

Anne Stambovsky Spichler

**Leptospirose letal aguda em Hamster : caracterização
de perfis bioquímicos, histopatológicos e celulares
renais, relacionada a ensaios terapêuticos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Seguro

São Paulo

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Spichler, Anne Stambovsky

Leptospirose letal aguda em Hamster : caracterização de perfis bioquímicos, histopatológicos e celulares renais, relacionada a ensaios terapêuticos / Anne Stambovsky Spichler. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Nefrologia.

Orientador: Antonio Carlos Seguro.

Descritores: 1.Leptospirose 2.Transportes de íons 3.Rim 4.Terapêutica

USP/FM/SBD-368/07

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof Dr Antonio Carlos Seguro, pelo constante estímulo, competência e sabedoria, e por ter me oferecido a oportunidade de ser sua aluna de Doutorado, e poder estudar este tema fascinante: Leptospirose.

Ao Prof. Thales de Brito, pela honra de poder aprender com seu imenso conhecimento, e pelas maravilhosas discussões, além de sua contribuição substancial para a qualidade dos resultados de imunohistoquímica.

À Ana Maria Silva, por sua amizade, dedicação e competência que permitiram à qualidade da histopatologia e da imunohistoquímica.

À Disciplina de Nefrologia e ao Dr Rui Toledo de Barros pela oportunidade de realizar o Doutorado.

Aos meus colegas de pós-graduação particularmente: Ana Carolina de Bragança; Ana Paula Bastos, Deborah Bui; Ivone Fonseca; Fabíola Oshiro; Zenaide Providello Moyses; que me ajudaram sempre em todos os momentos.

Ao Dr Albert Icksang KO pela oportunidade de realizar os experimentos no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/ Fiocruz- Salvador.

Aos meus colegas Everton Fagonde Silva e Cleiton Santos Silva, que muito me ajudaram com extrema dedicação e competência, na realização dos experimentos.

Ao meu colega Daniel Athanazio, pela amizade, e determinação constante, sabedoria e extrema competência na realização dos experimentos.

À Heloísa Shimizu, pela amizade e ajuda nas dosagens laboratoriais.

A todos os colegas e funcionários do LIM-12

À Cecília da Conceição Costa pela amizade e dedicação com os animais de laboratório.

Ao Nivaldo Francisco da Silva e Eloa de Souza Neves pela amizade e apoio administrativo.

Aos meus pais, David Spichler e Ethel Spichler, e minha irmã Ilana Spichler, pelo constante estímulo e apoio em todos os momentos.

Sumário

Resumo

Summary

1. Introdução.....	1
1.1 Leptospirose em Humanos.....	2
1.1.1 Epidemiologia	2
1.1.2 Etiologia da Leptospirose e Transmissão	4
1.1.3 Patogênese	6
1.1.4 Aspectos clínicos.....	10
1.1.5 Diagnóstico	13
1.1.6 Terapêutica	14
1.1.7 Inflamação - Estresse Oxidativo	16
1.2 Leptospirose – Modelos Experimentais	19
1.2.1 Modelos Experimentais em roedores	19
1.2.2 Modelo experimental em cobaias.....	21
1.2.3 Modelo experimental em Hamster	24
1.2.4 Antibioticoterapia em modelo experimental de hamster	26
1.2.5 Antioxidante em modelos experimentais	27
1.3 Fundamentos do Estudo	28
2. Objetivos	29
2.1 Objetivos Específicos.....	30
3. Métodos.....	31
3.1 Agente infeccioso.....	33
3.1.1 Descrição da cepa.....	33
3.1.2 Dose letal 50%.	33
3.1.3 Preparação do inóculo	34
3.2 Hamster	34
3.3 Terapêutica.....	35
3.3.1 Antibiótico	35
3.3.2 Antioxidante	36
3.4 Aspectos clínicos	36
3.5 Eutanásia	37
3.6 Parâmetros laboratoriais específicos.....	37

3.7	Macroscopia.....	38
3.8	Histopatologia.....	38
3.8.1	Hematoxilina & Eosina (H&E).....	38
3.8.2	Imunohistoquímica (IH) com marcação para <i>Leptospira</i>	39
3.8.3	Imunohistoquímica com marcação de anticorpo NHE3 e NKCC2 no tecido renal	40
3.9	Desenho dos experimentos	41
3.9.1	Experimento 1	42
3.9.2	Experimento 2	43
3.10	Análise Estatística.....	45
4.	Resultados.....	46
4.1	Hematoxilina-eosina (H&E) e Imunohistoquímica com marcação de <i>Leptospira</i> nos tecidos nos Experimento 1 e 2.....	48
4.1.1	Tecido renal.....	48
4.1.2	Tecido pulmonar	51
4.1.3	Tecido hepático	54
4.2	Imunohistoquímica com marcação de anticorpo NHE3 e NKCC2 nos Experimentos 1 e 2 . Comparação entre animais infectados não tratados e tratados: análise semi-quantitativa.....	56
4.2.1	Tecido renal: Anticorpos NHE-3 e NKCC2	56
4.3	Imunohistoquímica com marcação de anticorpo NHE3 e NKCC2 em animais normais, não infectados.....	59
4.3.1	Tecido renal: Anticorpos NHE-3 e NKCC2	59
4.4	Sinais.....	60
4.5	Análise macroscópica no momento da necrópsia	62
4.6	Análise semi-quantitativa com marcação de antígeno de leptospira, transportadores renais, e sinais nos Experimentos 1 e 2.....	62
4.7	Dosagens bioquímicas	64
5.	Discussão.....	66
6.	Conclusões.....	86
7.	Referências.....	88
	Apêndice	

RESUMO

Spichler AS. *Leptospirose letal aguda em Hamster : caracterização de perfis bioquímicos, histopatológicos e celulares renais, relacionada a ensaios terapêuticos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 101p.

A leptospirose é uma zoonose de importância mundial, causada por leptospiras patogênicas. Aproximadamente 5 a 10% das infecções humanas cursam com a forma grave. A Doença de Weil é a forma mais comum de doença grave e pode apresentar-se com duas formas de evolução, aguda progressiva monofásica ou de curso prolongado. A doença grave se caracteriza por uma combinação de hemorragia, mais comumente pulmonar, icterícia e insuficiência renal, com letalidade de 5 a 15%. O rim é um órgão muito acometido na Leptospirose. Clinicamente o envolvimento renal ocorre de 16 a 40%, com manifestações peculiares como poliúria, hipocalemia, e perda de sódio. A disfunção tubular renal, é característica da leptospirose forma grave, com envolvimento dos transportadores renais de sódio ao longo do néfron, levando às manifestações observadas. A terapêutica antimicrobiana é recomendada na Leptospirose, porém com controvérsias à sua indicação após o quarto dia de doença. Quando da instalação da lesão não haveria benefícios com a utilização de antibióticos. O tratamento pode diminuir a morbidade e letalidade, assim como interferir no envolvimento renal e na expressão dos transportadores renais de sódio. A patogênese pode estar relacionada a efeitos diretos da leptospira ou a resposta inflamatória assim como o estresse oxidativo. A utilização de antioxidantes, pode ser considerada como terapia adjuvante. Nós avaliamos a expressão no túbulo proximal do trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (NHE3) e na porção espessa da medula ascendente o co-transportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC2), no modelo de hamster com as duas formas de evolução de doença grave, mimetizando a doença de humanos realizados em dois experimentos. Os experimentos envolveram animais infectados não tratados e tratados com ampicilina associado ou não ao antioxidante, N-acetilcisteína. A presença de antígenos de Leptospira e a expressão dos transportadores foram avaliadas por imunohistoquímica, e o ácido tiobarbitúrico, marcador de estresse oxidativo, (TBARS) foi quantificado. Hamsters infectados, apresentaram altas quantidades de antígenos nos tecidos-alvo, enquanto que a expressão de ambos os transportadores apresentou-se diminuída. O tratamento com ampicilina esteve associado com mínima detecção ou ausência de antígenos, restabelecimento da expressão dos transportadores nos respectivos locais e redução dos níveis de TBARS. O tratamento precoce e tardio com ampicilina restabeleceu os defeitos tubulares na leptospirose forma grave em ambos experimentos, sem benefícios com a utilização da N-acetilcisteína.

Descritores: Leptospirose, Transporte de íons, Rim, Terapêutica

SUMMARY

Spichler AS. *Reversal of renal tubule transporter down-regulation during severe leptospirosis with antimicrobial therapy* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2007. 101 p.

Leptospirosis is a zoonosis of worldwide distribution. About 5-10% of all human infections presents with severe forms. Weil's syndrome, the most common presentation of severe forms of leptospirosis, may courses either as a single monophasic disease or as a disease with prolonged course, characterized by a combination of hemorrhage, particularly in the lung, renal failure, and jaundice, with fatality rates ranging from 5 to 15%. The kidney is an important target organ in leptospiral infection. Clinically, renal involvement in leptospirosis occurs in 16% to 40% of cases and is unique because of the atypical presentation of polyuria, hypokalemia, and sodium wasting, suggestive of a special form of tubular dysfunction related to the major renal sodium transporters expressed along the nephron. A wide range of antimicrobial therapy for leptospirosis was described and benefits have been disputed for cases with more than four days of clinical disease, because after a threshold of leptospiremia, the delayed use of antibiotics is unlikely to reduce fatality. Antimicrobial therapy is thought to interfere on fatality, renal involvement, and renal sodium transporters expression during severe disease. The pathogenesis may be related to direct effects of leptospiral compounds or inflammatory response due to oxidative stress. Antioxidant could be considered for adjunctive therapy. We evaluated the expression of proximal tubule type 3 Na^+/H^+ exchanger (NHE3) and thick ascending limb $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ cotransporter (NKCC2) in infected non treated and treated hamsters reproducing the two forms of clinical human presentations of Weil's syndrome divided in two experiments. Animals were treated or not with ampicillin and/or N-acetyl-cysteine (NAC). Leptospiral antigen/s and expression of renal transporters were evaluated by immunohistochemistry, and serum thiobarbituric acid (TBARS) was quantified. Infected hamsters had high amounts of detectable leptospiral antigen/s in target tissues while renal expression of NHE3 and NKCC2 decreased. Ampicillin treatment was associated with minimal or no detection of leptospiral antigens, normal expression of NHE3 and NKCC2 transporters, and reduced levels of TBARS. Early and late ampicillin treatment rescued tubular defects in leptospirosis severe disease in both experiments, and there was no evidence of benefit from antioxidant therapy.

Descriptors: Leptospirosis, ion transport, kidney, therapeutics

1. Introdução

1.1 Leptospirose em Humanos

1.1.1 Epidemiologia

Leptospirose é uma zoonose de importância global causada por leptospiras patogênicas transmitidas através do contato com reservatórios animais ou água contaminada.

A epidemiologia da doença está associada ao contato humano com roedores ou animais domésticos e selvagens, numa ampla variedade de ocupações rurais e urbanas, e às estações chuvosas e enchentes nos países em desenvolvimento com precário saneamento (Faine, 1982; Levett, 2001; Bharti et al., 2003). Na Amazônia Peruana, a transmissão de Leptospirose urbana esteve associada com altas concentrações de leptospiras patogênicas, avaliada por medidas combinadas quantitativas e de taxonomia molecular (Ganoza et al., 2006).

A *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae provavelmente foi introduzida no leste Europeu, no século 18, devido principalmente ao aparecimento do *Rattus Norvegicus* (Levett, 2001).

A leptospirose, é mais incidente em locais com clima tropical, provavelmente devido ao aumento da sobrevivência da *Leptospira* em ambientes com temperaturas mais elevadas e condições climáticas mais úmidas. A doença é sazonal, com pico de

incidência no verão, e durante o período de maior densidade pluviométrica (Vinetz, 2001; Bharti et al., 2003).

Apesar de atualmente a leptospirose manter-se associada à exposição ocupacional em ambientes rurais de países desenvolvidos, ou regiões endêmicas do Sudeste Asiático, sua epidemiologia está se modificando.

Em países desenvolvidos, a doença vem sendo relacionada à prática de esportes aquáticos, assim como em ambientes urbanos e nas epidemias associadas a estações chuvosas e enchentes (Haake et al., 2002a; Meites et al., 2004, Ricaldi e Vinetz, 2006).

A mudança do contexto rural para urbano em países como EUA e Israel, ocorre com paralelo aumento da frequência do sorogrupo *icterohaemorrhagiae*, carregados especialmente por roedores (Vinetz et al., 1996; Bishara et al., 2002).

No Brasil, foi descrita em 1923, quando Noguchi et al, isolaram a *Leptospira* em um paciente com suspeita de febre amarela no Nordeste (1924). A leptospirose era associada à doença rural, com reservatórios silvestres e a práticas de cultivo. A migração urbana da população rural, gerou um novo desenvolvimento para a transmissão de leptospirosas.

Em Salvador e em São Paulo, a leptospirose relaciona-se a condições sócio-econômicas desfavoráveis, ocorrendo principalmente nas estações chuvosas acompanhadas por alagamento de zonas urbanas com baixas condições sanitárias (Ko et al., 1999; Costa et al., 2001; Romero et al., 2003). No contexto urbano, o rato é a principal fonte de contaminação para transmissão da infecção aos humanos (Faine et al., 1999; Bharti et al., 2003).

No Estado de São Paulo, entre 1969 a 1996 foram confirmados sorologicamente 4.346 casos, com incidências nos anos de 1991, 1.13, e em 1996, 1.05/100.000 habitantes, relacionadas ao aumento do índice pluviométrico (Romero et al., 2003).

No município de São Paulo, local com maior incidência no Brasil, que é responsável por aproximadamente 65% dos casos do estado de São Paulo, a incidência variou de 1.9 a 3.7/100.000 habitantes, no período de 1996 a 2006 com letalidade entre de 11 a 18%. O sorogrupo mais comum foi o Icterohaemorrhagiae. A manifestação mais comum entre os casos letais demonstrada por necropsia foi a de associação de doença de Weil com hemorragia pulmonar (Spichler et al., 2007a).

1.1.2 Etiologia da Leptospirose e Transmissão

A *Leptospira* é uma espiroqueta da família *Leptospiraceae* que inclui dois gêneros, *Leptospira* e *Leptonema*.

Stimson demonstrou pela coloração de prata a presença de espiroqueta no túbulo renal de um paciente que faleceu devido à febre amarela, nomeando-a de *Espiroqueta interrogans*, devido à semelhança com um "questionamento" (1907).

Foram caracterizadas mais de 13 espécies de Leptospiras entre elas, *Leptospira interrogans* (patogênica) e *Leptospira biflexa* (saprófita). Para *L. interrogans* são aproximadamente 230 sorovares e 24 serogrupos, e para a *L. biflexa*, são 60 sorovares (Faine et al., 1999; Ren et al., 2003; Bharti et al., 2003).

