust. Vet. J., 61: 304-5, 1984.
- Ellis, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Vet. Clin.North Amer.: Food Anim. Pract., 10: 463-78, 1994.
- Faine, S. Guidelines for the control of leptospirosis. WHO, Gêneva, 1982.
- Ferreira Alves, V.A., Vianna, M.R., Yasuda, P.H. & De Brito, T. Detection of leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. J. Pathol., 151: 125-31, 1987.
- Galton, M., Sulzer, C.R., Santa Rosa, C.A., Fields, M. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. Appl. Microb., 13: 81-5, 1965.
- Garry, F., Chew, D.J., Rings, D.M., Tarr, M.J. & Hoffsis, G.F. Renal excretion of creatinine, electrolytes, protein, and enzymes in health sheep. Am. J. Vet. Res., 51: 414-9, 1990.
- Grégoire, N., Higgins, R. & Robinson, Y. Isolation of leptospiras from nephritic kidneys of beef cattle at slaughter. Am. J. Vet. Res., 48: 370-1, 1987.
- Haanwinckel, M.C.S.; Megid, J. & Souza, L.C. Avaliação da prova de imunoperoxidase como recurso diagnóstico na leptospirose animal. Arq. Inst. Biol., 71: 293-01, 2004.
- Hamir, A.N., Hanlon, C.A., Niezgoda, M. & Rupprecht, C.E. The prevalence of interstitial nephritis and leptospirosis in 283 raccoons (*Procyon lotor*) from 5 different sites in the United States. Can. Vet. J., 42: 869-71, 2001.
- Herrmann, G.P., Lage, A. P., Moreira, E.C., Haddad, J.P.A., Resende, J.R. de, Rodrigues, R.O. & Leite, R.C. Soroprevalência de aglutininas anti-leptospiras spp em ovinos nas

- mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, 34: 443-8, 2004.
- Hughes, J. Apoptosis in tubulointerstitial renal diseases. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 15 (suppl): 55-7, 2000.
- Juliano, R.S., Chaves, N.S.T., Santos, C.A. dos, Ramos, L.S., Santos, H.Q. dos, Meireles, L.R., Gottschalk, S., Corrêa Filho, R.A.C. Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia-GO. *Ciência Rural*, 30: 857-862, 2000.
- Langoni, H., Marinho, M., Baldini, S., Silva, A. V. da, Cabral, K.G. & Silva, E.D. da. Pesquisa de aglutininas antileptospíricas em soros de ovinos no Estado de São Paulo, Brasil, utilizando provas de macroaglutinação em placa e soroaglutinação microscópica. *R. bras. Med. Vet.*, 17: 264-68, 1995.
- Levett, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14: 296-26, 2001.
- Maxie, M.G. The Urinary System. In: Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. & Palmer, N. (Eds.) *Pathology of domestic animals*. 4 ed. Londres: Academic Press, 1993, p.447-38.
- Oliveira, R.C., Freitas, J.C. de, Silva, F.G., Souza, E.M., Delbem, Á.C.B., Alves, L.A., Muller, E.E., Balarim, M.S., Reis, A.C.F., Batista, T.N. & Vasconcellos, S.A. Diagnóstico laboratorial da leptospirose em um cão utilizando diferentes técnicas. *Arq. Inst. Biol.*, 72: 111-13, 2005.
- Pirani, C.L. Evaluation of kidney biopsy specimens. In: Tisher, C.C. & Brenner, B.M. *Renal Pathology: with clinical and functional correlations*. 2. ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994. 2 vol. p. 85-115.
- Plank, R. & Dean, D. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp in humans. *Microbes and infection*, 2: 1265-76, 2000.
- Saglam, Y.S., Temur, A. & Aslan, A. Detection of leptospiral antigens in kidney and liver of cattle. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 110: 75-7, 2003.
- Scanziani, E., Sironi, G. & Mandelli, G. Immunoperoxidase studies on leptospiral nephritis of swine. *Vet. Pathol.*, 26: 442-4, 1989.
- Sitprija, V. & Evans, H. The kidney in human leptospirosis. *Amer. J. Med.*, 49: 780-8, 1970.
- Sitprija, V., Pipatanagul, V., Mertowidjojo, K., Boonpucknavig, V. & Boonpucknavig, S. Pathogenesis of renal disease in leptospirosis: clinical and experimental studies. *Kidney Intern.*, 17: 827-36, 1980.
- Sitprija, V., Losuwanrak, T. & Kanjanabuch, T. Leptospiral nephropathy. *Sem. Nephrol.*, 23: 42-8, 2003.

Rosetti, C.A., Vanasco, B.N., Pini, N. & Carfagnini, J.C. Comparison of three diagnostic techniques for the detection of leptospire in the kidneys of wild house mice (*Mus musculus*). *Pesq. Vet. Bras.*, 24: 6-10, 2004.

Tisher, C.C. & Brenner, B.M. *Renal pathology: with clinical and functional correlations*, 2. ed., v.1, Philadelphia: J.B. Lippincott Co., 1994, 978p.

Vasconcellos, S.A. Laboratory diagnosis of leptospirosis in animals. In: Simpósio Internacional sobre leptospira y leptospirosis en las Americas. 2004, México. *Anais eletrônicos México*, 2004. Disponível em: <<http://www.vps.fmvz.usp.br/mexico/anais.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2004.

Yener, Z. & Keles, H. Immunoperoxidase and histopathological examinations of leptospiral nephritis in cattle. *J. Vet. Med. A*, 48: 441-7, 2001.

CAPÍTULO II

Apoptose na Nefropatia da Leptospirose em Ovinos

Apoptosis in the Nephropathy of the Leptospirosis in Ovine

Sônia Maria de *Carvalho*¹; Nicodemos Alves de *Macedo*²; Francisco Assis Lima *Costa*²

¹Mestranda em Ciência Animal -CCA-UFPI(e-mail: soniacarvalhovet@hotmail.com)

²Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí
Campus da Socopo
64046-550- Teresina, PI

RESUMO

Leptospirose é uma zoonose amplamente distribuída em todo o mundo, mas pouco sabemos sobre as alterações histopatológicas e a patogênese da nefropatia nos animais domésticos, principalmente nos ovinos. Neste estudo foram analisadas 34 amostras de rim de ovinos naturalmente infectados por *L. interrogans* e cinco controles não infectados, para detecção de apoptose, pelo método de ApopTag Peroxidase. A análise histopatológica revelou nefrite intersticial em 33 (71,74%) animais infectados e em 9 (19,56%) animais não infectados. Lesões histopatológicas tubulares foram observadas em 20 (55,55%) animais infectados e em 2 (20%) não infectados. Presença de leptospiras nos túbulos foram observadas em 8 (22,22%) animais. Apoptose foi observada em células epiteliais tubulares das região cortical e medular em 30 (88,24%) animais infectados e somente na medular em 4 (80%) dos cinco, sem infecção. A presença de apoptose foi significativamente maior nas regiões cortical ($p = 0,035$) e medular ($p = 0,004$) nos animais infectados comparado aos não infectados. Apoptose ocorre em ovinos naturalmente infectados por leptospiras com ação primária sobre células epiteliais tubulares e evidencia que a mesma reduz a população de células tubulares na presença de alterações inflamatórias intersticiais.

Palavras-chave: Leptospirose, apoptose, rim, ovino

ABSTRACT

Leptospirosis is a widely distributed zoonosis in the whole world, but little we know on the histopathologic alterations and pathogenesis of the nephropathy in the domestic animals, mainly at ovines. In this study 34 samples of kidney of naturally infected ovine by *L. interrogans* had been analyzed and five not-infected controls, for detention of apoptosis, for the method of ApopTag Peroxidase. The histopathological analysis showed interstitial nephritis in 33 (71.74%) infected animals and in 9 (19.56%) not- infected. Tubular lesions was observed in 20 (55.55%) infected animals and in 2 (20%) not-infected. Presence of leptospira in the tubules were observed

in 8 (22,22%) animals. Apoptosis was observed in tubular epithelial cells of the cortical region and only in the medullary in 30 (88,24%) infected animals and in the medullary in 4 (80%) of the five, without infection. The presence of apoptosis was significantly greater in the cortical ($p = 0.035$) and medullary ($p = 0.004$) in the infected animals compared with not- infected. Apoptosis occurs of course in ovine infected by leptospira with primary action on tubular epithelial cells and there is evidences that the same reduce the population of tubular cells in the presence of interstitial inflammatory alterations.

Keywords: Leptospirosis, apoptosis, kidney, ovine.

INTRODUÇÃO

Leptospirose é uma zoonose amplamente distribuída em todo o mundo, constituindo sério problema de saúde pública, pois o homem e animais podem se infectar a partir do ambiente contaminado ou do contato direto com urina de outros portadores (Farr, 1995).

O homem é sensível à infecção por leptospiras, mas a susceptibilidade dos animais de produção é variável (Heath e Johnson, 1994). Ovinos são considerados pouco sensíveis e as manifestações clínicas geralmente são inaparentes (Ellis, 1994).

Leptospiras virulentas, durante a fase de bacteremia, disseminam-se por via sanguínea para colonizar os rins (Levett, 2001), onde multiplicam-se, provocando lesões túbulo-intersticiais (Scanziani et al., 1989) e de onde são eliminadas pela urina (Plank e Dean, 2000).

Pela localização preferencial das leptospiras nos rins (Levett, 2001), este órgão merece particular atenção para o estudo dos aspectos morfolopatogênicos da lesão. Entretanto, apesar das pesquisas realizadas, ainda não está claramente definido o mecanismo de lesão renal provocada pela infecção (Sitprija et al., 1980), particularmente em ovinos onde os estudos são bastante escassos.

A lesão renal na leptospirose parece decorrer da ação direta ou da ação tóxica do parasito (Barnett et al., 1999; Yang et al., 2002) ou então da ativação do sistema imune humoral e celular (Costa et al., 1981; Abdulkader et al., 2002; Dorigatti et al., 2005). Por outro lado, sabe-se que apoptose tem papel importante no mecanismo de lesão renal (Wong, et al., 2001), mas pela análise da literatura pertinente, nenhum estudo foi ainda realizado sobre a participação de apoptose na nefropatia da lesão renal na leptospirose, nem no homem nem em qualquer outra espécie animal de produção e, particularmente, em ovinos naturalmente infectados por *Leptospira interrogans*. A morte celular por apoptose regula o número de células durante indução e resolução de injúria renal (Savill, 1994; Ortiz et al., 2002). Vários fatores estão envolvidos em morte celular túbulo-intersticial. Estudo em rato Lewis mostrou que BSA

(albumina sérica bovina) injetada intraperitonealmente induz apoptose de células epiteliais de túbulos proximais, o que permite uma ligação direta entre proteinúria e lesão túbulo-intersticial (Thomas et al., 1999). Apoptose de células epiteliais tubulares mediada por macrófagos é observada também em casos de nefrite do soro nefrotóxica em camundongos (Tesch et al., 1999). Na falha renal aguda isquêmica em ratos, apoptose observada três dias após injúria, é responsável pela perda celular tubular (Jo et al., 2001). Assim, observa-se que apoptose participa do mecanismo de lesão em diversos processos de injúria renal, mas na nefropatia da leptospirose nada sabemos, ainda, sobre sua influência no processo de controle ou progressão da lesão renal.