O genoma da leptospira, consiste em dois cromossomos circulares. São espiroquetas com muita motilidade, aeróbios obrigatórios, medindo de 0.25x 6-25µm (Haake, 2000a).

A leptospira apresenta uma estrutura de dupla membrana, na qual a membrana citoplasmática e a parede celular de peptidoglicana estão muito associadas, revestidas por uma membrana externa contendo Lipopolissacarídeo (LPS) e várias lipoproteínas (proteínas de membrana externa). O LPS é imunogênico, sendo o responsável pela especificidade do sorovar. De acordo com informações do genoma, provavelmente existem mais de 260 proteínas de membrana (Haake, 2000b; Levett, 2001; McBride et al., 2005).

Através de técnicas específicas, foram identificadas proteínas expostas de superfície: a porina OMPL1; LipL45; LipL41; LipL32; LipL21 e LipL48. As LipL32 e LipL21 são expressas em todas as formas patogênicas (Haake, 2000a; Haake, 2000b; Haake e Matsunaga, 2002b). A LipL32 demonstrou-se com expressão aumentada quando comparado tecido hepático de cobaia com infecção aguda, com leptospira cultivada “in vitro”, indicando que pode haver influência na patogênese da doença (Nally et al., 2007).

Outras proteínas expostas de superfícies são as Lig (“leptospiral immunoglobulin-like protein”) que são proteínas com repetidos domínios encontrados nos fatores de virulência estão presentes na leptospira patogênica, e não na saprófita, podendo estar relacionadas com fatores de virulência como a intimina e a invasina (Koizumi e Watanabe, 2004; Mc Bride et al., 2005; Silva et al., 2007).

A leptospirose é mantida pela persistente colonização em túbulos renais proximais de animais. Os animais infectados podem permanecer assintomáticos e

albergar a *Leptospira* por tempo infinito. Os humanos não são importantes transmissores, embora raramente possam excretar leptospiros na urina (Levett, 2001).

A infecção em humanos resulta do contato com a urina de animais infectados, através do solo ou da água. A *Leptospira* pode penetrar no organismo através da pele sã (imersa em água) ou lesada, e através de mucosa. Há relativamente especificidade de sorovares por determinados hospedeiros mamíferos como, por exemplo: Icterohaemorrhagiae e Copenhageni (ratos urbanos), Ballum (camundongos peridomiciliares, Pomona (porcos), Hardjo (bovinos e ovinos), e Grippothyphosa (marsupiais) (Faine et al., 1999; Levett, 2001; Bharti et al., 2003).

1.1.3 Patogênese

1.1.3.1 Virulência e Hospedeiro

A variabilidade das manifestações é dependente da virulência intrínseca dos diferentes sorovares, do inóculo, e da resposta imune do hospedeiro. Quanto à evolução da doença ser leve ou grave, depende do sorovar, do inóculo, e da resposta imune do hospedeiro.

Ristow et al., identificaram o primeiro fator de virulência em leptospira patogênica. A proteína de superfície de membrana chamada “Loa22” é expressa na superfície da leptospira, e provavelmente está envolvida na patogênese da Leptospirose. Em hamsters infectados com mutante Loa22⁻, ocorreu diminuição de óbitos, porém, não evitou a perda completa da capacidade de produzir infecção (2007).

Em relação à imunidade do hospedeiro, estão envolvidas a humoral com produção de anticorpos anti-lipopolissacarídeos, e a participação da imunidade celular, com produção de interleucinas (IL-6), e fator de necrose tumoral (Dorigatti et al., 2005). Elevados graus de leptospiremia, na fase aguda, podem acarretar títulos de aglutinação moderados, sugerindo que além do mecanismo humoral, o da imunidade celular esteja envolvido na patogênese (Truccolo et al., 2001).

Outros estudos verificaram a importância do receptor “Toll like” (TLR) na leptospirose. Estes, são receptores transmembrana tipo 1, de um grupo diverso de moléculas chamado de receptores de reconhecimento padrão, com a capacidade de reconhecer os patógenos associados a moléculas padrão, e estruturas microbianas, sendo essencial para a resposta imune inata. Existem em algumas células, como por exemplo, nos macrófagos (Qureshi e Medzhitov, 2003).

Em estudo experimental com camundongo C3H/HeJ (deficiência de TLR4), mostrou-se que nos infectados com *L. interrogans* Copenhageni ocorreu desfecho letal, comprovando envolvimento destes receptores na leptospirose (Nally et al., 2005).

Viriyakosol et al., em estudo com camundongo envolvendo o receptor “Toll Like” em macrófagos, registraram que o TLR4, contribuiu para a resposta imune inata, como um fator de proteção na Leptospirose, doença grave (2006).

As complicações mais graves surgem na fase imune, após estabelecimento de uma resposta adaptativa, sendo objeto de discussão, até que ponto as lesões dependem da ação tóxica das bactérias nos tecidos, ou são agressões imunologicamente mediadas (Bharti et al., 2003).

1.1.3.2 Patogênese renal na Leptospirose e mecanismos celulares tubulares

A lesão principal que ocorre é a nefrite túbulo-intersticial, incluindo edema intersticial, e infiltrado celular na área túbulo-intersticial. A nefrite pode ocorrer em pacientes que sobrevivem o tempo necessário para produzir a inflamação, mas provavelmente é ausente em pacientes que desenvolvem o curso muito rápido da doença (Arean, 1962a).

A degeneração tubular primariamente envolve o túbulo proximal, incluindo a presença de leptospiras neste, sendo o provável local de colonização das leptospiras (Magaldi et al., 1992; Yang et al., 2001; Sitprija e Kearkiat, 2005).

As leptospiras são nefrofílicas, possibilitando a lesão renal por uma invasão direta. O pH alcalino no túbulo proximal, favorece o crescimento bacteriano, enquanto o pH ácido é desfavorável. Os produtos do envelope externo envolve lipopolissacarídeos, glicoproteína e polissacarídeos, possíveis participantes na patogênese da lesão renal na leptospirose (Yang et al., 2001; Sitprija e Kearkiat, 2005).

As lipoproteínas (LipL41 e LipL36), e glicoproteínas podem estar diretamente envolvidas na lesão renal, com a presença destes componentes no tecido renal (Barnett et al., 1999).

Os produtos do envelope, provavelmente aderem à membrana celular do hospedeiro, ativam o complemento, acarretando lesão celular. As glicoproteínas da membrana podem causar lesão tubular renal, e lesão endotelial vascular. A verificação de glicoproteínas da membrana da leptospira é mostrada em túbulos renais, e no interstício (Barnett et al., 1999). Os receptores “Toll like”, podem estar envolvidos na patogênese da lesão renal, contribuindo como mediadores (Yang, 2007).

Alterações túbulo-intersticiais podem ser reversíveis se o tratamento for iniciado adequadamente (Yang et al., 2001).

Variações na hemodinâmica, e de estresse oxidativo, podem potencializar a toxicidade dos componentes externos da membrana da leptospira, levando ao aumento da expressão de moléculas de adesão, gerando maior lesão tecidual (Yang et al., 2000).

Estudos sobre os mecanismos tubulares renais envolvidos na fisiopatogênese das alterações em relação à insuficiência renal não-oligúrica, acarretando perda de sódio e hipocalcemia foram relatados (Magaldi et al., 1992 ; Lin et al., 1999; Yang et al., 2001; Wu et al., 2004). Estes distúrbios podem ser atribuídos ao aumento da secreção distal de potássio, causado por um aumento da liberação distal de sódio, devido à diminuição da reabsorção de sódio no túbulo proximal. Porém, mecanismos mais detalhados e celulares estão em investigação (Seguro et al., 1990).

Em Taiwan, estudos “*in vivo*” e “*in vitro*” com *Leptospira shermani*, mais prevalente no local, apontaram para inibição do co-transportador na membrana luminal na porção espessa ascendente, $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-2Cl}^-$ (NKCC2) Este co-transportador obedece a uma seqüência de ligações que se sucedem, resultando em alterações na sua estrutura. Inicialmente é o íon Na^+ que se liga, após o Cl^- , o K^+ , e posteriormente, o segundo cloro. Uma vez no intracelular, o Na^+ é ativamente transportado para o interstício através da ação da bomba $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$. O K^+ , e o Cl^- são transportados passivamente (Seguro et al., 1996; Ecelbarger et al., 2001; Wu et al., 2004). Estando este receptor inibido ocorreriam estas alterações acima descritas.

Outros estudos em leptospirose referiram alteração da bomba de $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$, explicando as alterações metabólicas ocorridas na Leptospirose (Younes-Ibraim et al., 1995).

Estudo desenvolvido por Andrade verificou em trabalho experimental com sorovar Pomona, que ocorreu inibição da expressão do trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (NHE3) localizado na membrana apical do túbulo proximal. Este trocador, libera o íon H^+ , e este é secretado para a luz tubular através de uma troca com o Na^+ . No túbulo proximal ocorre intensa reabsorção de Na^+ e água (Knepper e Brooks, 2001). Na leptospirose quando este trocador está inibido, menor quantidade de sódio é reabsorvido nesta porção do túbulo, e como consequência ocorreriam as alterações observadas. Ainda neste estudo, na membrana luminal da porção espessa ascendente, ocorreu aumento da expressão do co-transportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC2). No ducto coletor, o canal epitelial de sódio sensível ao amiloride (ENaC), que participa da reabsorção passiva de Na^+ , não esteve alterado (Andrade et al., 2007a).

Torna-se necessário verificar com os sorovares mais frequentes no Brasil, e os que causam doença letal aguda, a interferência na expressão de selecionados canais, transportadores, e co-transportadores de membrana ao longo do néfron. Estes, que controlam sódio, água, e potássio, poderiam explicar os desfechos relacionados às alterações renais na Leptospirose.

1.1.4 Aspectos clínicos

Esta síndrome icterica com insuficiência renal, foi primeiramente descrita em 1886, por Adolf Weil em Heidelberg, na Alemanha (Weil, 1886).

A infecção humana apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que variam de forma leve ou moderada, forma anictérica, na maioria dos casos (80 a 90%), a forma grave de 5 a 10%. A apresentação clínica da forma anictérica é

bifásica, com a fase aguda ou séptica permanecendo em média sete dias. Após este período, é acompanhada da fase imune, caracterizada pela produção de anticorpo e aparecimento de leptospiras na urina. A maioria das complicações ocorre na fase imune da doença, associada a localização das leptospiras nos tecidos (Faine et al., 1999; Ricaldi e Vinetz, 2006).

Originalmente descrita no século 19, a Doença de Weil é caracterizada pela tríade de febre, icterícia, e esplenomegalia (Weil, 1886).

Porém o termo Doença de Weil, descrito usualmente se refere a icterícia, insuficiência renal e hemorragia, mais comum pulmonar, quase sinônimo de doença grave.

A tríade de Weil, ou Doença de Weil, é a forma mais comum de apresentação de doença grave, porém a leptospirose forma grave pode ocorrer com uma combinação destas manifestações clínicas acima citadas, incluindo também miocardite e choque (Bharti et al., 2003; Segura et al., 2005; Spichler et al., 2005). A Doença de Weil pode ter formas de evolução: doença de curso prolongado, ou pode ser monofásica aguda progressiva.

A mortalidade da forma grave da leptospirose é referida entre 5 a 15% (Faine et al., 1999; Marotto et al., 1999; Levett, 2001; Bharti et al., 2003; Ricaldi e Vinetz, 2006).

Os sinais e sintomas mais comuns incluem febre, calafrios, mialgia (principalmente em região lombar e panturrilhas), sufusão conjuntival, anorexia, vômitos e prostração. Cefaléia pode ocorrer associada à meningite asséptica em 25% dos casos (Faine et al., 1999; Levett, 2001; Bharti et al., 2003).

A forma ictérica pode apresentar-se com aumento de bilirrubinas permanecendo por dias a semanas até a sua normalização. A icterícia ocorre devido a colestase pela sepse e não pela lesão hepatocelular. Através de microscopia

eletrônica foi demonstrada alteração de canalículos biliares justificando a deficiência de excreção biliar (De Brito, 1968; Vinez, 2001). As plaquetas estão diminuídas em 50% dos casos, e as transaminases estão pouco aumentadas (Levett, 2001).

Em relação ao comprometimento renal, a insuficiência renal aguda ocorre em 16 a 40%, e usualmente é não oligúrica (Seguro et al., 1990; Sitprija e Kearkiat., 2005).

A forma poliúrica é a mais freqüente da insuficiência renal nesta patologia, e se apresenta com prognóstico melhor que a oligúrica. Clinicamente, a insuficiência renal aguda é associada a uma forma peculiar de disfunção tubular. Poliúria e hipocalemia ocorrem com elevada fração de excreção urinária de potássio. Estudos clínicos referem que 45% dos pacientes se apresentam com hipocalemia e com elevada fração de excreção de potássio (Seguro et al., 1990; Abdulkader et al., 1996; Sitprija e Kearkiat, 2005).

As manifestações pulmonares ocorrem entre 20 a 70%, incluindo sinais e sintomas que variam desde tosse, dispnéia, hemoptise, e síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA). A gravidade da lesão pulmonar provavelmente não é diretamente relacionada à presença de icterícia (Levett, 2001; Bharti et al., 2003; McBride et al., 2005).

A síndrome de hemorragia pulmonar associada à leptospirose, assim relatada atualmente, tem como característica a acentuada hemoptise (McBride et al., 2005; Segura et al., 2005).

A hemorragia pulmonar é causa importante de óbito em algumas regiões e independe da presença de icterícia ou do sorovar infectante (Trevejo et al., 1998; Marotto et al., 1999; Segura et al., 2005; Spichler et al., 2005). O mecanismo exato da lesão pulmonar na leptospirose ainda está em investigação (De Brito et al., 1979; Nally et al., 2004).

Marotto et al, mostraram que alguns fatores estão associados ao aumento da mortalidade em pacientes com Leptospirose, através de análise multivariada: distúrbio hemodinâmico, aumento de creatinina ($256 \mu\text{mol/l}$) e hipercalemia ($> 4 \text{ mmol/l}$) (1999). Em outro estudo, o fator independente relacionado à mortalidade foi a oligúria (Daher et al., 1999). Spichler et al, mostraram que no município de São Paulo através de estudo caso-controle, e regressão logística com análise multivariada, que os fatores relacionados a prognóstico desfavorável foram: idade acima de 40 anos; oligúria; plaquetopenia menor que 70.000 cel/mm^3 ; níveis de creatinina acima de 3.0mg/dl , e envolvimento pulmonar (2007b).