Este trabalho teve como objetivo detectar a presença de apoptose e avaliar a sua participação na indução de lesões renais em ovinos naturalmente infectados por *Leptospira interrogans*.

MATERIAL E MÉTODOS

119 ovinos, ambos os sexos, adultos, provenientes de diversos municípios do Estado do Piauí, abatidos para consumo em feiras livres, no período de junho de 2003 a março de 2004, foram submetidos ao diagnóstico de anticorpo anti-leptospira por teste de soroaglutinação microscópica (SAM).

Dos 34 animais reagentes sorologicamente para leptosipra, fragmentos de rim foram colhidos, fixados em formol neutro a 10%, tamponado com fosfato, 0,01 M pH 7,4 (formol tamponado) e incluídos em parafina para análise histopatológica. Lâminas também foram tratadas com adesivo Silane A174 (Pharmacia,USA) para detecção de apoptose. 5 animais negativos para leptospirose constituíram o grupo controle.

Apoptose foi detectada por meio do kit apopTag Peroxidase *In Situ* (Chemicon International) segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. Os cortes foram desparafinados com xilol e posteriormente hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico. Em seguida, as lâminas foram incubadas com proteinase K (20µl/ml; Invitrogen Life Technologies), durante 15 minutos. O bloqueio de peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio a 3% em PBS, por 30 minutos. Após lavagem das lâminas em PBS, foi feita incubação com Equilibration buffer (tampão de equilíbrio) por 10 segundos em temperatura ambiente. Os cortes foram então incubados em câmara úmida a 37°C com solução contendo Terminal Deoxinucleotidil Transferase (TDT) durante 60 minutos. Em seguida foi utilizada a solução tampão de parada da reação (stop/wash buffer) por 10 minutos. Após lavagem em PBS,

foram incubados com conjugado anti-digoxigenina por 30 minutos e feita lavagem em PBS por 8 minutos. A revelação da reação foi realizada com solução de 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma) e a contracoloração, com hematoxilina de Harrys. As lâminas foram montadas com entelan para exame ao microscópio de luz. Como controle positivo, foi utilizado tecido mamário de uma fêmea normal de roedor, em que apoptose extensiva ocorre 3 a 5 dias após o desmame (Fig. 3D). Como controle negativo, foi omitida a enzima TdT na reação, conforme recomendação do fabricante (Fig. 3E).

A intensidade das lesões foi classificada semi-quantitativamente, numa escala de 0 a 5 em que 0 = normal, 1 = mínima, 2 = média, 3 = moderada, 4 = moderadamente severa, 5 = severa.

Os resultados semi-quantitativos foram analisados no programa estatístico Sigma Stat. Os seguintes testes não-paramétricos foram empregados: a) método de Kruskal-Wallis para análise de variância. Havendo diferença significativa aplicava-se o teste de Student-Newman-Keuls para comparação múltipla de grupos. b) método de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos. Adotou-se o nível de significância de 0,05.

RESULTADO

A análise histopatológica revelou nefrite intersticial em 33 (71,74%) animais reagentes para leptospira e em 9 (19,56%) sem infecção. O infiltrado inflamatório era constituído por linfócitos, macrófagos, plasmócitos e raros neutrófilos (Fig. 1), localizado na região cortical, córtico-medular e medular. Alterações tubulares foram observadas em 20 (55,55%) animais e em 2 (20%) animais não infectados. Em túbulos da região cortical cilindros hialinos estavam presentes em 10 animais positivos. Observaram-se ainda degeneração de células epiteliais, desprendimento de células para o lume tubular, necrose de membrana basal tubular, atrofia tubular e degeneração hialina goticular. Leptospiras foram observadas nos túbulos em 08 (22,22%) animais. Estas formavam aglomerados ou apresentavam-se como formas únicas aderidas ao epitélio ou livres no lume tubular (Fig. 2), com a característica conformação espiralada e coloração enegrecida conferida pela técnica de Warthin Starry. As lesões glomerulares eram discretas e caracterizadas predominantemente por proliferação de células mesangiais.

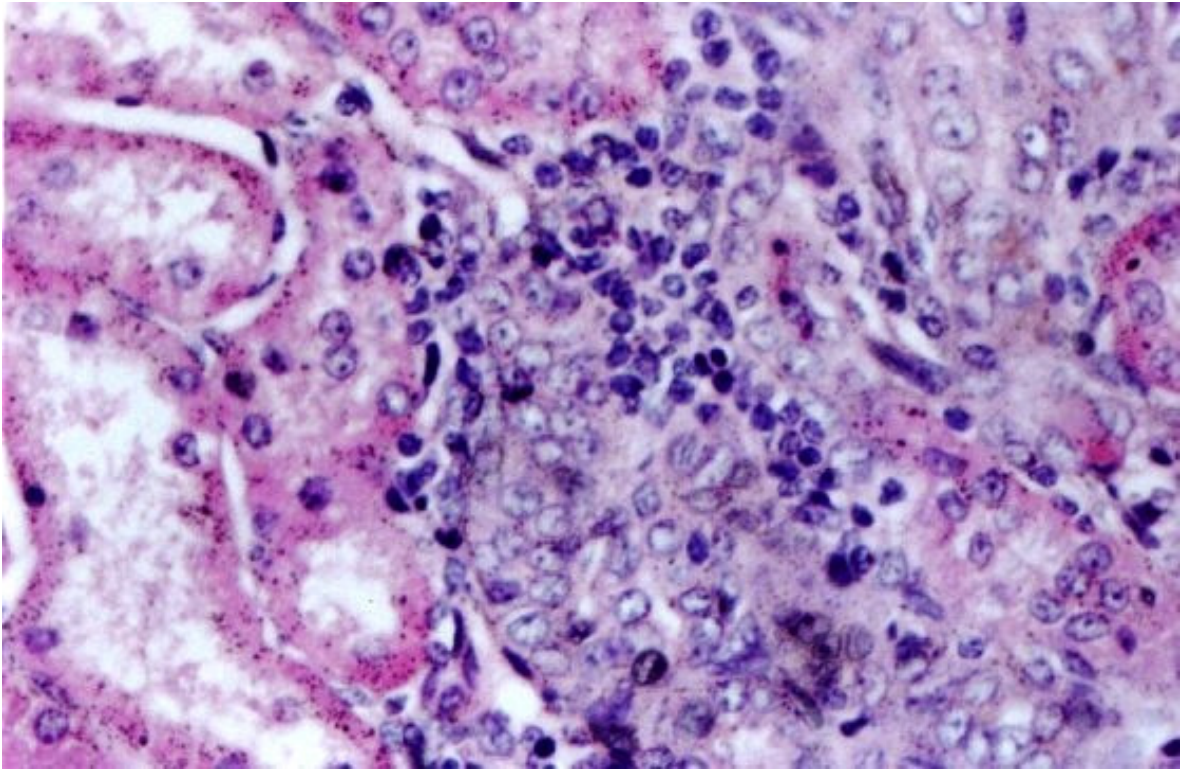


Figura 1. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Infiltrado inflamatório intersticial de células mononuclear. H-E. 140x.

Células apoptóticas foram claramente marcadas, apresentando núcleo de coloração marrom, pela técnica imunohistoquímica empregada. Apoptose estava presente em 30 amostras (88,24%) de rim de animais infectados, de intensidade variando de mínima a severa, e somente em quatro não foi observada (Tabela 1 e Fig. 3A, 3B, 3C).

Tabela 1. Apoptose em tecido renal de 34 ovinos infectados naturalmente por *Leptospira interrogans* e 5 ovinos não infectados. Método ApopTag Peroxidase *in situ*.

Grupos	N	Positivo	Negativo
Infectados	34	30	4
Não infectados	5	4	1

Em sua maioria, células em apoptose estavam aderidas à membrana basal tubular, mas também livres no lume tubular. Quando comparamos os dois grupos de animais, na presença de apoptose, verificou-se que existia marcação significativamente maior na cortical ($p = 0,035$, Mann-Whitney) (Fig. 4) e medular ($p = 0,004$, Mann-Whitney,) (Fig. 5) nos animais infectados em relação aos não infectados.

A marcação de células apoptóticas nos animais infectados foi significativamente maior em células epiteliais de túbulos da região medular ($p = 0,0001$, Teste de Kruskal Wallis, Student-

Newman-Keuls) quando comparada à cortical e células do glomérulo (Fig. 6). Nos animais controles não infectados, apoptose estava presente apenas na região medular em quatro dos cinco animais e era de intensidade mínima (Tabela 1 e Fig. 7).

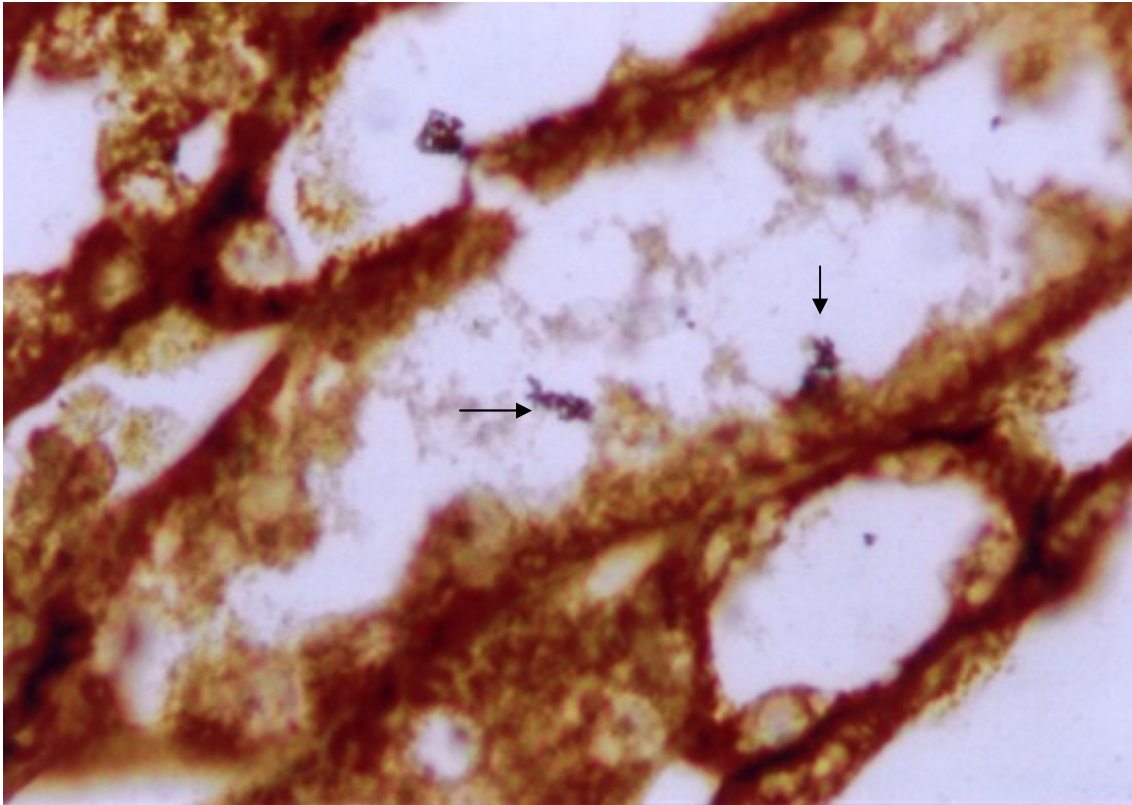


Figura 2. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Presença de leptospiras aderidas a superfície luminal do túbulo proximal, em forma de aglomerados. Warthin Starry. 350x.

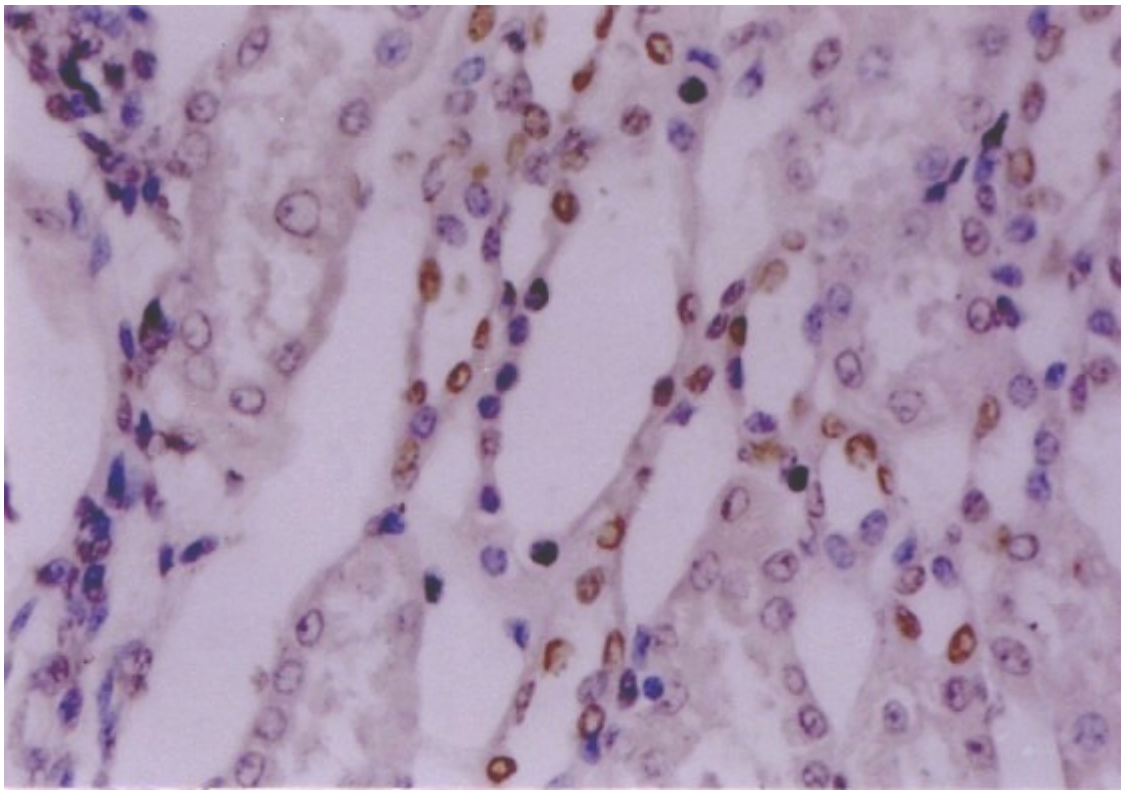


Figura 3A. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Apoptose de células epiteliais tubulares na região cortical. Método de ApoptTag Peroxidase. 140x.

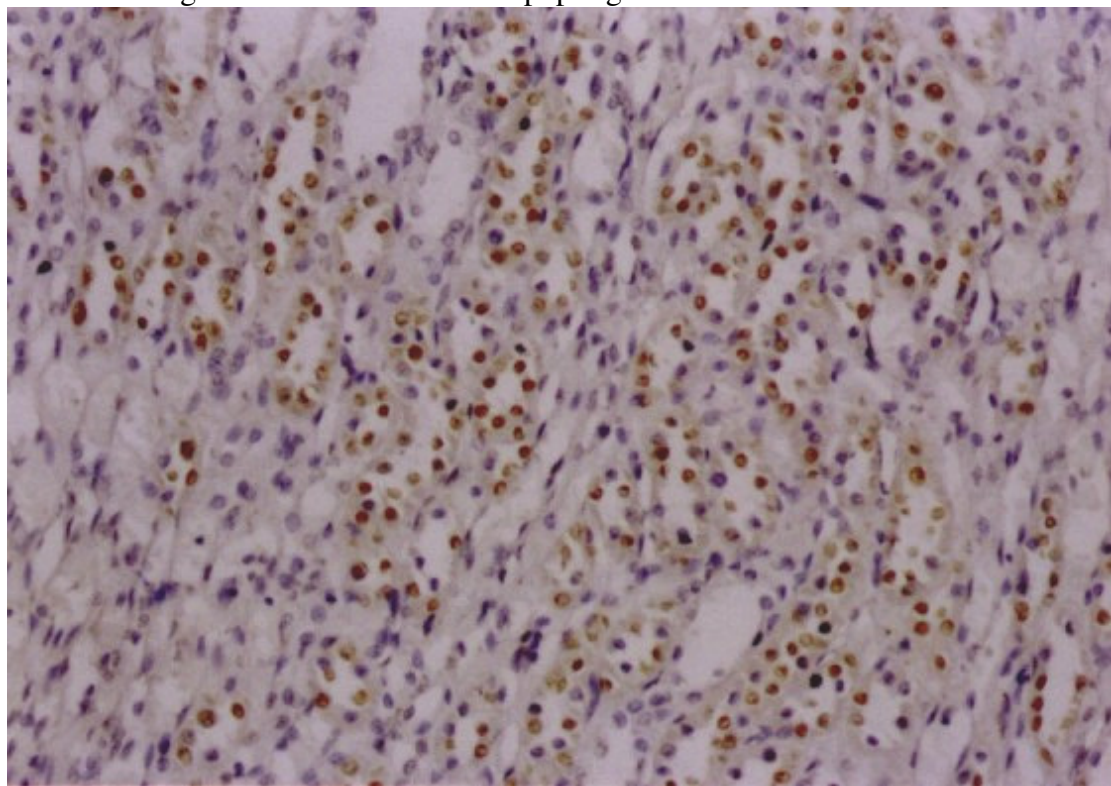


Figura 3B. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Apoptose de células epiteliais tubulares na região medular. Método de ApoptTag Peroxidase. 140x.

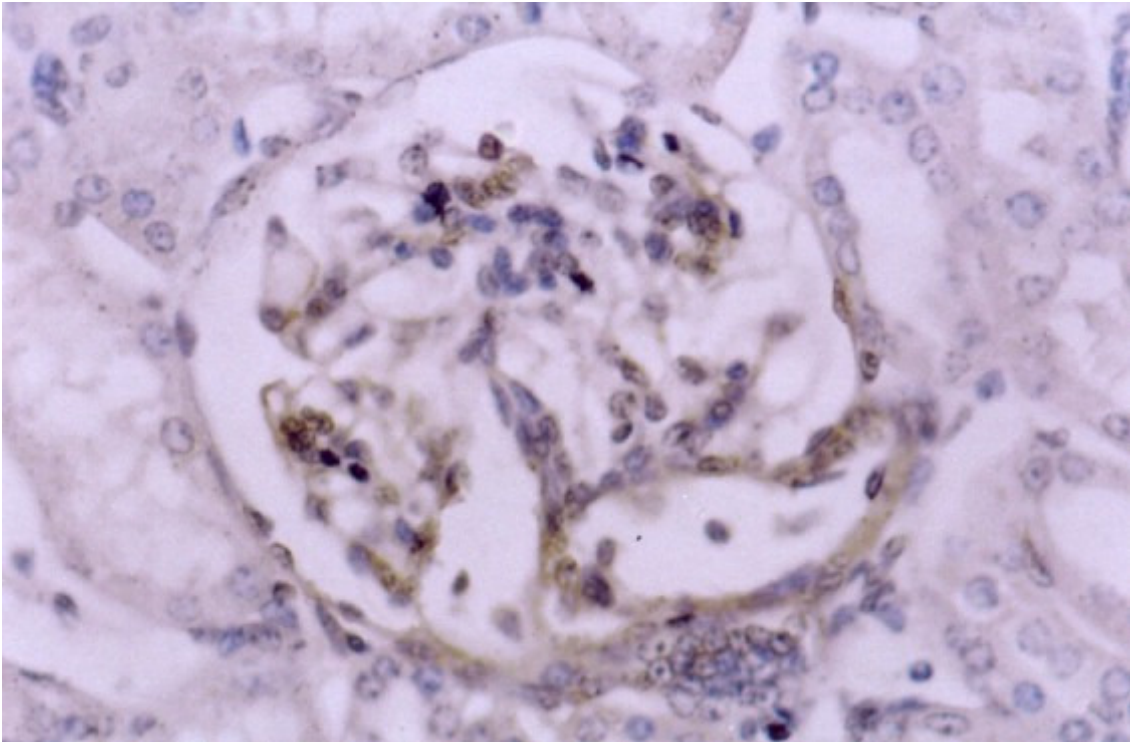


Figura 3C . Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Apoptose em célula glomerular. Método de ApopTag Peroxidase. 140x.