1.1.5 Diagnóstico

1.1.5.1 Diagnóstico laboratorial geral

Na Leptospirose, forma grave, ocorre aumento de bilirrubinas variando de 30mg/dl a 45 mg/dl , aumento moderado de transaminases com média de 150U/L , leucocitose, trombocitopenia, aumento de creatinofosfoquinase (CPK), de uréia e de creatinina. Aumento de amilase e lipase em pacientes com pancreatite também pode ocorrer (Spichler et al., 2007c).

1.1.5.2 Diagnóstico laboratorial específico

Pode ser realizado através da demonstração direta da *Leptospira*, ou através de testes sorológicos que detectam anticorpos.

As leptospirosas podem ser isoladas através do sangue, líquido, durante a primeira semana de doença, preferencialmente antes do início da antibioticoterapia

(Faine et al., 1999; Palmer e Zochowski, 2000; Bharti et al., 2003). Após a primeira semana, pode ser isolada na urina. Todas as culturas ou isolamentos devem ser colocados em meio de cultura específico para *Leptospira*, devido às necessidades metabólicas específicas e dificuldade no crescimento destas bactérias (Faine et al. 1999).

As leptospiros também podem ser mostradas através da técnica de imunohistoquímica (De Brito et al., 2006), ou por técnicas de biologia molecular, com detecção do DNA desta por hibridização in situ (De Brito et al., 2006) ou amplificação de genes específicos através da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Truccolo et al., 2002; Segura et al., 2005).

A sorologia é a metodologia mais frequentemente utilizada. A microaglutinação (MAT), é o teste de referência. A MAT detecta anticorpos aglutinados no soro, sendo realizado o teste com aproximadamente 20 sorovares, e geralmente tem positividade após a primeira semana de doença. Os critérios de definição para a MAT positiva são: um aumento de 4 vezes do título do anticorpo, conversão de exame negativo para positivo, ou um título de $1 > 800$ em área endêmica nos pacientes sintomáticos (Levett, 2001; Levett, 2003).

O exame de ELISA IgM também é muito preconizado, e pode ser positivo mais precocemente que a MAT (Levett., 2001; Levett, 2002).

1.1.6 Terapêutica

1.1.6.1 Antibioticoterapia

Quando a suspeita clínica ou epidemiológica sugerir Leptospirose, a antibioticoterapia deve ser iniciada. O antibiótico é eficaz entre o sétimo e o décimo dia da doença, permitindo a eliminação das leptospiros presentes nos tecidos.

Entretanto, pode não reverter completamente às lesões já estabelecidas (Faine et al.,1999).

Vários autores recomendam a utilização de antibiótico nas formas graves, apesar de outros questionarem a utilização tardia deste, como por exemplo, no quarto dia após o início dos sintomas. Porém, a exata identificação dos pacientes nas fases e momentos após início dos sintomas não é geralmente precisa. Portanto, a não indicação de antibiótico deve ser feita com cautela (Watt et al., 1988; Edwards et al.,1988; Leblebicioglu, 2003; McBride et al., 2005).

Em Barbados, um estudo verificou que a penicilina tem efeitos limitados em relação à benefícios relacionados à alteração clínica. Porém, mesmo com estes resultados, o uso do antibiótico é preconizado para pacientes com suspeita clínica aguardando a confirmação posterior de Leptospirose (Edwards et al., 1988).

Costa et al, observaram que a introdução de penicilina após o quarto dia do início dos sintomas, foi ineficaz, em comparação com placebo, sugerindo que a lesão pela *Leptospira* quando já estabelecida, torna o uso do antibiótico dispensável. Porém o estudo não demonstrou significância estatística (2003).

Dois estudos realizados em pacientes na Tailândia mostraram o benefício do tratamento. O primeiro, comparou a eficácia de penicilina cristalina com dose de 1.500.000 U de 6/6 horas por dia, ou ceftriaxone 1g/dia e duração de sete dias, analisando como desfecho primário a febre, e secundário, a melhora do acometimento renal, pulmonar e sepse. A febre teve média de resolução de três dias em ambos os grupos, e no desfecho secundário não houve diferença estatística. O início do tratamento foi semelhante em ambos, com média de quatro dias após o início da doença (Panaphut et al., 2003).

No segundo estudo, realizado em pacientes com leptospirose grave, mas com média de duração dos sintomas de cinco dias até a admissão (área epidêmica), comparou-se a utilização de três antibióticos: penicilina cristalina, cefotaxima e doxiciclina, observando-se a taxa de mortalidade, disfunção orgânica, e febre como desfechos. Comparativamente, houve similaridade de resultados entre os antibióticos (Suputtamongkol et al., 2004).

1.1.7 Inflamação - Estresse Oxidativo

1.1.7.1 Estresse Oxidativo Geral

Espécies reativas de oxigênio ou substâncias reativas, são moléculas contendo oxigênio mais reativas que a molécula do oxigênio triplo contida no ar ambiente (Papas, 1999). Através da redução monovalente do oxigênio, formam-se as espécies reativas sendo as mais estudadas: superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o radical hidroxila (OH) (Papas, 1999).

As substâncias reativas de oxigênio, são essenciais para a produção de energia, síntese de compostos biológicos e fagocitose, exercendo uma função na transdução, que é importante para a comunicação e função celular (Papas, 1999).

As substâncias reativas podem agredir lipídios, glicídeos, proteínas, e o DNA da célula. Induzem a oxidação que pode resultar em lesão oxidativa, e disfunção de membranas, modificação de proteínas, inativação de enzimas, lise do DNA, e modificação de suas bases.

A natureza da ação oxidativa, que causa dano celular ainda não é totalmente esclarecida, mas os mecanismos pelos quais as espécies reativas de oxigênio lesam membranas lipídicas, estão merecendo a atenção de diversos autores (Papas, 1999).

A consequência da lesão oxidativa, está associada às reações de peroxidação nas membranas lipídicas (Eritslund, 2000; Locatelli et al., 2003).

Os lipídios, quando sofrem alterações através de substâncias reativas, se transformam em lipídios modificados, e modificam algumas propriedades biológicas, além de não estarem em sua forma natural, podendo ser capturados por macrófagos e se acumular dentro da célula. A cadeia de oxidação se completa quando os radicais lipídicos são ligados a antioxidantes.

O malondialdeído (MDA) medido através do TBARS (ácido tiobarbitúrico) é um produto da peroxidação lipídica (Ohkawa et al., 1979; Papas, 1999; Eritslund, 2000).

Estas espécies reativas de oxigênio, apresentam um papel preponderante em doenças infecciosas agudas, incluindo: vírus da influenza, hepatite e malária (Hayek et al., 1997; Gunduz et al., 2003; Pabon et al., 2003; Becker et al., 2004).

Uma das principais funções dos antioxidantes é de suprimir a lesão oxidativa, sendo estudada por alguns pesquisadores (Papas, 1999; Zafarullah et al., 2003; Turrens, 2004).

Entre oxidantes e antioxidantes, ou seja, benefícios e efeitos tóxicos, deve sempre existir um balanço.

1.1.7.2 Estresse Oxidativo na Malária

Devido à inexistência de estudos publicados avocando o estresse oxidativo na Leptospirose, pretendeu-se em nosso trabalho, propor analogia com o descrito na malária.

Na malária, o estresse oxidativo (EO) pode exercer um importante papel em relação à insuficiência renal aguda, e a insuficiência respiratória (Mishra et al., 1994; Becker et al., 2004).

A detoxificação de espécies reativas, é uma propriedade que o *Plasmodium* (agente etiológico) deve realizar. Como resultado de alta taxa de crescimento, metabolismo, e multiplicação do parasita, elevadas quantidades de substância ativas redox são geradas. Deverá existir um balanço entre a produção de oxidantes e antioxidantes, para manter o equilíbrio redox. O *Plasmodium*, é equipado com antioxidantes, sendo o mais comum a glutathione (GSH). Em crianças com malária, existe um aumento de peróxidos lipídicos, e diminuição de antioxidantes como vitamina E, e GSH (Pabon et al., 2003).

Na Tailândia, em pacientes adultos, com malária severa, o uso da N-acetilcisteína (NAC), antioxidante exógeno, aumentou a taxa de normalização do lactato no plasma, elevando a GSH (Watt et al., 2002; Becker et al., 2004).

1.1.7.3 Antioxidante

Vários tipos de antioxidantes exercem um importante papel no sistema de defesa, assim como a catalase, superóxido dismutase, carotenóides, e a N-acetilcisteína (NAC), têm importante atuação inibindo o estresse oxidativo. A principal ação dos antioxidantes é em primeira linha, suprimir a formação dos radicais livres. Após, se as reações se formam, a função é a de inibir partes da reação, como a cadeia de iniciação e propagação, sendo que as enzimas antioxidantes atuam na terceira defesa. Portanto, os antioxidantes devem estar com a concentração adequada, para atuar nos mecanismos de defesa (Papas, 1999).

O NAC, antioxidante exógeno, tem a propriedade de se ligar às substâncias reativas de Oxigênio, aumentando os níveis de glutathione, e interferindo com a adesão celular. O NAC pode apresentar benefícios terapêuticos em várias doenças por diferentes mecanismos (Zafarullah. et al.,2003).

1.2 Leptospirose – Modelos Experimentais

1.2.1 Modelos Experimentais em roedores

O gênero *Leptospira* é atualmente classificado em diferentes espécies genômicas, exibindo mais de duzentos e trinta sorovares com diferente seletividade por hospedeiros mamíferos, como indicado no **Quadro 1**.

Quadro 1. Classificação genômica e sorológica das principais leptospiros patogênicas de interesse médico e veterinário. (FONTE: adaptado de Faine et al., 1999; Bharti et al., 2003)

Espécie	Sorogrupo	Sorovar	Principais hospedeiros
<i>L. interrogans</i> (sensu stricto)	Ictero haemorrhagiae	Ictero haemorrhagiae*	Rato (<i>Rattus</i> spp.)
		Copenhageni	Rato (<i>Rattus</i> spp.)
		Lai	Camundongos do campo (<i>Apodemus agrarius</i>)
	Pyrogenes	Manilae	Rato
	Pomona	Pomona*	Porcos
	Canicola	Canicola	Cães
	Grippotyphosa	Grippotyphosa*	Marsupiais, guaxinim
	Sejroe	Hardjo*	Bois, carneiros
	Australis	Bratislava	Cavalos
	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa*
Cynopteri		Cynopteri	Morcegos
Autumnalis		Bim	Camundongos domésticos (<i>Mus</i> spp.)
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Ballum	Camundongos domésticos (<i>Mus</i> spp.)
	Sejroe	Hardjo*	Bois, carneiros
	Tarassovi	Tarassovi	Porcos
	Javanica	Javanica	Ratos do campo
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	Rato (<i>Rattus</i> spp.)
<i>L. inadai</i>	Ictero	Ictero	Rato (<i>Rattus</i> spp.)
	haemorrhagiae	haemorrhagiae*	
<i>L. noguchii</i>	Pomona	Pomona*	Porcos
<i>L. meyeri</i>	Sejroe	Hardjo*	Bois, carneiros

Nota: * alguns sorovares estão distribuídos em mais de uma espécie genômica

A grande diversidade de hospedeiros naturais resultou na utilização de vários modelos experimentais para o estudo da leptospirose. Alguns modelos vêm sendo utilizados para investigações de aspectos específicos da infecção, como complicações imunologicamente mediadas, ou ensaios de imunoproteção, e a utilização terapêutica.

Algumas espécies de roedores estudadas em laboratório são susceptíveis à infecção potencialmente fatal por leptospirosas patogênicas, reproduzindo lesões de órgãos alvos da leptospirose humana grave.

Entre os modelos mais estudados, a cobaia foi a responsável pela maior parte do conhecimento sobre patogênese da leptospirose experimental (Faine, 1957; Arian, 1962b; De Brito, 1968; Yasuda et al., 1986; Nally et al., 2004).

Hamsters são susceptíveis, mimetizam a doença dos humanos, e são utilizados para patogênese, para ensaios de imunoproteção, e principalmente para tratamento (Miller et al., 1974; Oliva et al., 1994; Barnett et al., 1999; Trucolo et al., 2002; Moon et al., 2006).

Estudos da patologia humana e experimental da leptospirose, caracterizam-na como uma doença generalizada associada à diátese hemorrágica, com tecidos afetados como rim, pulmão e fígado com lesões características.

1.2.2 Modelo experimental em cobaias

O modelo experimental em cobaias, referido desde 1957 (Faine, 1957), objetiva reproduzir a doença em humanos, Doença de Weil, com lesões em órgãos como pulmão, rim e fígado.

A patogenia, alterações funcionais, e a descrição histopatológica dos tecidos acometidos na Doença de Weil, foram referidas por vários autores (Faine, 1957; Arean, 1962b; De Brito et al., 1979; Nally et al., 2004), com enfoque para a lesão hepática (De Brito, 1968; Alves et al., 1992), renal (Arean, 1962b; Davila de Arriaga et al., 1982), e pulmonar (De Brito, 1979; Nally et al., 2004).

O quadro morfológico renal é classicamente descrito como lesão do epitélio tubular associado à nefrite intersticial (Arean, 1962a; Arean, 1962b; Davila de Arriaga et al., 1982; De Brito et al., 2006). Alterações degenerativas, como tumefação do epitélio tubular e das células endoteliais, são precoces.

No tecido renal, as principais lesões incluem edema e nefrite túbulo-intersticial focal, manifestadas por exsudato inflamatório, com macrófagos, raros linfócitos e polimorfonucleares, localizados no córtex e na junção cortico-medular.

As células dos túbulos proximais, exibem uma desorganização de mitocôndrias. Células do túbulo distal, alça de Henle, e túbulos coletores, aparecem com edema, com poucas proteínas e hemácias no lúmen (Davila De Arriaga et al., 1982). O rim está moderadamente aumentado de tamanho, com focos de degeneração hidrópica do epitélio tubular (Arean, 1962b). Observou-se mitoses, indicando uma regeneração tubular (Alves et al., 1992).

A lesão glomerular é mínima. O interstício está edemaciado, principalmente na junção cortico-medular, com vasos dilatados, congestos e com hemorragia (De Brito et al., 1979; Davila de Arriaga et al., 1982). A diátese hemorrágica pode ser atribuída à lesão da parede do capilar, que apresenta aumento da fragilidade devido a toxinas produzidas pela *Leptospira*.

As leptospiros são observadas ao redor da membrana basal tubular entre as células tubulares, no lúmen tubular, interstício, e espaços intercelulares. Ocasionalmente podem ser encontradas no citoplasma da célula tubular preservada. As leptospiros são constatadas através de técnicas de imunohistoquímica, verificação em microscopia eletrônica, imunofluorescência, e cultura de rim (Davila de Arriaga et al., 1982; Yasuda et al., 1986; Nally et al., 2004; De Brito et al., 2006).