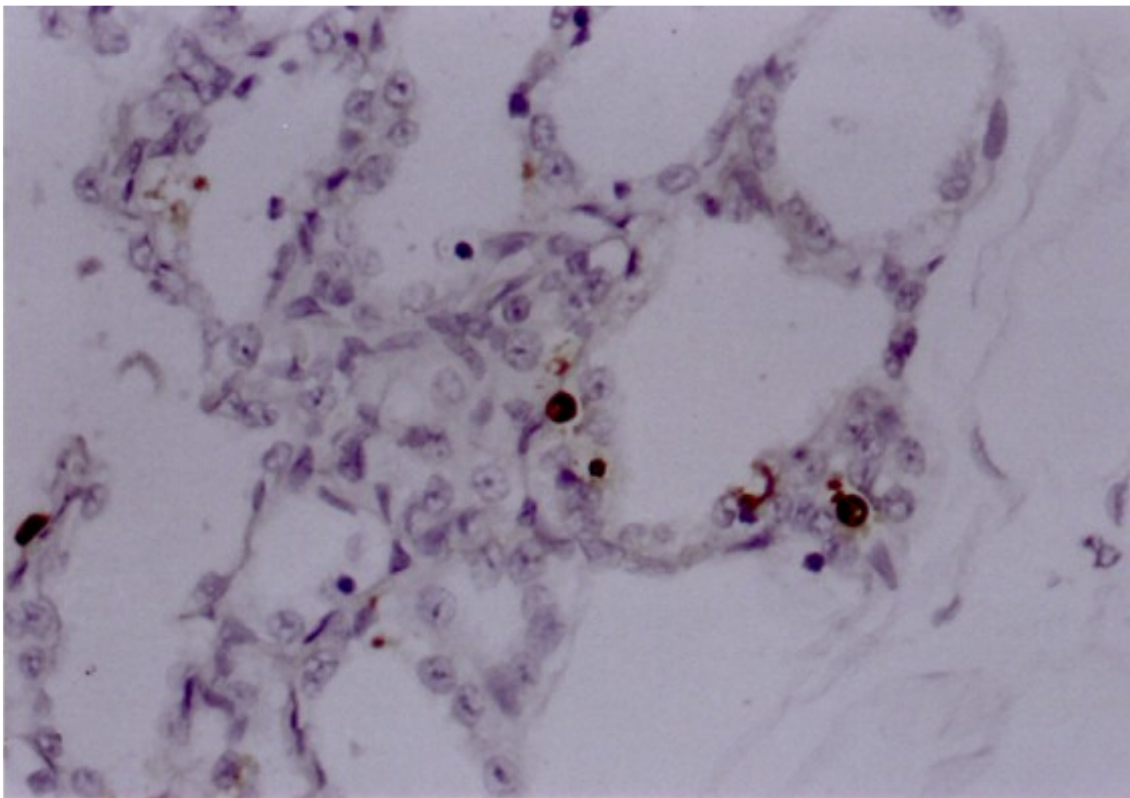


Figura 3D. Controle Positivo, glândula mamária de rata. Apoptose em células epiteliais. Método de ApopTag Peroxidase. 140x.

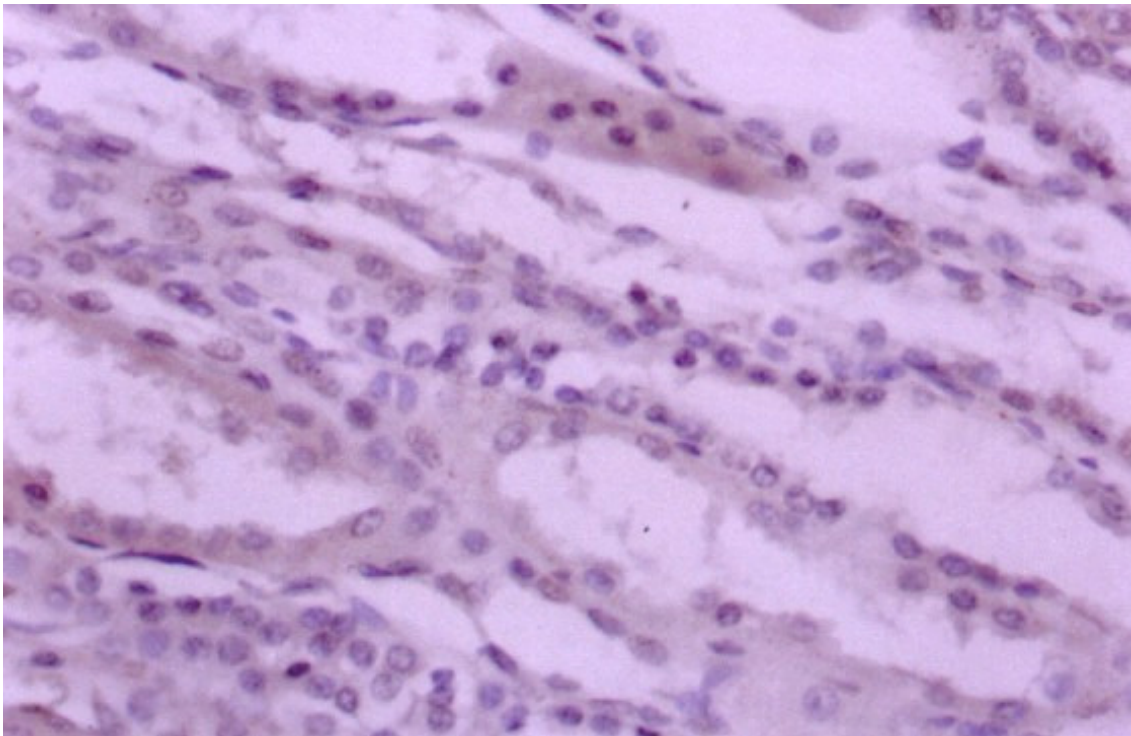


Figura 3E. Rim. Ovino. Controle negativo, omitindo a enzima TdT.

Método ApopTag Peroxidase. 140x.

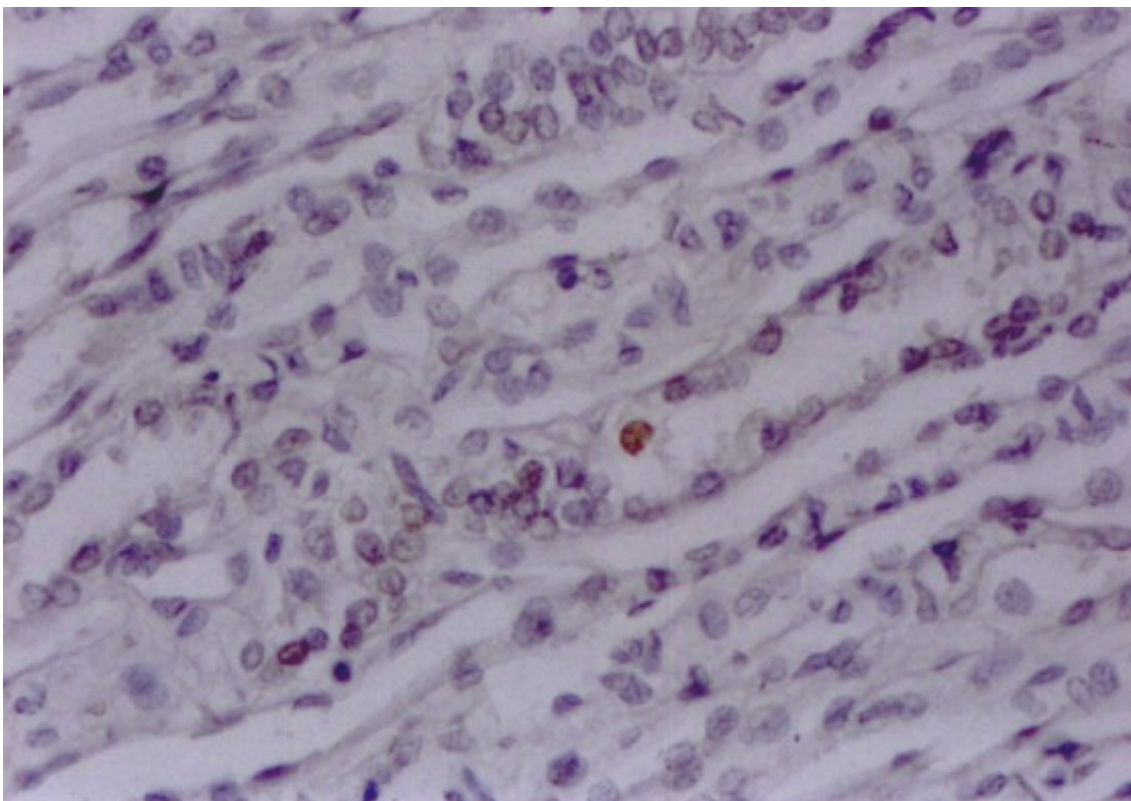


Figura 7. Rim. Apoptose de célula epitelial em túbulo renal de ovino controle não infectado. Método de ApopTag Peroxidase. 140x.

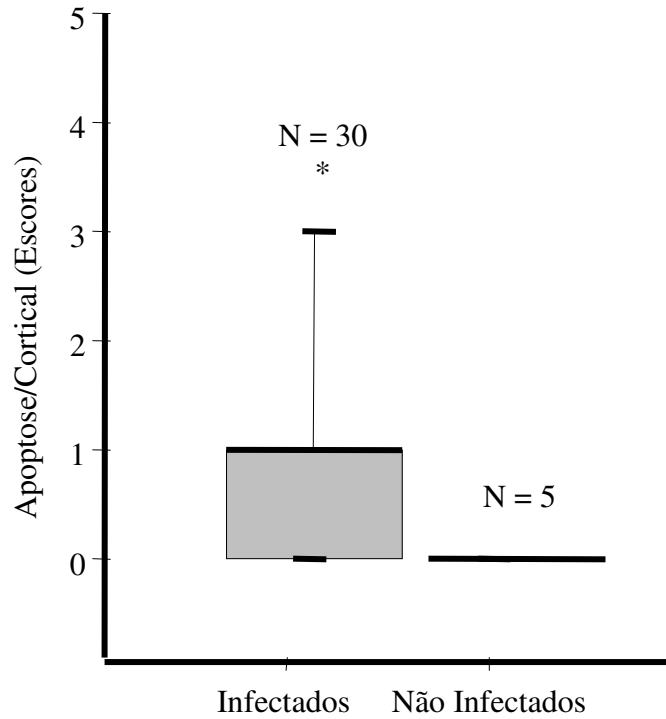


Figura 5. Análise semi-quantitativa da intensidade da presença de apoptose (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em ovinos infectados por *L. interrogans* e controles não infectados. N = N^o de animais por grupo. * p = 0,035 em relação ao grupo controle não infectado (Teste de Mann-Whitney).