A presença de *Leptospiras* intactas ou depósitos granulares, pode indicar que a migração das espiroquetas é importante, mas a liberação local dos fatores responsáveis pela virulência (produzido pela leptospira intacta ou pela lise destas), deve ser considerada na patogênese renal. As intactas mostram a migração, mas a presença de depósitos granulares na parede de vasos, aponta para uma provável adsorção de antígenos na célula endotelial (Yasuda et al., 1986).

A icterícia é um fenômeno típico nas formas graves de leptospirose, mas não está relacionada à necrose hepatocelular. O quadro histológico predominante é o de perda de coesão das células hepáticas, com hepatócitos edemaciados, e alterações citológicas de aspecto regenerativo como mitoses, binucleação e multinucleação. A presença de colestase na zona centrolobular pode ser um evento marcante. Hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer são verificadas. O infiltrado inflamatório tende a ser discreto e restrito às áreas portais (Arean, 1962b). Há presença de leptospiros na membrana do hepatócito, confirmada pela técnica da imunoperoxidase (Alves et al., 1992).

A hemorragia intra-alveolar microscópica é freqüente envolvendo 5 a 70% da área do parênquima pulmonar, podendo ser focal, e com o aumento da gravidade, surgem áreas de hemorragia coalescente.

Geralmente ocorre um aumento moderado de celularidade no interstício em septos alveolares. As leptospiros são constatadas por imunohistoquímica, em menor quantidade em comparação com rim e fígado (Arean, 1962b, Nally et al., 2004). Lesão vascular de capilar endotelial direta pode explicar a hemorragia pulmonar (De Brito et al., 1979).

1.2.3 Modelo experimental em Hamster

Vários autores acreditam que o hamster é o modelo mais adequado para mimetizar a doença que ocorre em humanos, para realização de ensaios terapêuticos, e de imunoproteção (Alexander e Rule, 1986; Alt e Bolin 1996; Barnett et al., 1999).

A reprodução da doença de humanos, no modelo experimental, envolve a verificação das conseqüências geradas pela *Leptospira* no sangue e nos tecidos.

Estudos com cepas diferenciadas, inóculos, dias de inoculação, assim como dias de eutanásia diferenciados foram apreciados.

A caracterização do modelo de Leptospirose, descrita por autores como Oliva, Miller e Barnett, enfocou especificamente órgãos como o rim, o pulmão e o fígado (Miller et al., 1974; Oliva et al., 1994; Barnett et al., 1999).

Além desta caracterização, mecanismos de patogênese específicos em relação ao rim, estão sendo estudados. A presença da *Leptospira* (e seus componentes externos) em locais como túbulo, interstício, pode gerar lesão direta ou através de toxinas circulantes, alterando a histologia do tecido renal, provocando alterações funcionais que podem explicar a peculiar alteração renal na Leptospirose (Yang, 2007).

Miller et al, estudaram a patogênese da hemorragia pulmonar na leptospirose. Duas possibilidades foram propostas para o desenvolvimento da diátese hemorrágica: a primeira, envolveria a produção de toxinas pela leptospira gerando lesão na parede capilar, e a segunda sugerindo alteração sanguínea nos fatores de coagulação, resultando em hemorragia (1974). A toxina produzida aumentaria a permeabilidade da parede capilar pulmonar, conduzindo a migração de eritrócitos para a parede, com possível ruptura dos capilares, apresentando manifestação hemorrágica a nível macroscópico e microscópico.

O desenho do estudo incluiu dias seqüenciais de eutanásia e verificação de lesão e quantidade de leptospiras por tecido, no fígado, pulmão e rim. Constataram que no início da doença (através de verificação de leptospiras por culturas de sangue, e tecidos), o fígado apresentava a maior quantidade de leptospira, seguido do rim, e pulmão. No pulmão, a hemorragia foi observada, com lesão de capilar endotelial. Porém, não se detectou grande quantidade de leptospira neste órgão (Miller et al., 1974).

Oliva et al, realizaram modelo com serovares Canicola, Pomona e Icterohaemorrhagiae, mostrando lesões em órgãos como rim, fígado e pulmão, para comprovação da mimetização da doença dos humanos. Todos os tecidos (histopatologia) foram verificados no momento da eutanásia, antes do sétimo dia, após a inoculação, identificando-se as leptospiras nos órgãos acometidos através de método de Wartin-Starryn (1994).

No fígado, observaram congestão extensa, significativa perda da estrutura dos cordões de hepatócitos, degeneração, necrose e focos de hemosiderina. O rim apresentou-se com muita congestão, focos hemorrágicos em córtex e medula,

degeneração epitelial e necrose tubular. No pulmão, hemorragia, congestão e infiltrado neutrofílico nos septos alveolares foram constatados.

Barnett et al, em relação ao rim, ressaltaram que as proteínas da membrana externa da leptospira, estão envolvidas na interação patógeno-hospedeiro (1999). A relação de toxicidade direta do envelope da leptospira e das lipoproteínas, com expressão durante a infecção aguda, ocorre devido à presença da leptospira localizada no lúmen tubular, e no interstício, tendo potencial de induzir e gerar a persistência de nefrite intersticial (Barnett et al., 1999; Athanazio, 2005).

Com a inoculação da cepa *L. kirschneri*, tecidos renais obtidos 10 e 28 dias após a inoculação mostraram diferenças. Dez dias após a inoculação, as leptospiros já estavam localizadas no lúmen tubular, mostrado pela presença de LPS, OMPL1, LipL41. Em 28 dias, o LPS e OMP1, foram verificados no interstício e em macrófagos, e a LipL41 somente no lúmen tubular. Estas demonstrações sugerem que ocorre migração de leptospiros, e esta é seletiva (Barnett et al., 1999).

Os mecanismos que geram distúrbios como hipocalcemia, poliúria e perda de sódio, podem ocorrer por lesão direta nos túbulos e interstício, ou por estas toxinas circulantes. O envolvimento tubular pode alterar transportadores, co-transportadores e canais na membrana epitelial tubular, iniciados e mantidos por fatores de virulência da *Leptospira*, e até regenerados se excluídos estes fatores.

1.2.4 Antibioticoterapia em modelo experimental de hamster

A utilização de agentes antimicrobianos para o tratamento de leptospirose, inclui várias classes de antibióticos: penicilinas, cefalosporina, doxiciclina, ciprofloxacina, testados “*in vitro*” e “*in vivo*” (Alexander e Rule, 1986; Shalit et al., 1989;

Truccolo et al., 2002; Hospenthal e Murray, 2003; Murray et al., 2004; Moon et al., 2006), porém, a sua equivalência com os dois testes não está muito bem estabelecida.

Na antibioticoterapia foram avaliadas a redução de mortalidade, leptospiúria, leptospiras nos tecidos, reação de cadeia de polimerase (PCR) bem como a melhora de parâmetros funcionais e histopatológicos.

Nestes estudos foram utilizados cepas, inóculos, antibióticos, dose, duração e início de tratamento diferenciados (Alexander e Rule, 1986; Alt e Bolin, 1996; Trucollo et al., 2002).

A ampicilina possui uma das melhores atividades para tratamento experimental, mostrada em relação à sobrevida, a não ocorrência de leptospiúria, e a medida de PCR nos tecidos. Os dias de início de tratamento, as doses, e a duração, variam de dose única de 2.5 mg/kg até 160 mg/kg dia, duração de dose única até 5 dias de tratamento, dependendo da cepa, do inóculo, do início do tratamento, e da via de administração (Alexander e Rule, 1986, Alt e Bolin, 1996; Truccolo et al., 2002).

1.2.5 Antioxidante em modelos experimentais

Em modelo de sepse, com ligação do ceco e punção deste, de pancreatite com lesão pulmonar aguda, icterícia obstrutiva, todos podendo ter aumento de espécies reativas de oxigênio, foi realizado estudo terapêutico incluindo-se a utilização do NAC, e verificando-se entre outras medidas, estresse oxidativo sistêmico e tecidual. O NAC foi utilizado em dosagens variando de 100mg/kg a 200mg/kg ao dia, com via de administração, início e duração de tratamentos diferenciados (Leme et al., 2002; Ozdulger et al., 2003; Ritter et al., 2004; Caglikulekci et al., 2004).

1.3 Fundamentos do Estudo

Neste estudo propusemos avaliar lesões específicas causadas pela leptospira em órgãos como rim, pulmão e fígado, demonstradas através da histopatologia, focando a presença tecidual da espiroqueta. Concomitante através de metodologias como a imunohistoquímica verificamos os mecanismos celulares renais relacionados a alguns dos principais distúrbios hidro-eletrolíticos que ocorrem na leptospirose

A introdução da antibioticoterapia e ou antioxidante conduziu a análise dos parâmetros acima mencionados.

Analisou-se com o sorovar que causa doença letal aguda, a sua interferência na expressão de selecionados canais, transportadores, e co-transportadores de membrana ao longo do néfron. Faz-se mister observar se com o tratamento específico com antibioticoterapia, ou com associações, houve uma tendência à normalização destes mecanismos, sugerindo alguma contribuição em relação ao tratamento.

Relativo a parâmetros sistêmicos, como o estresse oxidativo já foi referido noutras doenças agudas, em modelo experimental, e em doenças infecciosas como na malária, pode estar relacionado a alterações de moléculas de adesão exacerbando a hemodinâmica. O estresse oxidativo foi avaliado neste modelo, podendo contribuir para o estudo de alterações sistêmicas na leptospirose.

Sumariando, a contribuição deste modelo proposto, é a da reprodução de doença letal aguda, leptospirose em hamsters, e a da elucidação de alguns mecanismos relacionados às conseqüentes alterações renais correlacionando-as a ensaios terapêuticos.

2. Objetivos

O objetivo geral deste estudo é elucidar a análise da caracterização da leptospirose, doença letal aguda, em modelo de hamster, utilizando metodologias que permitam caracterização ampla e integrada dos processos bioquímicos, histopatológicos, celulares renais, e suas possíveis implicações funcionais, tendo como interface a terapêutica proposta.

2.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver modelo experimental de Leptospirose, doença letal aguda em hamster.
- Estudar tanto no túbulo proximal renal a expressão do trocador Na^+ - H^+ (NHE3) localizado na membrana apical, e na membrana luminal da porção espessa ascendente, a expressão do co-transportador Na^+ - K^+ - 2Cl^- (NKCC2), nos controles infectados e nos submetidos à terapêutica.
- Caracterizar a presença de estresse oxidativo sistêmico.
- Adequar ensaios terapêuticos no modelo de doença letal aguda, respeitando a periodicidade precoce e tardia, com diferentes inóculos.
- Caracterizar os perfis bioquímicos, histopatológicos, e imunohistoquímicos na leptospirose, correlacionando os controles infectados com os submetidos à interferência terapêutica.

3. Métodos

O estudo foi desenvolvido no Laboratório LIM 12, da Faculdade de Medicina da USP, e na Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, em Salvador, Bahia.

O Protocolo experimental deste estudo, foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para análise de projetos de pesquisa-CAPPEsq (protocolo n 949/04), da Faculdade de Medicina da USP, e realizado de acordo com normas de utilização de animais de laboratório.

Realizamos dois experimentos 1 e 2 (E1 e E2), com desenho de estudo diferentes. O E1 mimetiza a Doença de Weil na forma de evolução aguda progressiva, e o E2, a doença de Weil na forma de evolução de curso prolongado, ou “bifásico”

Nos dois experimentos foi utilizada a mesma cepa de *Leptospira*, preconizando o uso de metodologia de análises bioquímicas, histopatológicas, de imunohistoquímica e de biologia molecular.

3.1 Agente infeccioso

3.1.1 Descrição da cepa

A cepa utilizada nos experimentos foi a *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130, isolada através da hemocultura de um paciente com leptospirose grave, da cidade de Salvador, durante a epidemia de Leptospirose em 1996 (KO et al., 1999).

A cepa foi mantida em culturas no meio Ellinghausen e McCullough, modificado por Johnson e Harris (EMJH) (Faine et al., 1999), e a recuperação da virulência foi obtida através de quatro passagens em hamsters.

A cepa inoculada é de baixa passagem “*in vitro*”, sendo obtida após sete passagens em cultura, denominada 4.7.

Nas avaliações prévias, mais de 40 passagens são necessárias para atenuação da virulência desta cepa.

3.1.2 Dose letal 50%.

Experimentos anteriores realizados em hamster com esta cepa, registraram que a Dose Letal (DL) 50% na passagem 4.7, é menor que 10^3 leptospiras.

Para cálculo de dose letal 50% foi usada a fórmula modificada de Reed-Muench (Reed & Muench. 1938).

3.1.3 Preparação do inóculo

A concentração de leptospiras em cada inoculação foi aferida através de contagem em câmara de Petroff-Hausser.

Esta se verifica através de contagem de 3 gotas obtidas do meio de cultura a ser inoculado, com contagem de 3 campos (quadrados grandes com 16 quadrados menores) por gota. Após a contagem, somam-se os três campos. Divide-se este valor por 48, multiplicando-se o resultado por uma constante 2×10^7 . Para obtenção de inóculos mais baixos, realiza-se procedimento de diluições em solução salina (PBS).

3.2 Hamster

Para a avaliação da leptospirose, num modelo experimental susceptível, conduzindo à doença letal aguda e para adequação de ensaios terapêuticos, foram utilizados hamsters *Golden Syrian*, fêmeas, com 4 semanas de idade, pesando em média 85 ($\pm 2,2$) gramas, não isogênicos, do Centro de bioterismo da Fiocruz-Bahia.

Os animais receberam dieta ração "ad libidum", e água durante todo o experimento.

Previamente foram aclimatados durante um período mínimo de 48 horas, e mantidos nas mesmas condições, permanecendo aos pares em microisoladores.

Os hamsters foram inoculados com duas concentrações distintas de *Leptospira* da mesma cepa, uma com inóculo muito alto, 10^8 leptospiras e a outra

com inóculo mais baixo, 10^3 leptospiras respeitando sempre valor maior que a DL50% da cepa, sendo respectivamente dos Experimentos 1 e 2, que versam sobre os ensaios terapêuticos.

Procedeu-se punção sanguínea venosa intra-ocular, com pipeta Pasteur de vidro de 5ml, coletando-se aproximadamente 1,5 ml, e armazenando-se a -80°C para dosagens basais prévias à inoculação.

No momento da inoculação efetuou-se técnica de assepsia na região abdominal do hamster, inserindo a agulha por via abdominal, intra-peritoneal, retirando uma quantidade pequena de fluido peritoneal, e lentamente inoculando a leptospira.