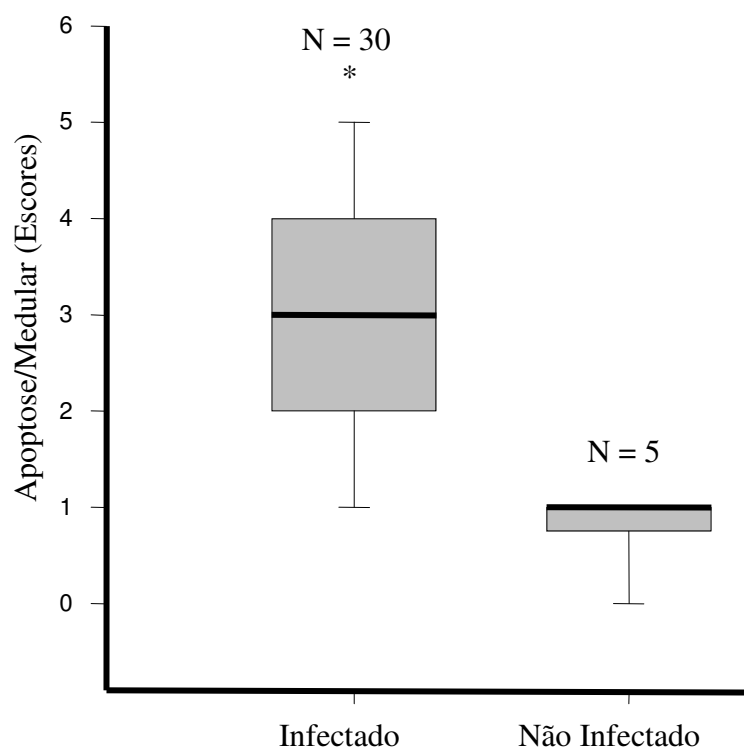


Figura 6. Análise semi-quantitativa da intensidade da presença de apoptose (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em ovinos infectados por *L. interrogans* e controle não infectados. N = N^o de animais por grupo. * p = 0,004 em relação ao grupo controle (Teste de Mann-Whitney).

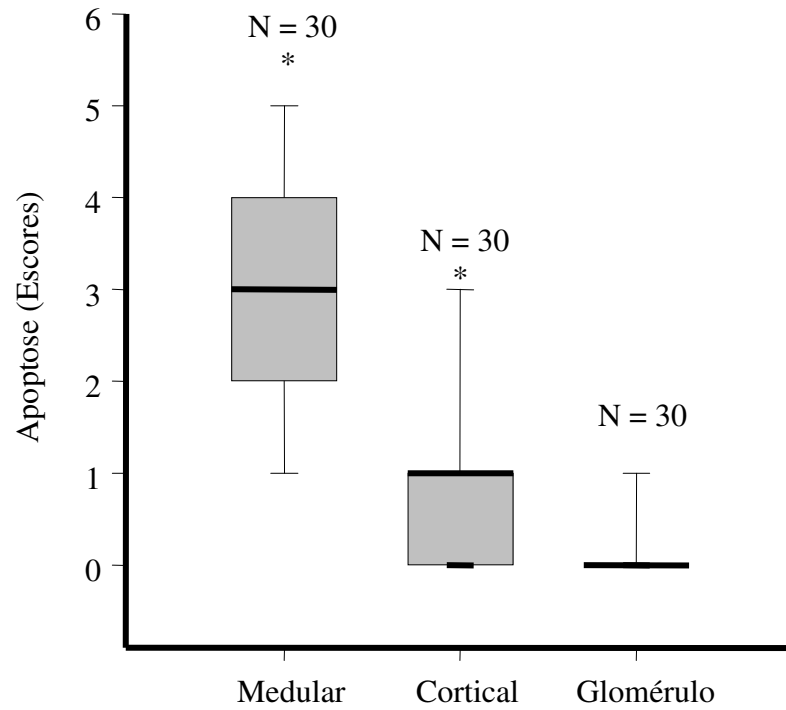


Figura 7. Análise semi-quantitativa da intensidade da presença de apoptose (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em ovinos infectados por *L. interrogans* nas diferentes regiões. N = N^o de animais por grupo. * p em relação a cortical (teste de Kruskall Wallis, Student-Newman-Keuls)

DISCUSSÃO

A regulação do fenômeno de apoptose é essencial para a nefrogênese normal e para a manutenção da função renal normal no indivíduo adulto. No rim sadio completamente desenvolvido, apoptose ocorre em baixa frequência, sendo difícil sua detecção devido ao rápido clareamento (Allen et al., 1997; Maderna e Godson, 2003), mas pode aumentar somente como resultado de um processo patológico (Sorenson, 1998). Apoptose é evidente nos rins em casos de cisto renal, inflamação intersticial e glomerulonefrite, cicatrização e esclerose renal (Menè e Amore, 1998), tendo grande importância na regulação do número de células durante a indução e resolução de uma lesão (Ortiz et al., 2000).

A detecção de apoptose nos animais deste estudo foi significativamente maior em células epiteliais de túbulos da região cortical ($p = 0,035$) e medular ($p = 0,004$), nos animais infectados, quando comparado aos animais não infectados, revelando que a lesão renal por apoptose ocorre no local preferencial de colonização por leptospiros, as células epiteliais tubulares (Barnett et al., 1999; Sambasiva et al., 2003). Além disso, nos animais não infectados, apoptose só foi observada em células epiteliais da região medular, em intensidade mínima. Estes dados em conjunto sugerem que apoptose participa do processo de lesão de células epiteliais dos túbulos proximais na leptospirose em ovinos. Estudos *in vitro* sobre apoptose causada por *L. interrogans* revelam sua ocorrência somente em macrófagos (Merien et al., 1997) e hepatócitos de cobaias (Merien et al., 1998). Assim, dentro do que se conhece até o momento, este parece ser o primeiro registro de apoptose em células epiteliais tubulares renais em hospedeiro naturalmente infectado por *L. interrogans*.

A detecção de apoptose nos animais infectados foi significativamente maior nas células epiteliais tubulares da região medular, comparada às células da região cortical e do glomérulo. Em outros processos patológicos renais, como insuficiência renal aguda (Jo et al., 2001) e na injúria isquêmica experimental em ratos (Oberbauer et al., 2001) apoptose, também, foi mais evidente em células epiteliais da região medular. Na infecção por leptospiros é observada diminuição do fluxo sanguíneo renal (De Brito et al., 1979; Yang et al. 2001), provocado, provavelmente, pelo agente na microcirculação. Assim, o dano vascular pode causar isquemia renal e lesão tubular (Pereira et al., 1997) e propiciar condições adequadas para indução de morte por apoptose (Ortiz et al., 2000), principalmente, em células da região medular onde o fluxo sanguíneo naturalmente já é menor (Tisher e Brenner, 1994; Osborne e Fletcher, 1995). Embora

a lesão básica da leptospirose se localize nos túbulos proximais, verificou-se que apoptose era menos intensa nessa região do que em túbulos coletores, provavelmente pelo aumento do déficit sanguíneo devido à injúria renal.

A presença de cilindros hialinos observada em 10 animais infectados parece ter, também, contribuído para a ocorrência de apoptose, pois, sobrecarga de proteína em rim de ratos pode induzir apoptose de células epiteliais tubulares (Thomas et al., 1999). Além disso outras lesões estavam presentes, como: degeneração de células epiteliais, desprendimento de células para o lume tubular, necrose de membrana basal tubular, atrofia tubular e degeneração hialina goticular.

No presente estudo verificou-se que apoptose de células glomerulares foi encontrada em apenas 4 (11,76%) animais, com intensidade mínima, ratificando, assim, que lesões glomerulares na leptospirose são de baixa expressão (Sitprija et al., 1980; Marinho et al., 2003).

Os resultados deste trabalho mostram, pela primeira vez, que apoptose está presente em rim de ovinos naturalmente infectados por *Leptospira interrogans*, com ação primária sobre células epiteliais tubulares e evidencia que a mesma reduz a população de células tubulares na presença de alterações inflamatórias intersticiais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULKADER, R.C.R.M.; DAHER, E.F.; CAMARGO, E.D. et al. Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 44: 79-3, 2002.

ALLEN, R.T.; HUNTER III, W.J.; AGRAWAL, D.K. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 37: 215-28, 1997.

BARNETT, J.K.; BARNETT, D.; BOLIN, C.A. et al. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infec. Immunol.*, 67: 853:61, 1999.

COSTA, E.; SILVA, I.C.; MIRANDA FILHO, G. et al. Estado Imunológico na leptospirose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41: 93-0, 1981.

DE BRITO, T.; BÖHM, G.M.; YASUDA, P.H. Vascular damage in acute experimental leptospirosis of the guinea pig. *J. Path.*, 128: 177-2, 1979.

DORIGATTI, F.; BRUNIALTI, M.K.C.; ROMERO, E.C. et al. *Leptospira interrogans* activation of peripheral blood monocyte glycolipoprotein demonstrated in whole blood by the release of IL-6. *Braz. J. Med. Biol..Res.*, 38: 909-14, 2005.

ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. Clin. Nth. Am.: Food Anim. Pract.*, 10: 463:8, 1994.

FARR, R.W. Leptospirosis. *Clin. Infect. Dis.*, 21; 1-8, 1995.

HEATH, S.E.; JOHNSON, R. Leptospirosis. *JAVMA*, 205: 1518-3, 1994.

JO, S.K.; YUN, S.Y.; CHANG, K.H. et al. A-MSH decreases apoptosis in ischaemic acute renal failure in rats: possible mechanism of this beneficial effect. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 16: 1583-1, 2001.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14: 296-26, 2001.

MADERNA, P.; GODSON, C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Bioch. Bioph. Acta.*, 1639: 141-51, 2003.

MARINHO, M.; LANGONI, H.; OLIVEIRA, S.L. et al. Resposta humoral, recuperação bacteriana e lesões histopatológicas em camundongos geneticamente selecionados para bons e maus produtores de anticorpos e balb/c, frente à infecção por *L. interrogans* sorovar icterohaemorrhagiae. *Pesq. Vet. Bras.*, 23: 5-12, 2003.

MENÈ, P.; AMORE, A. Apoptosis: potential role in renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 13: 1936-43, 1998.

MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlation with virulence. *Infect. Immun.*, 65: 729-38, 1997.

MERIEN, F.; TRUCCOLO, J.; ROUGIER, Y. et al. In vivo apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. *FEMS Microb. Letters*, 169: 95-02, 1998.

PEREIRA, M.M.; ANDRADE, J.; LACERDA, M.D. et al. Demonstration of leptospiral antigens on tissues using monoclonal antibodies and avidin-biotin peroxidase staining. *Exp. Toxic. Pathol.*, 49: 505-11, 1997.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spin humans. *Mic. Infect.*, 2: 1265-6, 2000.

OBERBAUER, R., SCHWARZ, C., REGELE, H.M. et al. Regulation of renal tubular cell apoptosis and proliferation after ischemic injury to a solitary kidney. *J. Lab. Clin. Med.*, 138: 343:1, 2001.

OSBORNE, C. A.; FLETCHER, T.F. Applied anatomy of the urinary system with clinicopathologic correlation. IN; OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. *Canine and feline nephrology and urology*. Philadelphia: Lea e Febiger Book, 1995, p. 3-46.

ORTIZ, A.; LORZ, C.; CATALÁN, M.P. et al. Role and regulation of apoptotic cell death in the kidney. Y2K Update. *Front. Biosc.*, 5: 735-49, 2000.