Para a caracterização do modelo experimental, doença letal aguda com comprometimento de pulmão, rim, e fígado, investigou-se os hamsters utilizados como controles positivos dos experimentos. A análise da caracterização, foi realizada através de método de observação de leptospiras, como imunohistoquímica com marcação de antígeno de leptospira, e concomitante análise da histopatologia, além de observação de sinais clínicos.

3.3 Terapêutica

3.3.1 Antibiótico

O antibiótico selecionado foi a ampicilina na forma injetável, devido a estudos prévios referirem que esta apresenta propriedades peculiares para o

tratamento de leptospirose em modelo experimental de hamsters, e é consistente com a suscetibilidade “*in vitro*” (Alexander et al.,1986; Alt e Bolin, 1996; Truccolo et al.,2002).

A Ampicilina na forma pó para solução injetável, com concentração de 1000mg, foi diluída em 20 ml de solução de água destilada, sendo aplicada por via intramuscular nas patas traseiras dos hamsters.

3.3.2 Antioxidante

A N-acetilcisteína foi selecionada devido a estudos prévios com outros modelos experimentais de doenças inflamatórias agudas, e na sepse, apontarem resultados positivos na redução do estresse oxidativo (Leme et al., 2002; Ritter et al., 2004).

A diluição do NAC, solução injetável a 10%, foi preparada com 100 ml de glicose a 5%, e a forma de aplicação foi intra-peritoneal, lentamente.

3.4 Aspectos clínicos

As alterações clínicas, foram registradas em dois períodos diários, sendo monitorados: febre, aferida pela temperatura retal, pêlos eriçados, letargia, hemorragia de mucosas, e a icterícia.

3.5 Eutanásia

A eutanásia foi realizada pela aplicação de 1ml de Tiopental sódico, por via intraperitoneal, na dose de 100mg/kg, realizando-se concomitantemente, coleta sanguínea através de punção intracardíaca, sendo esta armazenada para dosagens posteriores, iniciando-se a necrópsia nos dias pré-determinados.

3.6 Parâmetros laboratoriais específicos

Devido à obtenção de amostra sanguínea pouco representativa, alguns parâmetros para avaliação dos experimentos foram selecionados: O Malondialdeído (MDA), marcador de estresse oxidativo na peroxidação lipídica, Uréia (U), avaliando a função renal, Bilirrubina Total (BT), avaliando a icterícia. A Uréia e a Bilirrubina Total cujos valores padrão são respectivamente 1,2mg/dl e 30mg/dl, foram verificadas através de espectrofotometria.

O MDA, foi aferido pela medida de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), através do método de fluorescência modificado. Diluiu-se 0,2 ml de plasma, e 0,8 ml de H₂O, adicionando-se 1ml de ácido tricloroacético (TCA) a 17.5%, e logo em seguida 1ml de ácido tiobarbitúrico (0.6% ph 2). Procedeu-se à mistura, e colocou-se em água fervente durante 20 minutos. Após este procedimento, a mistura foi congelada acrescentando-se 1 ml de TCA 70%, aguardando-se 20 minutos. Centrifugou-se a resultante durante 15 minutos a 3000rpm, e a densidade óptica do sobrenadante foi lida através de um reagente

padrão, utilizando um espectrofotômetro. O resultado foi expresso em nanomoles, e foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ em absorvância de 534nm. Valores padrão de MDA variam de 2 a 3.5 $\mu\text{mol/l}$ (Ohkawa et al., 1979; Trimarchi et al., 2003).

3.7 Macroscopia

Durante a necrópsia, inicialmente inspecionou-se os tecidos do animal, focalizando órgãos como pulmão, rim, e fígado. A análise macroscópica objetivou a visualização de hemorragias e petéquias no pulmão, friabilidade renal, e icterícia.

Amostras tissulares foram coletadas, fixadas em formol aldeído salino a 4%, e posteriormente realizada a inclusão em parafina.

Os blocos de parafina foram cortados em secções de 3 μm de espessura, corados com hematoxilina e eosina (H&E).

3.8 Histopatologia

3.8.1 Hematoxilina & Eosina (H&E)

Foram selecionadas lesões como: no pulmão, hemorragia pulmonar, intra-alveolar, e lesão intersticial; no rim, necrose tubular aguda, e presença de polimorfonucleares nas luzes tubulares renais, nefrite intersticial, e no fígado, congestão

hepática, dissociação de células hepáticas e desorganização da arquitetura trabecular, através de análise semi-quantitativa tissular. Foi revista através da classificação em cruces, que variou de: zero = ausente, + = leve, ++ = moderado, e +++ = intenso.

3.8.2 Imunohistoquímica (IH) com marcação para *Leptospira*

Através deste método identificou-se os antígenos de leptospira ou os produtos de sua degradação. A análise semi-quantitativa tissular foi revista através da classificação em cruces, que variou de: zero = ausente, + = leve, ++ = moderado, e +++ = intenso.

As lâminas utilizadas nas reações de imunohistoquímica foram desparafinadas em xilol, e os fragmentos hidratados em baterias de etanol (absoluto, 95%, 80%, e 50%).

Estas lâminas foram colocadas em tampão de ácido cítrico 0,01m pH 6.0, e a exposição antigênica foi obtida por tratamento em 20 minutos em microondas com potência máxima. Após, foi realizada lavagem em água corrente destilada e tampão PBS (tampão salino fosfato), 0,01 m pH 7.4.

O bloqueio de peroxidase endógena, por seu turno, foi realizado utilizando incubação em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3%, duas vezes durante 10 minutos cada. Em seguida, foi realizada lavagem em água corrente destilada, e tampão PBS 0,01 m pH 7.4.

A incubação com anticorpo primário anti-leptospira produzido em coelho, diluído 1:7000 em PBS 0,01m, e 1% BSA foi realizada durante 12 horas, em secções seriadas de tecido (De Brito et al., 2006).

A incubação com anticorpo secundário anti-coelho, realizou-se seguindo as especificações do fabricante utilizando Dako EnVision System, HRP (DAB) cód 4011. Após, foi lavada em água corrente destilada, e tampão PBS 0,01 M pH 7.4.

Na revelação utilizou-se, 3,3 Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 60mg/dl., com PBS, e 1ml de H₂O₂ a 6%.

A contra coloração foi realizada com hematoxilina de Carazzi para anticorpos com peroxidase, e a eosina para anticorpos com fosfatase alcalina.

Procedeu-se desidratação e montagem com Permount e exposição ao cromógeno.

3.8.3 Imunohistoquímica com marcação de anticorpo NHE3 e NKCC2 no tecido renal

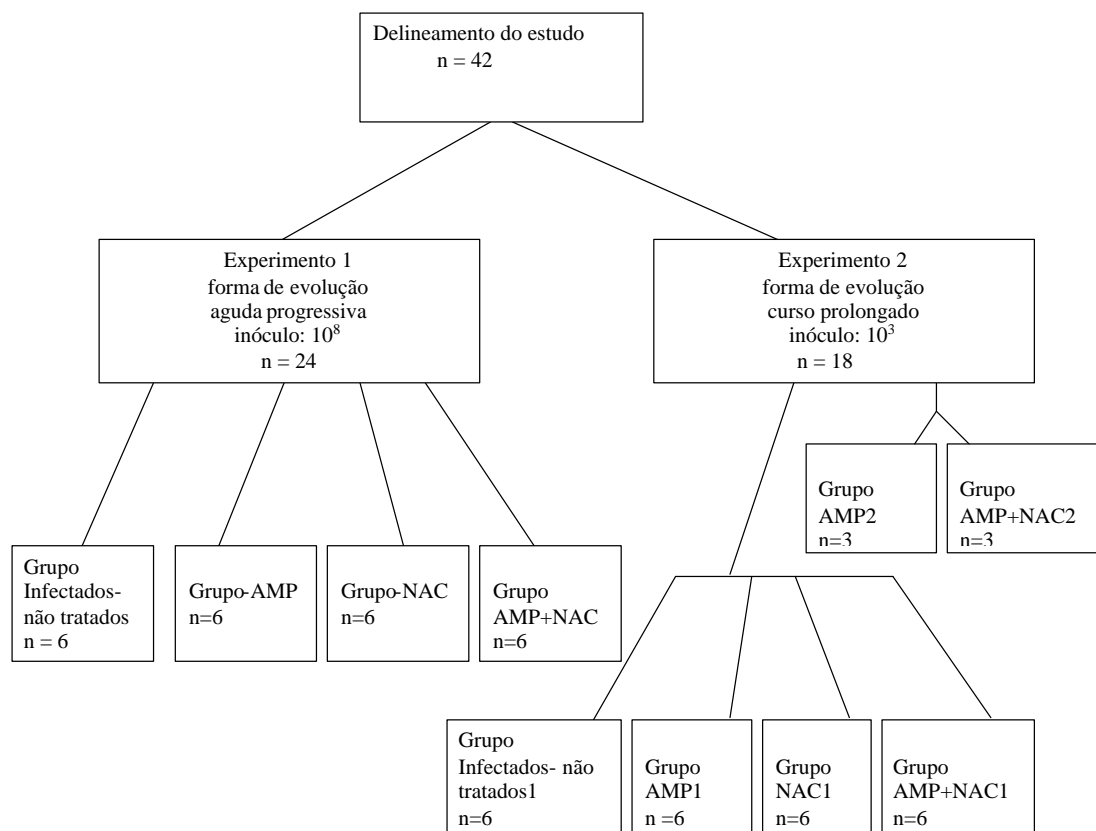
Efetuada metodologia semelhante à da imunohistoquímica com marcação para *Leptospira*, porém, para análise do NHE-3, o anticorpo primário utilizado foi NHE3 (policlonal-coelho) na concentração de 10µg/ml e diluição: 1:100; e o NKCC2 (policlonal-coelho) na concentração de 4 µg/ml na diluição de 1:50. A incubação com anticorpo secundário anti-coelho, realizou-se seguindo as especificações do fabricante utilizando Dako EnVision System, HRP (DAB) cód 4011 (Fernandez-Llama et al., 1998; Elkjzer et al., 2002).

A análise dos transportadores nos locais onde se encontram foi semiquantitativa através da classificação em cruzes, que variou de: zero = ausente, + = leve, ++ = moderado, e +++ = intenso.

O NHE3 foi verificado na membrana apical túbulo proximal, e o NKCC2 na porção espessa da medula ascendente na membrana plasmática apical, comparando-se controles infectados e animais tratados, assim como tecido de hamster normal.

3.9 Desenho dos experimentos

Foram criados dois experimentos em hamsters, para reprodução de leptospirose, doença letal aguda, caracterizando distintos inóculos da mesma cepa, e terapêutica diferenciada, de acordo com o delineamento proposto.



AMP: Ampicilina na dose de 100mg/kg/dia

NAC: N-acetilcisteína: 100mg/kg/dia

AMP1: Ampicilina “1”- início do tratamento no 6^o dia após a inoculação, e eutanásia no 10^o dia. Dose: 100mg/kg/dia

AMP2: Ampicilina “2” - início do tratamento no 8^o dia após a inoculação, e eutanásia no 11^o dia. Dose: 80mg/kg/dia

Efetuarão-se dois experimentos com inóculos maiores que a DL 50% já estudada, analisando-se a periodicidade distinta do tratamento, observando inóculo alto, tratamento precoce, e inóculo baixo com tratamento tardio.

Todos os procedimentos seguirão paramentação adequada, e manipulação em fluxo laminar.

3.9.1 Experimento 1

Objetivando a reprodução de doença letal aguda, forma de evolução aguda progressiva, selecionou-se inóculo, 10^8 leptospiras e iniciou-se a terapêutica coincidente com o início dos sinais clínicos apresentados, após a inoculação. Como nesta forma de evolução a doença tem progressão muito rápida, no início dos sinais, provavelmente já ocorreu disseminação das leptospiras para órgãos alvos, sendo o tratamento neste momento adequado.

Experimentos anteriores com esta cepa e este inóculo, referiram que a data estimada do óbito após a inoculação foi de 4 a 6 dias, e que o surgimento dos sinais variou de 24 a 48 horas após a inoculação (Athanzio, 2005).

O antibiótico ampicilina foi utilizado em dias propostos, com dose de 100 mg/kg/dia dividido de 12/12h, via IM.

O antioxidante, NAC foi utilizado na dose de 100mg/kg/dia via IP aplicado lentamente, dividido de 12/12h.

Nos controles foi utilizado placebo (água destilada) via IP.

Após a inoculação, os animais foram observados diariamente, duas vezes ao dia.

O tratamento foi iniciado quando do início dos sinais. A duração do tratamento foi programada para até no máximo 4 dias.

Os grupos foram assim distribuídos:

Quatro grupos constituídos de seis hamsters cada, a seguir:

Grupo infectados- não tratados: verificação da doença letal aguda.

Grupo-AMP: inoculação da cepa e tratamento com ampicilina. Verificou-se a eficácia do antibiótico, em relação a tecidos-alvo, correlacionando-os aos infectados-não tratados.

Grupo-NAC: inoculação da cepa e tratamento com NAC. Verificou-se a eficácia do antioxidante, em relação a tecidos-alvo, correlacionando com os infectados-não tratados

Grupo AMP+NAC: inoculação da cepa e tratamento com ampicilina associada ao NAC. Analisou-se a eficácia em tecidos-alvo, correlacionando-os aos infectados-não tratados.

3.9.2 Experimento 2

Objetivando a reprodução de doença letal aguda, forma de evolução bifásica, selecionou-se inóculo de 10^3 leptospiras introduzindo-se terapêutica em dias determinados, sem respeitar o início dos sinais. Esta forma de evolução tem um curso prolongado ou bifásico, respeitando um período de leptospiremia, e após a fase imune.

Experimentos anteriores com esta cepa e este inóculo, referiram que a data estimada do óbito após a inoculação foi de 10 a 11 dias, e que o surgimento dos sinais iniciais variou do 6º ao 8º dia, após a inoculação, sendo a terapêutica introduzida em dias determinados, a partir do sexto dia pós a inoculação (Athanzio, 2005).

A introdução tardia da terapêutica é muito discutida, em relação à redução da morbidade, e da presença de leptospiras sistêmica e nos tecidos.

Neste estudo, 18 hamsters foram divididos em 2 grupos com subgrupos

Utilizou-se ensaio terapêutico com antibiótico, sem e com NAC.

A ampicilina foi utilizada em dias propostos, com dose menor que no experimento 1, de 80mg/kg dia, dividida de 12/12h, via IM. O NAC foi utilizado na dose de 100mg/kg/dia via IP, de 12/12h. A introdução tardia da terapêutica foi efetuada para observarmos se ocorreria alteração na morbidade, e da presença de leptospiras nos tecidos. Assim como a dosagem de ampicilina foi diminuída para observarmos um possível efeito do antioxidante.