- ORTIZ, A.; JUSTO, P.; CATALÁN, M.P. et al. Apoptotic cell death in renal injury: the rationale for intervention. *Curr. Drug Targ. – Imm. Endoc. Metabol. Disorders.* 2: 181-92, 2002.
- SAMBASIVA, R.R.; NAVEEN, G.; BHALLA, P. et al. Leptospirosis in India and the rest of world. *Braz. J. Infect. Dis.*, 7: 178-3, 2003.
- SAVILL, J. Apoptosis and the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 5: 12-21, 1994.
- SCANZIANI, E.; SIRONI, G.; MANDELLI, G. Immunoperoxidase studies on leptospiral nephritis of swine. *Vet. Pathol.*, 26: 442-4, 1989.
- SITPRIJA, V.; PIPATANAGUL, V.; MERTOWIDJOJO, K. et al. Pathogenesis of renal disease in leptospirosis: clinical and experimental studies. *Kidney Intern.*, 17: 827-6, 1980.
- SORENSEN, C.M. Life, death and kidneys: regulation of renal programmed cell death. *Curr. Op. Nephrol.Hypert.*, 7: 5-12, 1998.
- TESCH, G.H.; SCHWARTING, A.; KINOSHITA, K. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis. *J. Clin. Invest.*, 103: 73-0, 1999.
- THOMAS, M.E.; BRUNSKILL, N.J.; HARRIS, K.P.G. et al. Proteinuria induces tubular cell turnover: a potential mechanism for tubular atrophy. *Kidney Intern.*, 55: 890-8, 1999.
- TISHER, C.C.; BRENNER, B.M. **Renal pathology:** with clinical and functional correlations, 2. ed., v.1, Philadelphia: J.B. Lippincott Co., 1994, 978p.
- WONG, V.Y.; KELLER, P.M.; NUTTALL, M.E. et al. Role of caspases in human renal proximal tubular epithelial cell apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.*, 433: 135-0, 2001.
- YANG, C-W.; WU, M-S.; PAN, M-J. Leptospirosis renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 16 (Suppl 5): 73-7, 2001.
- YANG, C-W.; WU, M-S.; PAN, M-J. et al. The Leptospira Outer Membrane Protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 13: 2037-5, 2002.

CONCLUSÕES FINAIS

- Infecção por leptospira em ovinos está presente no Estado do Piauí, com maior ocorrência dos sorovares autumnalis, castellanis, grippothyphosa, pyrogenes, butembo e pomona;
- Lesão renal está presente em ovinos infectados por leptospiros sem manifestações clínicas da doença;
- A presença de leptospira nos túbulos renais, confere ao ovino a condição de portador assintomático;
- Apoptose ocorre em rim de ovinos naturalmente infectados por leptospiros;
- Apoptose tem ação primária sobre as células epiteliais tubulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAL

- ABDULKADER, R.C.R.M. Acute renal failure in leptospirosis. **Renal failure**, 19: 191-98, 1997.
- ABDULKADER, R.C.R.M. et al. Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 44: 79-83, 2002.
- AGUNLOYE, C.A. Leptospiral agglutinating antibodies in sheep and goats in South-west Nigéria. **Israel J. Vet. Med.**, 57: 28-30, 2002.
- ALLEN, R.T.; HUNTER III, W.J.; AGRAWAL, D.K. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. **J. Pharmacol. Toxicol. Meth.**, 37: 215-28, 1997.
- BARANTON, G. The spirochaetes: a different way of life. **Bull. Inst. Pasteur**, 93: 63-95, 1995.
- BARBUDO-FILHO, J. et al. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira interrogans* em soros de ovinos do Estado de São Paulo. Avaliação do sorotipo *jequitaiia* de *Leptospira biflexa* como antígeno de triagem sorológica. **Ars Vet.**, 15: 26-32, 1999.
- BARNETT, J.K. et al. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. **Infec. Immunol.**, 67: 853-61, 1999.
- BLACKMORE, D.K.; BAHAMAN, A.R.; MARSHALL, R.B. The epidemiological interpretation of serological responses to leptospiral serovars in sheep. **New Zel. Vet. J.**, 30: 38-2, 1982.
- BONINI, A.L.; MOURA, A.R.; FRANCO, M. Revisão: apoptose em glomerulopatias. **J. Bras. Nefrol.**, 22: 70-7, 2000.
- BORBA, M.A. da C. et al. Soroprevalência da leptospirose em ovinos e caprinos do Estado de Pernambuco – resultados preliminares. IN: CONG. LATINOAMER. DE BUIATRIA 11, CONG. BRASILEIRO DE BUIATRIA 5, CONG. NORD. DE BUIATRIA 3, Salvador, Bahia, Brasil. 2003. Livro de resumos e palestras.
- CARLSON, G.P. Testes de química clínica. IN: SMITH, B.P. (Eds.) Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais. v.1. São Paulo: Manole, 1993, p. 395-423.
- CHUNG, J.; BERNSTEIN, J.; GLASSOCK, R.J. **Renal disease**: classification and atlas of glomerular disease. 1. ed. New York: Igaku-Shoin, 1985, 541 p.
- CICERONI, L. et al. Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in sheep and goats in Alto Adige-south Tyrol. **J. Vet. Med. B**, 47: 217-23, 2000.
- COLES, E.H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984. 566p.
- COSTA, E. et al. Estado Imunológico na leptospirose. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 41: 93-0, 1981.

- COSTA, F.A.L. et al. CD4+ T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 33:1455-58, 2000.
- COSTA, G. da S. et al. Anticorpos anti-leptospiras em soros de ovinos da microrregião de Teresina, PI. IN: CONBRAVET, 31. 2004, São Luís. Anais eletrônicos . . .São Luís, 2004.
- DE BRITO, T.; BÖHM, G.M.; YASUDA, P.H. Vascular damage in acute experimental leptospirosis of the guinea pig. **J. Path.**, 128: 177-2, 1979.
- DELBEM, A.C.B. et al. Leptospirosis in slaughtered sows: serological and histopathological investigation. **Braz. J. Microbiol.**, 33: 174-77, 2002.
- DOBRINA, A. et al. *Leptospira icterohaemorrhagiae* and leptospire peptidoglycans induce endothelial cell adhesiveness for polymorphonuclear leukocytes. **Infect. Immunol.**, 63: 2995-99, 1995.
- DOCKRELL, D.H. The multiple roles of Fas Ligand in the pathogenesis of infectious diseases. **Clin. Microbiol. Infect.**, 9: 766-79, 2003.
- DORIGATTI, F. et al. *Leptospira interrogans* activation of peripheral blood monocyte glycolipoprotein demonstrated in whole blood by the release of IL-6. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 38: 909-14, 2005.
- ELLIS, G.R. et al. Seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo in merino stud rams in south Australia. **Aust. Vet. J.**, 71: 203-6, 1994.
- ELLIS, T.M. et al. Kidney disease of sheep, associated with infection by leptospires of the sejroe serogroup. **Aust. Vet. J.**, 61: 304-5, 1984.
- ELLIS, W.A.; McDOWELL, S. Leptospirosis. IN: DEWI, I.Ap. et al. **Pollution in Livestock Production Systems**. Wallingford (UK). CAB International. 1993. p. 167-86.
- ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Vet. Clin. North Amer.: food animal practice**, 10: 463-78, 1994.
- FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. WHO, Gêneva, 1982.
- FARR, R.W. Leptospirosis. **Clin. Infect. Dis.**, 21: 1-8, 1995.
- FÁVERO, A.C.M. et al. Sorovares de leptospiras predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, 32: 613-19, 2002.
- FERREIRA ALVES, V.A. et al. Detection of leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. **J. of Pathol.**, 151: 125-31, 1987.
- GALTON, M.; SULZER, C.R.; SANTA ROSA, C.A., Fields, M. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. **Appl. Microb.**, 13: 81-5, 1965.

- GARRY, F. et al. Renal excretion of creatinine, electrolytes, protein, and enzymes in healthy sheep. **Am. J. Vet. Res.**, 51: 414-9, 1990.
- GRÉGOIRE, N., HIGGINS, R.; ROBINSON, Y. Isolation of leptospiras from nephritic kidneys of beef cattle at slaughter. **Am. J. Vet. Res.**, 48: 370-1, 1987.
- HAANWINCKEL, M.C.S.; MEGID, J.; SOUZA, L.C. Avaliação da prova de imunoperoxidase como recurso diagnóstico na leptospirose animal. **Arq. Inst. Biol.**, 71: 293-01, 2004.
- HAMIR, A.N. et al. The prevalence of interstitial nephritis and leptospirosis in 283 raccoons (*Procyon lotor*) from 5 different sites in the United States. **Can. Vet. J.**, 42: 869-71, 2001.
- HEATH, S.E.; JOHNSON, R. Leptospirosis. **JAVMA**, 205: 1518-23, 1994.
- HERRMANN, G.P., et al. Soroprevalência de aglutininas anti-leptospiras spp em ovinos nas mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, 34: 443-8, 2004.
- HUGHES, J. Apoptosis in tubulointerstitial renal diseases. **Nephrol. Dial. Transplant.**, 15 (suppl): 55-7, 2000.
- JO, S.K. et al. A-MSH decreases apoptosis in ischaemic acute renal failure in rats: possible mechanism of this beneficial effect. **Nephrol. Dial. Transplant.**, 16: 1583-91, 2001.
- JULIANO, R.S. et al. Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia-GO. **Ciência Rural**, 30: 857-62, 2000.
- LANGONI, H. et al. Pesquisa de aglutininas antileptospíricas em soros de ovinos no Estado de São Paulo, Brasil, utilizando provas de macroaglutinação em placa e soroprecipitação microscópica. **R. bras. Med. Vet.**, 17: 264-68, 1995.
- LEON-VIZCAINO, L.; MENDOZA, M.H.de; GARRIDO, F. Incidence of abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, 10: 149-53, 1987.
- LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, 14: 296-26, 2001.
- LILENBAUM, W. Leptospirosis on animal reproduction: IV. Serological findings in mares from six farms in RJ, BR (1993-1996). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, 35: 61-3, 1998.
- LIN, C-L. et al. Leptospirosis associated with hypokalaemia and thick ascending limb dysfunction. **Nephrol. Dial. Transplant.**, 14: 193-95, 1999.
- MACEDO, N. A. Aglutininas anti-leptospira em soros humanos do Estado do Piauí, com particular referência aos aspectos ocupacionais, 1994 a 1996. (Doutorado. Tese) Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 1997. 123p.
- MADERNA, P.; GODSON, C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. **Bioch. Biophys. Acta.**, 1639: 141-51, 2003.

MARINHO, M. et al. Resposta humoral, recuperação bacteriana e lesões histológicas em camundongos geneticamente selecionados para bons e maus produtores de anticorpos e balb/c, frente à infecção por *L.interrogans* sorovar icterohaemorrhagiae. **Pesq. Vet. Bras.**, 23: 5-12, 2003.

MAXIE, M.G. The Urinary System. In: JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4 ed. Londres: Academic Press, 1993, p.447-38.