Os controles utilizaram placebo (água destilada) IP, 1 ml.

Após a inoculação de 1ml IP de 10^3 leptospiras/ml, os animais foram observados diariamente, duas vezes ao dia.

Os grupos estudados foram assim distribuídos: um grupo denominado “1” com inoculação da cepa e início do tratamento no 6º dia após a inoculação, com duração de 4 dias, e eutanásia no 10º dia, e um grupo denominado “2” com início do tratamento no 8º dia após a inoculação, e eutanásia no 11º dia. Com a menor duração de tratamento e início no 8º dia, analisou-se muito próximo à data estimada do óbito se ocorreu eficácia com o antibiótico, e com o uso de ampicilina associada ao NAC.

Os grupos distribuídos foram:

Grupo infectados- não tratados1 : Grupo infectados que não receberam tratamento, verificação da doença letal aguda.

Grupo-AMPI1- inoculação da cepa e tratamento com ampicilina. Verificou-se a eficácia do antibiótico, em relação a tecidos-alvo, correlacionando-os aos infectados-não tratados1.

Grupo NAC1 - inoculação da cepa e tratamento com NAC. Verificou-se a eficácia do antioxidante, em relação a tecidos-alvo, correlacionando-os aos infectados-não tratados1.

Grupo AMP+NAC1- inoculação da cepa e tratamento com ampicilina associada ao NAC. Analisou-se a eficácia do antibiótico associado ao antioxidante, em relação a tecidos-alvo, correlacionando-os aos infectados-não tratados1.

Grupo AMP2- inoculação da cepa e tratamento com ampicilina em menor dosagem e início de tratamento mais tardio. Analisou-se a eficácia do antibiótico em relação a tecidos-alvo, correlacionando-os aos infectados-não tratados1, com início de tratamento mais tardio.

Grupo AMP+NAC2 - inoculação da cepa e tratamento com ampicilina menor dosagem e início de tratamento mais tardio associada ao NAC. Analisou-se a eficácia do antibiótico associado ao antioxidante, em relação a tecidos-alvo, correlacionando-os aos infectados-não tratados1.

3.10 Análise Estatística

Os dados foram apresentados com médias e desvios padrão. Testes não paramétricos de Kruskal-Wallis foram utilizados para comparar os dados laboratoriais entre os grupos.

A comparação entre dois grupos independentes foi realizada através de testes não paramétricos Mann-Whitney. Foi considerado como diferença significativa os grupos que obtiveram $p < 0.05$. O programa utilizado foi o SPSS (SPSS Inc., Chicago)

4. Resultados

O estudo mostrou diferenças de resultados nos Experimentos 1 e 2, quando comparados os animais infectados (não-tratados), com os animais tratados.

A análise bioquímica (uréia, bilirrubina total e TBARS), histopatologia (H&E), imunohistoquímica com marcação de *Leptospira* e com marcação de NHE-3 e NKCC2 em respectivos locais no túbulo renal, apresentaram diferenças.

Os animais referidos como Grupo infectado , não tratados, foram os mesmos que reproduziram a caracterização do modelo de doença letal aguda, em ambos os experimentos. Os parâmetros utilizados para caracterizar a validação do grupo não tratado, foram alterações histopatológicas características de leptospirose aguda no H&E, caracterização de antígenos de leptospira na imunohistoquímica, ambos focalizando rim, pulmão e fígado.

A presença de antígenos de leptospira foi demonstrada em ambos os experimentos, sendo mais evidente no E1. Em todos os tecidos analisados de animais tratados houve redução ou ausência de leptospiros. Na imunohistoquímica, com análise semi-quantitativa em cruces, a presença de antígenos de *Leptospira* foi observada em coloração marrom, em rim, pulmão e fígado. Em todos os animais observamos a presença do antígeno na análise semi-quantitativa, nos tecidos que variou de 2 a 3 cruces, com maior identificação do antígeno no fígado, e rim, e menor no pulmão. A utilização do NAC não adicionou qualquer efeito à ampicilina em ambos os experimentos.

A expressão dos anticorpos NHE3 e NKCC2 no tecido renal em suas respectivas localizações, em coloração marrom, foi demonstrada através de análise semi-quantitativa, comparando animais infectados não tratados com animais tratados e também em relação à animais não infectados, normais. A utilização do NAC não adicionou qualquer efeito à ampicilina em ambos os experimentos.

4.1 Hematoxilina-eosina (H&E) e Imunohistoquímica com marcação de *Leptospira* nos tecidos nos Experimento 1 e 2

4.1.1 Tecido renal

Em animais infectados, não tratados demonstrou-se necrose tubular aguda em ambos os experimentos, sendo mais evidente a nefrite intersticial no E2. Em animais tratados, lesões incipientes no tecido renal se aproximando da normalidade foram observadas (Figura 1).

Na imunohistoquímica, em animais infectados não tratados ambos mostraram leptospiros com coloração marrom no tecido renal, variando de 2 a 3 cruces nos experimentos 1 e 2. Em animais tratados houve redução ou desaparecimento de leptospiros no tecido (Figura 2).

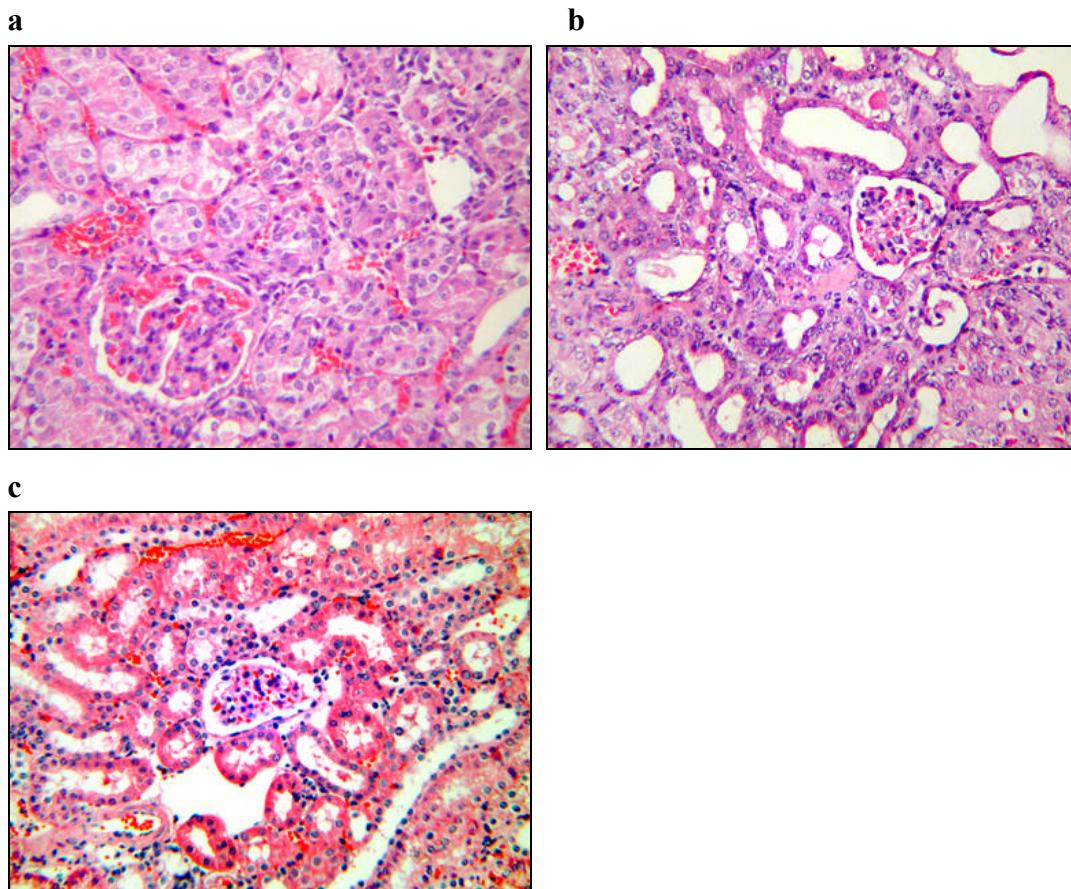


Figura 1 – Histopatologia de tecido renal de animais infectados não tratados. a e b: Experimentos 1 e 2 respectivamente, e c: animal tratado do E1

a: detalhe de área de necrose tubular aguda focal, com interstício e glomérulos congestionados (H&E-200X); b: detalhe de necrose tubular aguda, e nefrite intersticial (H&E-200X); c: rim de aspecto praticamente normal, exceto pela presença de um túbulo revestido por células epiteliais baixas, sugerindo necrose tubular aguda discreta (H&E-200X)

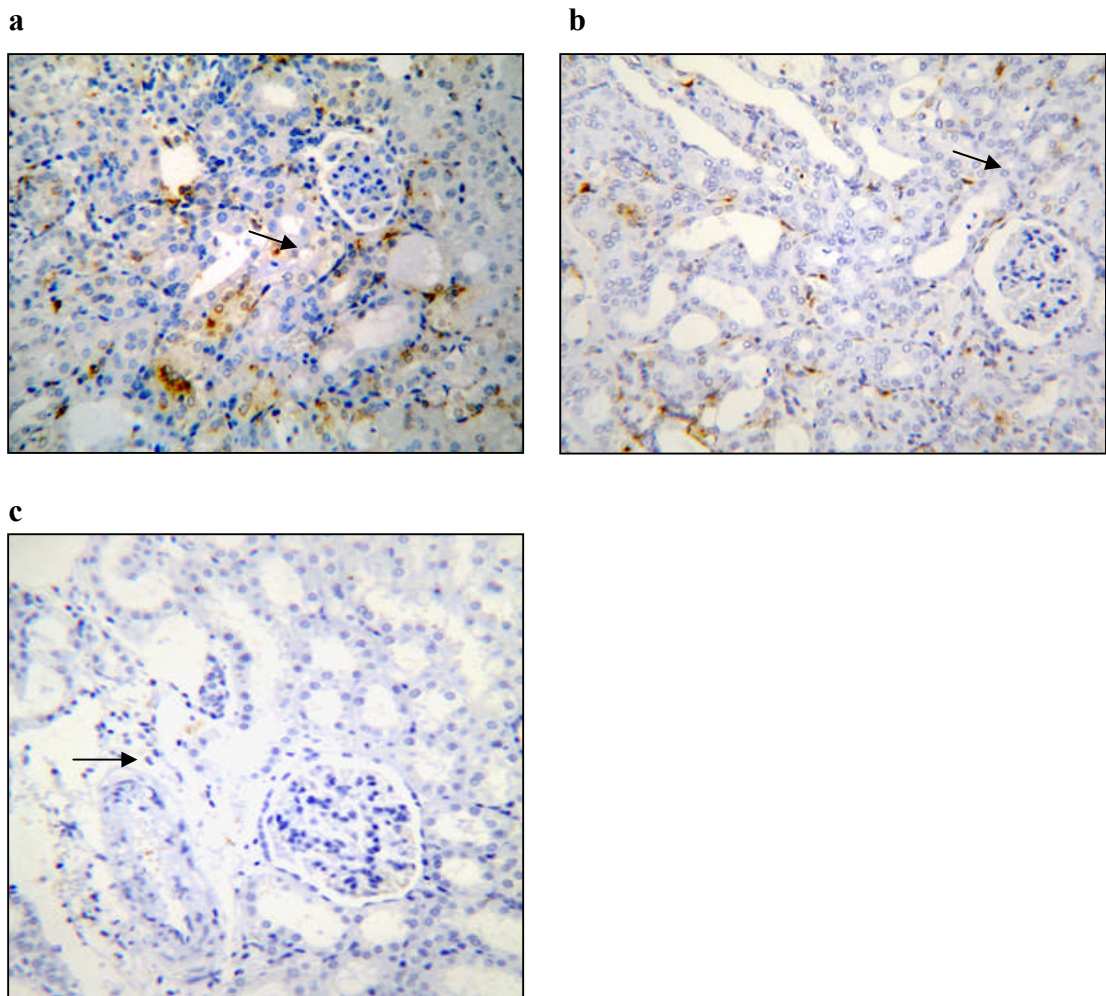


Figura 2 – Imunohistoquímica (IH) com marcação de *Leptospira* em tecido renal de animais infectados não tratados. a e b: Experimentos 1 e 2 respectivamente. c: animal tratado do E2

a: acúmulo de antígenos de leptospira no interstício do rim e no citoplasma das células inflamatórias (+++) (IH-200X); b: Observou-se depósitos de antígenos de *Leptospira* distribuídos ao longo do tecido em coloração marrom (+++) (IH-200X). No animal tratado com ampicilina foi verificada presença de raras leptospiros (IH-200X)

4.1.2 Tecido pulmonar

Em animais infectados não tratados demonstrou-se hemorragia intraalveolar em ambos os experimentos, mais evidente, no E1. Em animais tratados, reação aguda do interstício foi observada (Figura 3).

A presença de antígenos de leptospira foi demonstrada em ambos os experimentos, sendo mais evidente no E1. Em todos os tecidos de animais tratados houve redução ou ausência de leptospiras (Figura 4).