MENÈ, P.; AMORE, A. Apoptosis: potential role in renal disease. **Nephrol. Dial. Transplant.**, 13: 1936-43, 1998.

MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlation with virulence. **Infect. Immun.**, 65: 729-38, 1997.

MERIEN, F. et al. In vivo apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. **FEMS Microb. Letters**, 169: 95-02, 1998.

MILAS, Z. et al. The role of myomorphous mammals as reservoirs of leptospira in the pedunculate oak forests of Croatia. **Veterinarski Arhiv.**, 72: 119-29, 2002.

OBERBAUER, R., SCHWARZ, C., REGELE, H.M. et al. Regulation of renal tubular cell apoptosis and proliferation after ischemic injury to a solitary kidney. **J. Lab. Clin. Med.**, 138: 343:1, 2001.

OLIVEIRA, R.C. et al. Diagnóstico laboratorial da leptospirose em um cão utilizando diferentes técnicas. **Arq. Inst. Biol.**, 72: 111-13, 2005.

ORTIZ, A.; LORZ, C.; CATALÁN, M.P. et al. Role and regulation of apoptotic cell death in the kidney. Y2K Update. **Front. Biosc.**, 5: 735-49, 2000.

ORTIZ, A.; JUSTO, P.; CATALÁN, M.P. et al. Apoptotic cell death in renal injury: the rationale for intervention. **Curr. Drug Targ. – Imm. Endoc. Metabol. Disorders**. 2: 181-92, 2002.

OSBORNE, C. A.; FLETCHER, T.F. Applied anatomy of the urinary system with clinicopathologic correlation. IN; OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. **Canine and feline nephrology and urology**. Philadelphia: Lea e Febiger Book, 1995, p. 3-46.

ÖZDEMİR, V.; EROL, E. Leptospirosis in Turkey. **Vet. Rec.**, 150: 248-9, 2002.

PEREIRA, M.M.; ANDRADE, J.; LACERDA, M.D. et al. Demonstration of leptospiral antigens on tissues using monoclonal antibodies and avidin-biotin peroxidase staining. **Exp. Toxic. Pathol.**, 49: 505-11, 1997.

PIRANI, C.L. Evaluation of kidney biopsy specimens. In: TISHER, C.C.; BRENNER, B.M. **Renal Pathology**: with clinical and functional correlations. 2. ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Co., 1994. 2 vol. p. 85-115.

- PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp in humans. **Microbes and infection**, 2: 1265-76, 2000.
- RIET-CORREA, F.; LEMOS, R.A.A. Leptospirose. IN: RIET-CORREA, F. et al. (Eds.) **Doenças de ruminantes e equinos**. 2. ed., São Paulo: Varela, v.1, 426p., 2001.
- ROSETTI, C.A. et al. Comparison of three diagnostic techniques for the detection of leptospire in the kidneys of wild house mice (*Mus musculus*). **Pesq. Vet. Bras.**, 24: 6-10, 2004.
- SAGLAM, Y.S.; TEMUR, A.; ASLAN, A. Detection of leptospiral antigens in kidney and liver of cattle. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.**, 110: 75-7, 2003.
- SAMBASIVA, R.R. et al. Leptospirosis in India and the rest of the world. **Braz. J. Infect. Dis.**, 7: 178-93, 2003.
- SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P. de. Presença de aglutinina antileptospira em soro de ovinos e caprinos do Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, 30: 93-8, 1973.
- SAVILL, J. Apoptosis and the kidney. **J. Am. Soc. Nephrol.**, 5: 12-1, 1994.
- SCANZIANI, E.; SIRONI, G.; MANDELLI, G. Immunoperoxidase studies on leptospiral nephritis of swine. **Vet. Pathol.**, 26: 442-44, 1989.
- SCHÖNBERG, A. et al. Positive PCR for *Leptospira* spp in a sow from a german herd presenting animals with MAT titres for *L. interrogans* serovar Bratislava. **Arq. Inst. Biol.**, 72: 117-20, 2005.
- SITPRIJA, V.; EVANS, H. The kidney in human leptospirosis. **Am. J. Med.**, 49: 780-8, 1970.
- SITPRIJA, V. et al. Pathogenesis of renal disease in leptospirosis: clinical and experimental studies. **Kidney Intern.**, 17: 827-36, 1980.
- SITPRIJA, V.; LOSUWANRAK, T.; KANJANABUCH, T. Leptospiral nephropathy. **Sem. in Nephrol.**, 23: 42-8, 2003.
- SORENSEN, C.M. Life, death and kidneys: regulation of renal programmed cell death. **Curr. Op. Nephrol. Hypert.**, 7: 5-12, 1998.
- TESCH, G.H. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis. **J. Clin. Invest.**, 103: 73-0, 1999.
- THOMAS, M.E. et al. Proteinuria induces tubular cell turnover: A potential mechanism for tubular atrophy. **Kidney Intern.**, 53: 890-98, 1999.
- TISHER, C.C.; BRENNER, B.M. **Renal pathology**: with clinical and functional correlations, 2. ed., v.1, Philadelphia: J.B. Lippincott Co., 1994, 978p.

TRAP, D.; GARIN-BASTUJI, B. Leptospirosis in sheep. **B. Mens. Soc. Vet. Prat. France.**, 72: 283-92, 1988.

VANASCO, N.B. et al. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. **Prev. Vet. Med.**, 60: 227-35, 2003.

VASCONCELLOS, S. A. Leptospirose. **O Biológico**, 59: 29-32, 1997.

VASCONCELLOS, S.A. Laboratory diagnosis of leptospirosis in animals. IN: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE LEPTOSPIRA Y LEPTOSPIROSIS EN LAS AMERICAS. 2004, México. Anais eletrônicos México, 2004. Disponível em: <<http://www.vps.fmvz.usp.br/mexico/anais.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2004.

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

YANG, C-W.; WU, M-S.; PAN, M-J. Leptospirosis renal disease. **Nephrol. Dial. Transplant.**, 16 (suppl 5): 73-7, 2001.

YANG, C-W. et al. The Leptospira Outer Membrane Protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. **J. Am. Soc. Nephrol.**, 13: 2037-5, 2002.

YENER, Z.; KELES, H. Immunoperoxidase and histopathological examinations of leptospiral nephritis in cattle. **J. Vet. Med. A**, 48: 441-47, 2001.

ZAMORA, J.; RIEDEMANN, S.; TADICH, N. A serological survey of leptospirosis in sheep in Chile. **Rev. Latinoamer. Microbiol.**, 41: 73-6, 1999.

ANEXOS

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS - DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

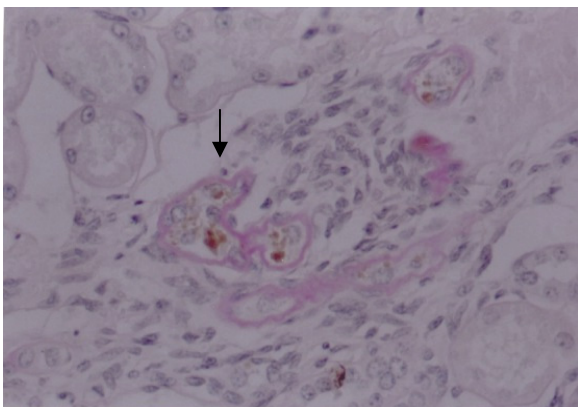


Fig.1. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Atrofia dos túbulos renais. PAS. 140x.

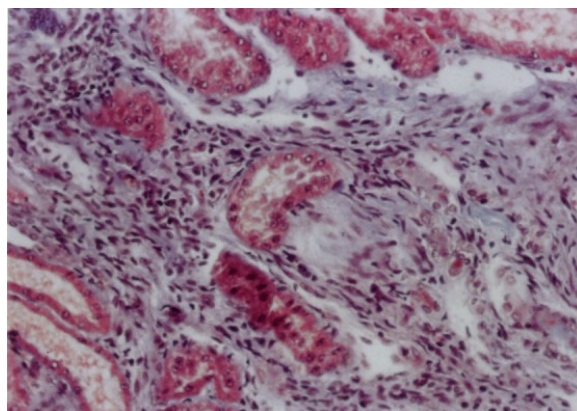


Fig. 2. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Proliferação de tecido conjuntivo (Fibrose). Masson. 140x.

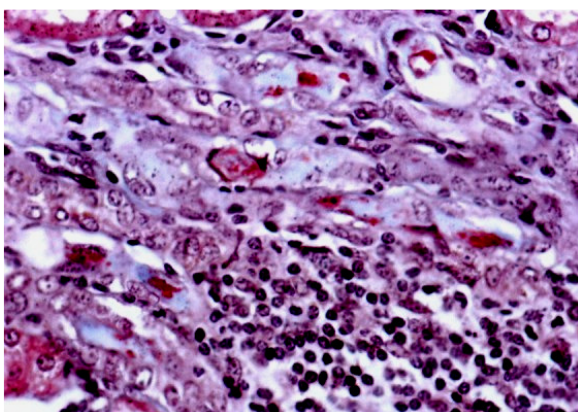


Fig. 3. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Infiltrado inflamatório de células mononucleares e proliferação de tecido Conjuntivo (Fibrose). Masson. 140x.

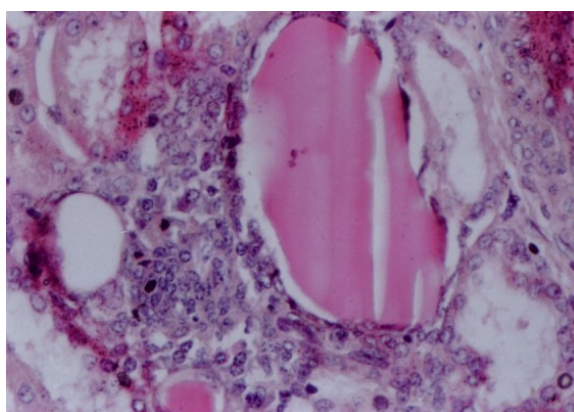


Fig. 4. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Presença de cilindros hialinos em túbulos. PAS. 140x.

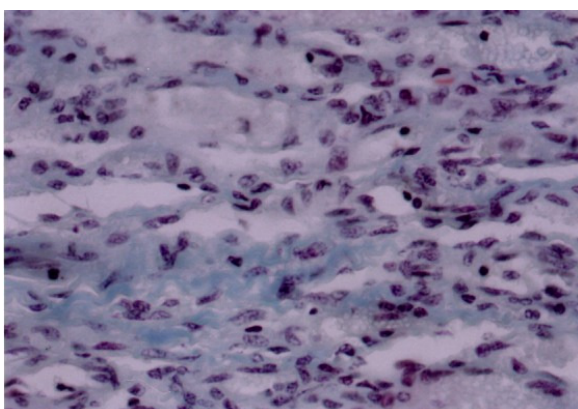


Fig. 5. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Proliferação de tecido Conjuntivo. MASSON. 140x.