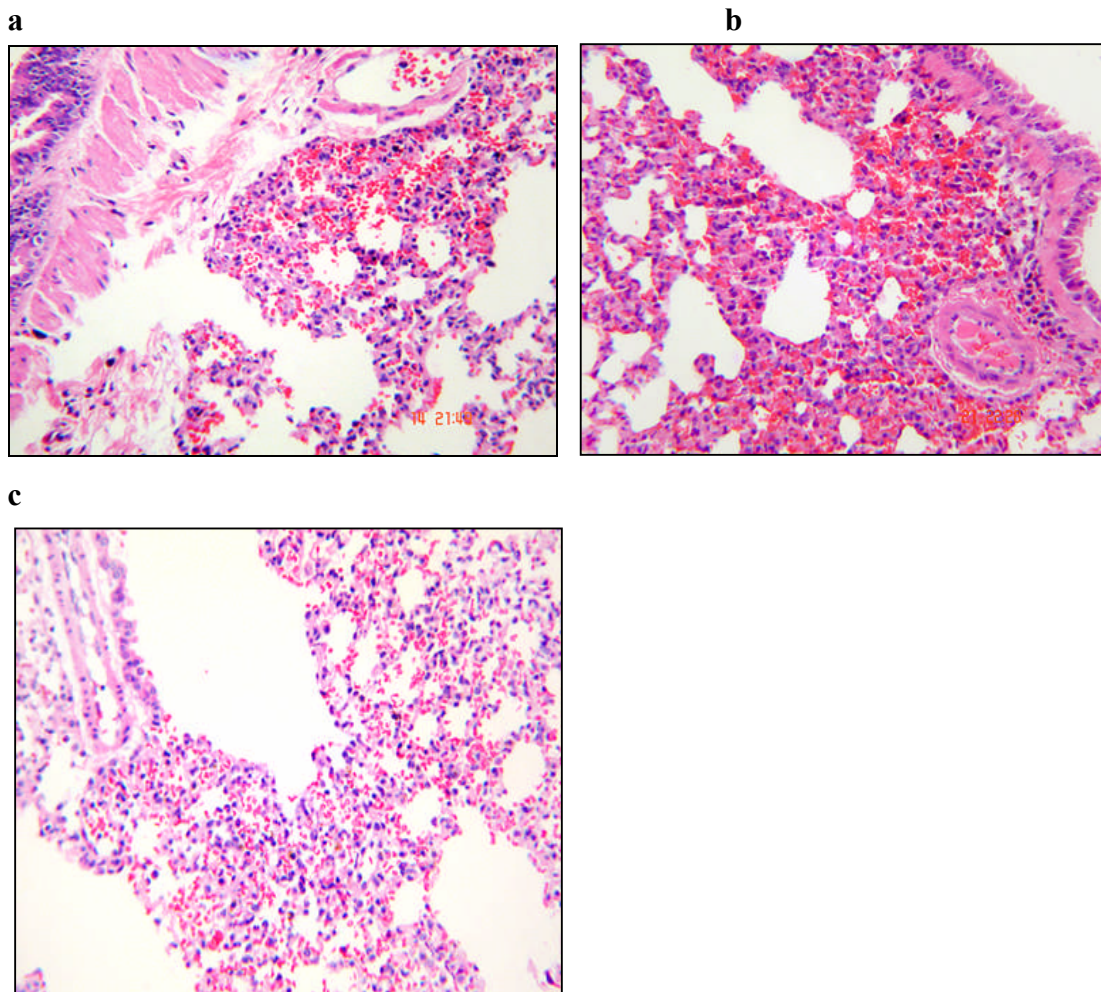


Figura 3 – Histopatologia de tecido pulmonar de animais infectados não tratados. a e b: Experimentos 1 e 2 respectivamente. c: animal tratado do E1
a: verificou-se aspecto de pneumopatia hemorrágica. Na periferia de um brônquio, grupos de alvéolos com hemácias na luz, reação aguda discreta do interstício pulmonar (H&E-200X);
b: Ressaltou-se hemorragia pulmonar importante com lesão em interstício;
c: reação no interstício pulmonar (H&E-200X)

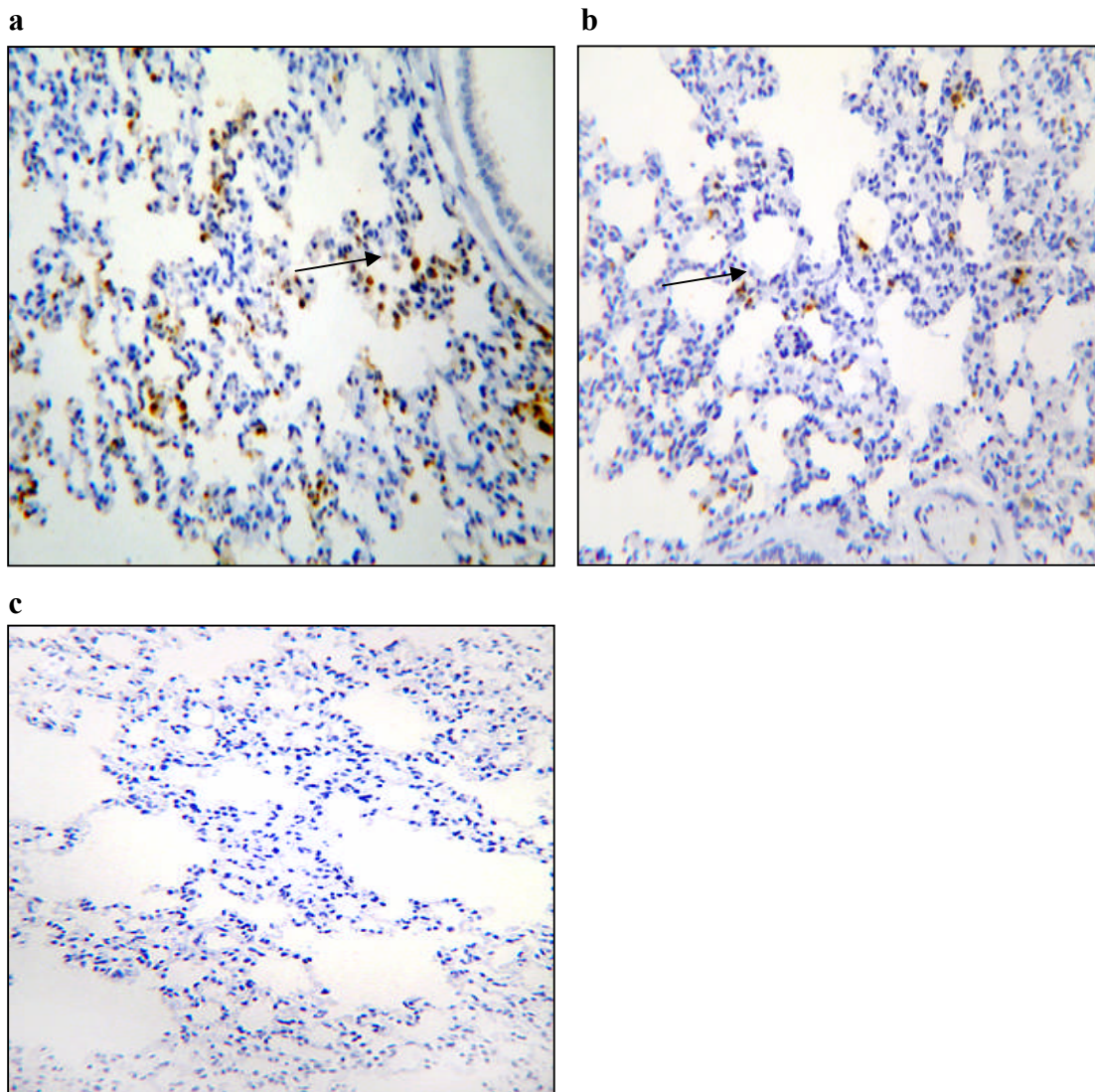


Figura 4 – Imunohistoquímica (IH) com marcação de *Leptospira* em tecido pulmonar de animais infectados não tratados. a e b: Experimentos 1 e 2 respectivamente. c: animal tratado do E2

a: junto ao brônquio, células inflamatórias com antígeno de leptospira no citoplasma de células mononucleares junto ao revestimento alveolar, com coloração marrom (+++) (IH-200X); b: nota-se, grupos de macrófagos com depósito antigênicos na luz dos alvéolos (+++) (IH-200X); c: nulidade de leptospiros

4.1.3 Tecido hepático

Em animais infectados, não tratados demonstrou-se alterações hepáticas compatíveis com Leptospirose (Figura 5).

A presença de antígenos de leptospira foi demonstrada em ambos os experimentos, sendo mais evidente no E1. Todos os tecidos de animais tratados houve redução ou ausência de leptospiras (Figura 6).

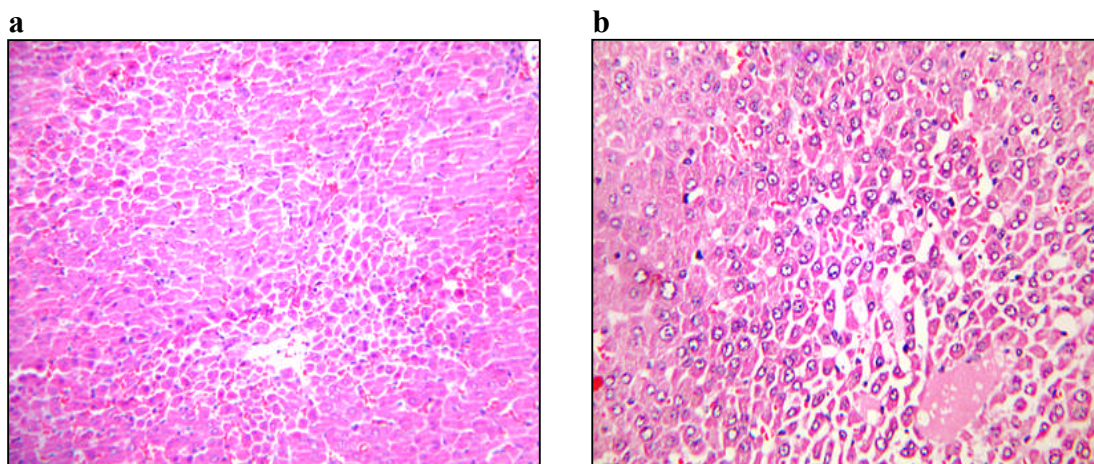


Figura 5 – Histopatologia de tecido hepático de animais infectados não tratados. a e b: Experimentos 1 e 2 respectivamente.

a e b: observou-se grande área de destrabeculação de hepatócitos na área III (centrolobular), e sinusóides congestos (H&E-200X).

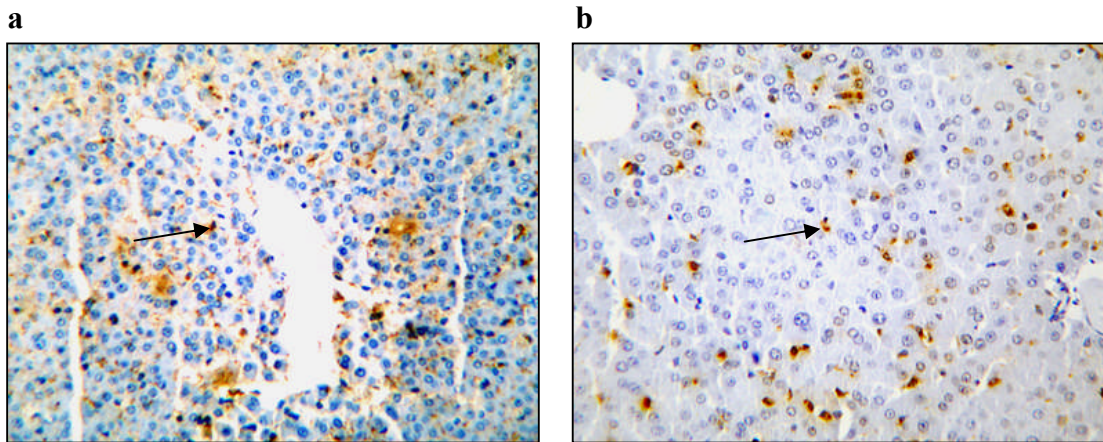


Figura 6 – Imunohistoquímica (IH) com marcação de *Leptospira* em tecido hepático de animais infectados não tratados. a e b: Experimentos 1 e 2 respectivamente.

a: depósitos de antígeno em células mononucleares fagocíticas. Depósito focal de antígeno sobre a membrana de hepatócito na área III.(+++)(IH-200X); b: depósitos de antígeno em células mononucleares fagocíticas (++) (IH-200X)

Sumariando, validou-se a caracterização do modelo, ressaltando-se a mimetização da leptospirose de humanos, demonstrada com principais lesões características da leptospirose em órgãos como pulmão, rim e fígado, assim como a presença de antígenos de leptospira, nestes locais.

4.2 Imunohistoquímica com marcação de anticorpo NHE3 e NKCC2 nos Experimentos 1 e 2 . Comparação entre animais infectados não tratados e tratados: análise semi-quantitativa.

4.2.1 Tecido renal: Anticorpos NHE-3 e NKCC2

Verificou-se que os animais dos grupos infectados não tratados, no E1 e E2, apresentaram diminuição da marcação do anticorpo NHE-3 em coloração marrom, junto à membrana apical, dos túbulos proximais. Nos animais tratados observou-se uma expressão muito aumentada em relação ao animal não tratado, mais evidente no E1. Não houve diferença quanto a associação com o NAC (Figura 7). Observou-se uma expressão aumentada em relação ao tecido renal do animal normal não infectado (Figura 7).

Em relação ao NKCC2, junto à membrana apical das células da porção espessa ascendente da alça de Henle, houve diminuição da atividade em animais infectados, aumentando ou revertendo a expressão em animais tratados (Figura 8). Não houve diferença quanto a associação com o NAC.

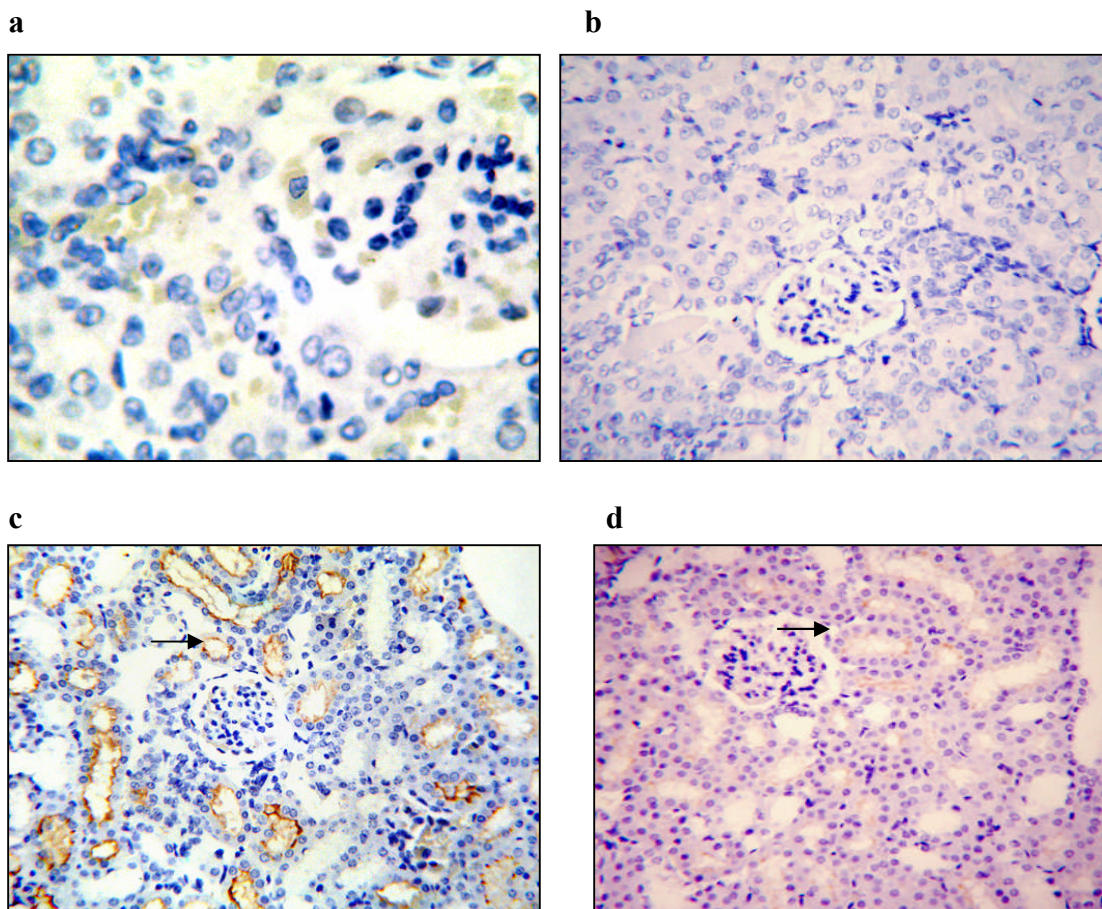


Figura 7 – Imunohistoquímica (IH) com marcação de NHE3 em tecido renal de animais infectados não tratados. a e b: Experimentos 1 e 2 respectivamente. c e d: animais tratados do E1 e E2 respectivamente

a :animais infectados no E1 mostrando diminuição do NHE3 na parte apical das células do túbulo proximal (+) (IH-400X); b: NHE3 não mostrando expressão no E2 (IH-200X); c: aumento da expressão do NHE3 no E1(+++) (IH-200X); d: discreto aumento do NHE3 no E2 (++) (IH-200X)