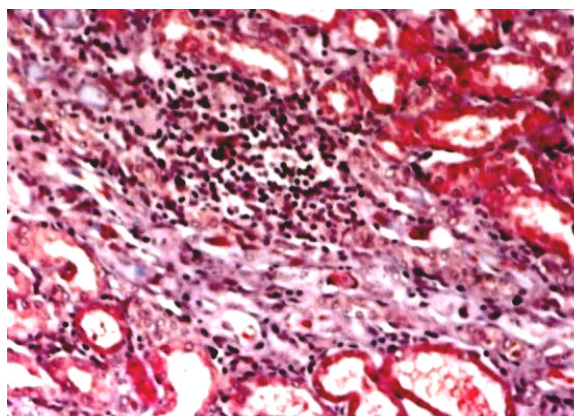


Fig. 6. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Infiltrado inflamatório de células mononucleares e proliferação de tecido conjuntivo (Fibrose). Masson. 140x.

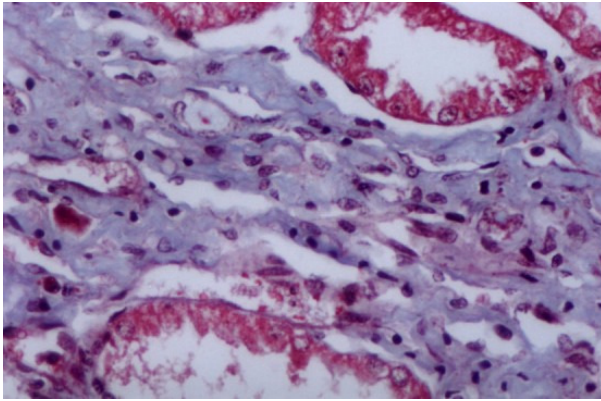


Fig. 7. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Proliferação de tecido conjuntivo (Fibrose). Masson. 140x.

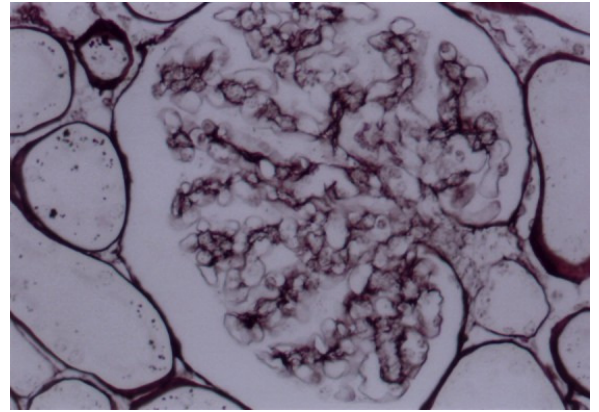


Fig. 8. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Espessamento da membrana basal do capilar glomerular PAMS. 140x.

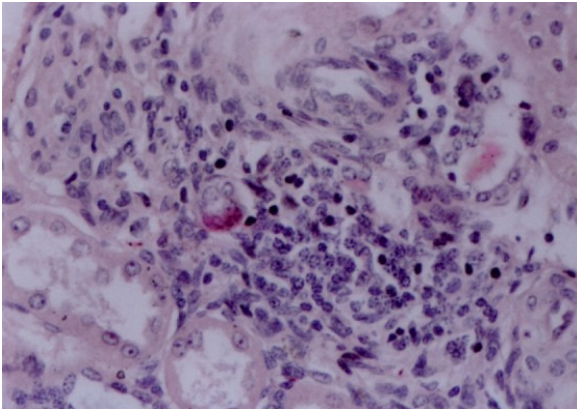


Fig. 9. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Infiltrado inflamatório de células mononucleares. H-E. 140x.

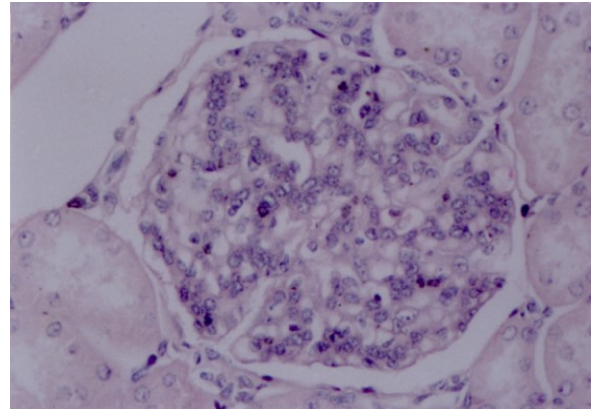


Fig. 10. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Hiper celularidade glomerular. H-E. 140x.

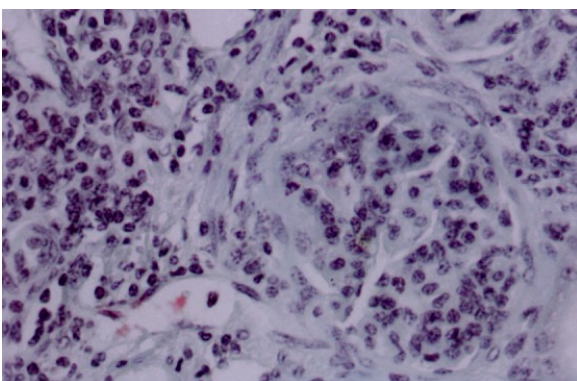


Fig. 11. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Proliferação de tecido conjuntivo (Fibrose). Masson. 140x.

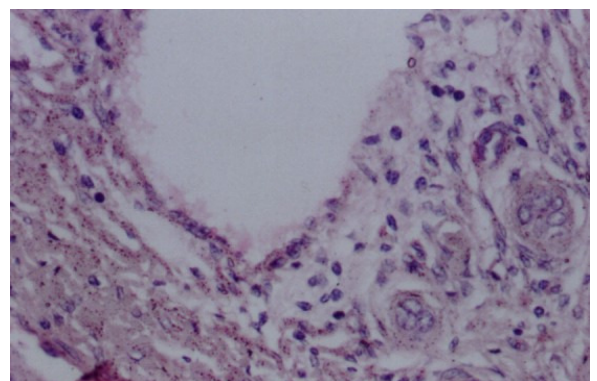


Fig. 12. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Presença de células inflamatórias na parede de arteríolas (vasculite). H-E. 140x.

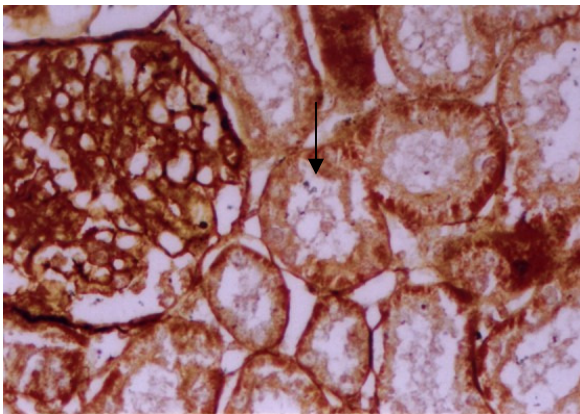


Fig. 13. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Presença de leptospira na superfície luminal de túbulo proximal. W-S. 140x.

APOPTOSE - DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

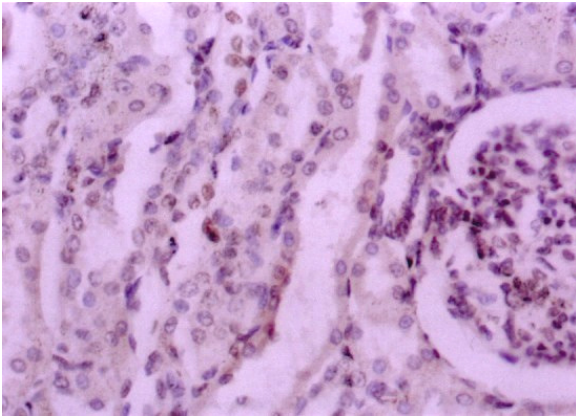


Fig. 14. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Apoptose de células epiteliais na região cortical. Método ApopTag Peroxidase. 140x.

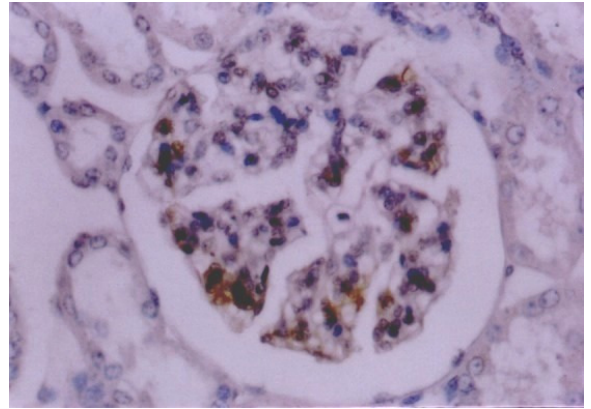


Fig. 15. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Apoptose em célula glomerular. Método ApopTag Peroxidase. 140x.

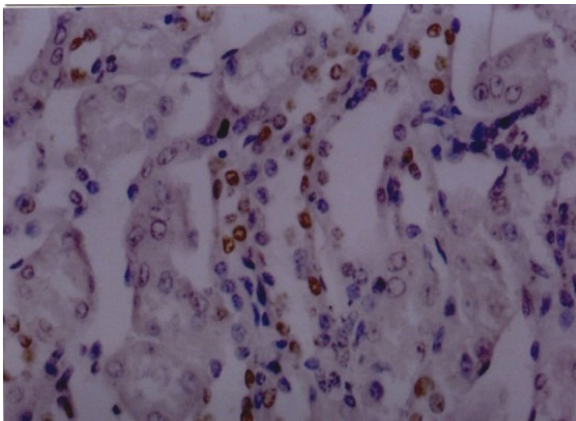


Fig. 16. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Apoptose de células epiteliais na região cortical. Método ApopTag Peroxidase. 140x.

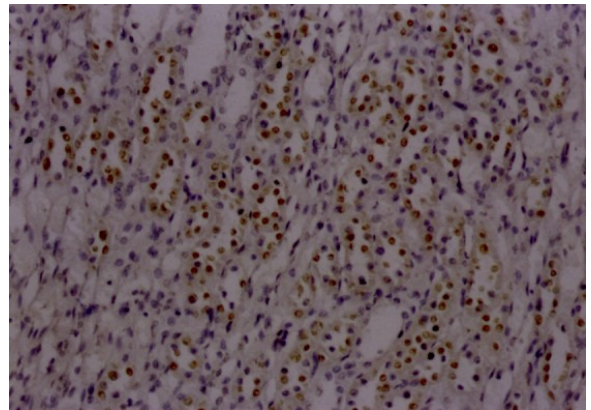


Fig. 17. Rim. Ovino naturalmente infectado por *L. interrogans*. Apoptose de células epiteliais na região medular. Método ApopTag Peroxidase. 140x.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)