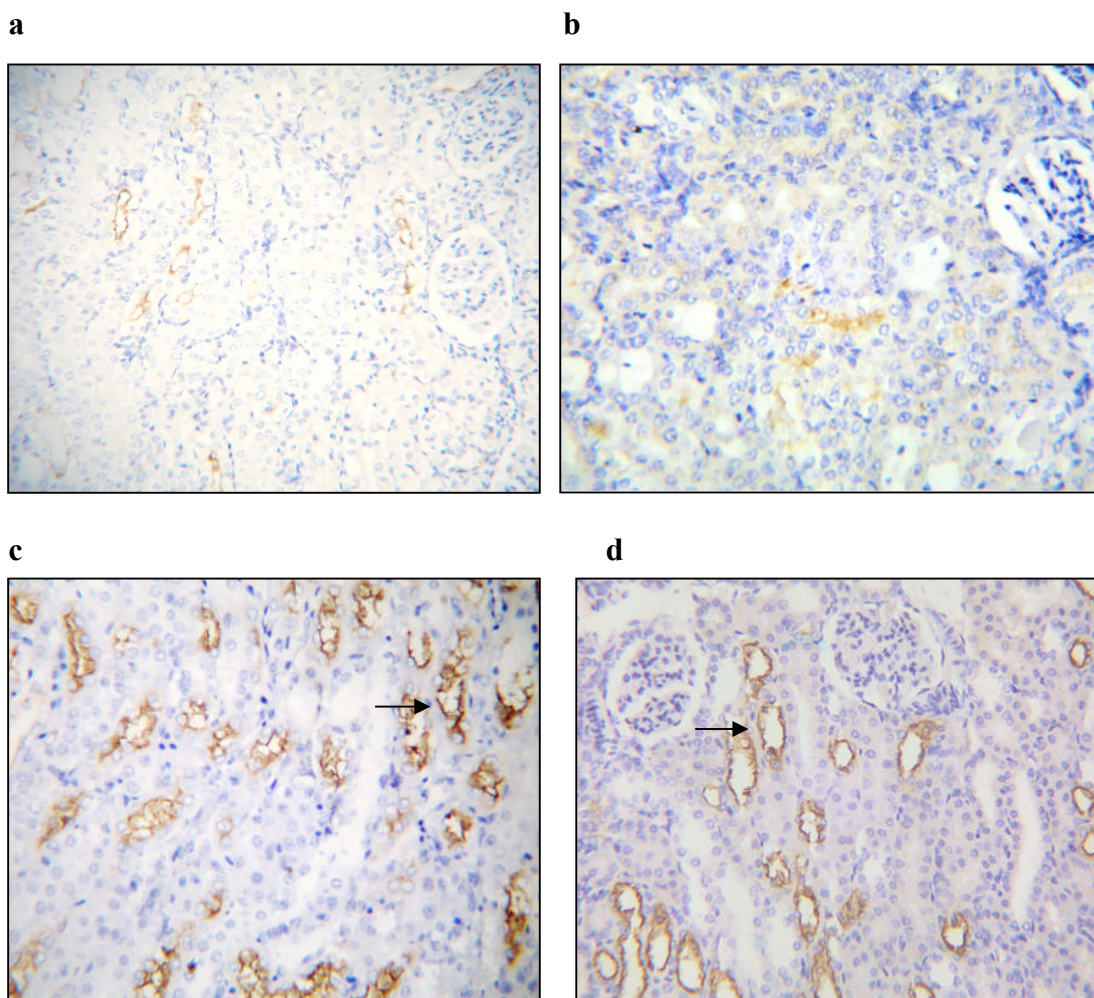


Figura 8 – Imunohistoquímica (IH) com marcação de NKCC2 em tecido renal de animais infectados não tratados. a e b: Experimentos 1 e 2 respectivamente. c e d: animais tratados do E1 e E2 respectivamente

a :animais infectados no E1 mostrando diminuição do NKCC2 junto à porção espessa da alça de Henle(+) (IH-200X); b: NKCC2 com expressão diminuída no E2(+) (IH-360X); c: aumento da expressão do NKCC2 no E1(+++) (IH-360X); d: NKCC2 no E2 (++) (IH-200X)

4.3 Imunohistoquímica com marcação de anticorpo NHE3 e NKCC2 em animais normais, não infectados.

4.3.1 Tecido renal: Anticorpos NHE-3 e NKCC2

Verificou-se que a marcação nos locais específicos em hamsters não infectados (Figura 9).

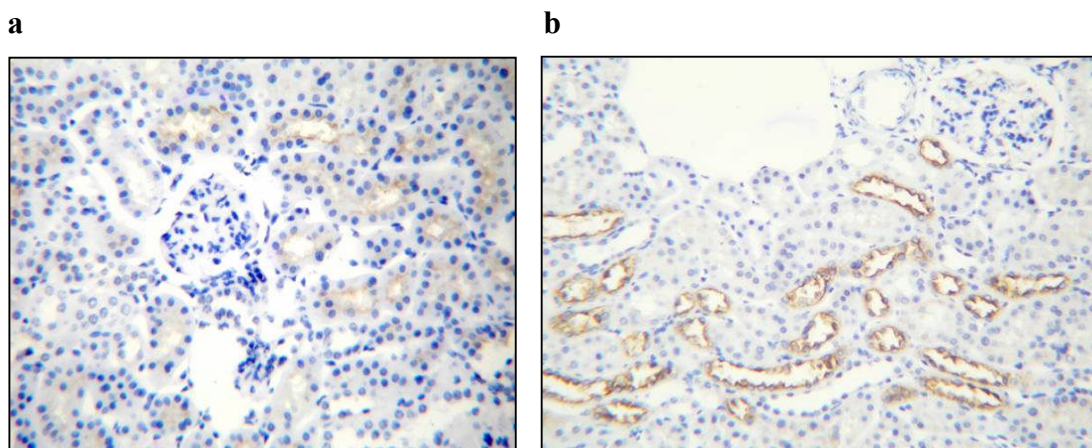


Figura 9 – Imunohistoquímica (IH) com marcação de NHE3 e NKCC2 em tecido renal de animal normal não infectado. a e b: respectivamente

a: animal normal mostrando marcação de NHE3 na parte apical das células do túbulo proximal (IH-200X); b: animal normal com marcação de NKCC2 junto à porção espessa da alça de Henle (IH-200X)

Este estudo sugere que com a doença, pode ocorrer diminuição do NHE3 e do NKCC2, e que com o tratamento, ocorreu uma recuperação de ambos, se aproximando da normalidade. Com o tratamento mais tardio houve menor restabelecimento da expressão.

4.4 Sinais

Os sinais e a ocorrência de óbito estão registrados na **Tabela 1**.

Febre, letargia e pêlos eriçados, ocorreram 36 horas após a inoculação no E1, e nove dias após a inoculação no E2.

A icterícia foi verificada na mucosa ocular no quarto dia, bem como a hemorragia na narina e na mucosa vaginal no E1. No E2, os animais não apresentaram hemorragia, sendo o sinal mais comum pêlos eriçados.

No experimento 1 em 50% dos animais infectados não tratados ocorreram óbitos, e no E2 nenhum óbito em animal infectado não tratado. Nos animais tratados no E1 não observou-se óbitos, mas no E2, 2 óbitos foram observados, um deles no tratamento tardio com ampicilina (Tabela 1).

Tabela 1 – Ensaio terapêutico com Ampicilina, NAC, isolados e associados, segundo sinais e óbitos, em hamsters inoculados.

	Febre	Hemorragia	Prostração	Icterícia	Pêlos eriçados	Óbitos
	n (%)	n (%)	n (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Experimento E1						
Grupos n = 6						
Infectado- não tratado	4/6 (67)	2/6 (33)	6/6 (100)	2/6 (33)	2/6 (33)	3/6 (50)
AMP	-	-	-	-	-	-
NAC	2/6 (33)	3/6 (50)	5/6 (84)	2/6 (33)	2/6 (33)	3/6 (50)
AMP+NAC	-	-	-	-	-	-
Experimento E2						
Grupos n = 3						
Infectado-não tratado(1)	1/3(33)	-	1/3(33)	-	2/3(67)	-
AMP(1)	-	-	-	-	-	-
NAC(1)	2/3(67)	-	2/3(67)	-	2/3(67)	-
AMP+NAC(1)	-	-	-	-	-	1/3(33)
AMP(2)	-	-	1/3(33)	-	1/3(33)	1/3(33)
AMP+NAC(2)	-	-	1/3(33)	-	1/3(33)	-

AMP (grupo tratado com ampicilina), NAC (grupo tratado com N-aceticisteína), e AMP+NAC (grupo tratado com ampicilina e N-acetilcisteína); (1)-animais tratados no sexto dia após inoculação E2, (2)animais tratados no oitavo dia após inoculação E2.

4.5 Análise macroscópica no momento da necrópsia

Nos animais infectados não tratados do E1 e E2, verificou-se hemorragia pulmonar em todos os lóbulos pulmonares, mais evidente no E1, e no rim observou-se friabilidade. Nos Grupos tratados não foi demonstrado sinal de hemorragia pulmonar e alteração renal.

Portanto, os grupos tratados com ampicilina e ampicilina e NAC, não mostraram quaisquer alterações significativas pulmonares e renais entre eles.

4.6 Análise semi-quantitativa com marcação de antígeno de leptospira, transportadores renais, e sinais nos Experimentos 1 e 2

Foi realizada análise semi-quantitativa com comparação dos tecidos renais de animais infectados não tratados e tratados em lâminas individuais. Objetivou-se demonstrar a presença da leptospira quando da diminuição dos transportadores renais, e em animais tratados diminuição ou nulidade de Leptospiras com restabelecimento da expressão dos transportadores (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise semi-quantitativa de Antígeno de Leptospira, NHE3 e NKCC2

Experimento 1 animais	Grupos	Leptospira/ tecido renal	NHE3	NKCC2	Sinais de hemorragia	Febre	Óbito
G1A1	Não tratados	não realizado	-	-	não	sim	sim
G1A2		+++	0	+	não	sim	não
G1A3		+++	0	+	sim	sim	não
G1A4		+++	+	+	não	não	não
G1A5		não realizado	-	-	sim	não	sim
G1A6		+++	0	+	não	sim	sim
Experimento 2 Animais							
G1A1	Não tratados	++	0	+	não	não	não
G1A2		+++	+	0	não	sim	não
G1A3		+++	+	+	não	não	não
Experimento 1 animais		Leptospira/ tecido renal	NHE3	NKCC2	Sinais de hemorragia	febre	óbito
G2A1	Tratado com AMP	-	+++	++	-	-	-
G2A2		-	++	++	-	-	-
G2A3		-	+++	+	-	-	-
G2A4		-	++	++	-	-	-
G2A5		-	+++	+	-	-	-
G2A6		-	++	++	-	-	-
Experimento 2 Animais							
G2A1	Tratado com AMP 1	+	+++	++	-	-	-
G2A2		-	++	+	-	-	-
G2A3		+	++	++	-	-	-
G2A1	Tratado com AMP 2	+	+	+	-	-	sim
G2A2		-	++	+	-	-	-
G2A3		+	++	+	-	-	-

Notar:: Não tratados – infectados sem tratamento; AMP : tratados com ampicilina do E1;

AMP 1: tratados com ampicilina do E2, início seis dias após a inoculação; AMP 2: tratados com ampicilina do E2 início no oitavo dia pós inoculação

4.7 Dosagens bioquímicas

Procedeu-se dosagem de Uréia (U) mg/dl, e de Bilirrubina Total (BT) mg/dl de todos os Grupos, nos Experimentos 1 e 2, correlacionando-as, além da dosagem do TBARS no E1. Os valores foram expresos em média e desvio padrão.

Uréia: Nos E1 e E2, nos animais infectados não tratados os valores de uréia foram: 412 ± 150 mg/dl e 392.5 ± 57 mg/dl respectivamente, tendo significância, em relação aos animais tratados com AMP: 63 ± 18 mg/dl, e 102 ± 9 mg/dl, e AMP+NAC: 62 ± 04 mg/dl e 98 ± 10 mg/dl respectivamente. $p < 0.005$. Não houve diferença entre o grupo infectado não tratado e o grupo tratado somente com NAC.

BT: No E1 e E2, os valores de bilirrubina total de animais infectados não tratados foram: 11 ± 2.8 mg/dl e 17 ± 3.5 mg/dl respectivamente, sendo significativamente mais elevados do que os tratados com AMP e AMP + NAC em ambos os experimentos pois estes apresentaram valores < 1.0 mg/dl. $p < 0.005$ Não houve diferença entre o grupo infectado não tratado e o grupo tratado somente com NAC.

TBARS: No E1, nos animais infectados, os níveis de TBARS foram 17.6 ± 7.2 μ mol/L, sendo mais elevados do que os tratados com AMP: 3.1 ± 1.62 μ mol/L, AMP+NAC: 2.1 ± 1.2 μ mol/L e apenas com NAC 3.2 ± 1.7 μ mol/L $p < 0.005$

Resumindo, o Experimento 1, caracterizou o modelo de leptospirose, mostrado através da histologia (H&E) e verificou-se a presença de antígenos de leptospiras. Na análise bioquímica observou-se níveis elevados de uréia nos controles positivos.

A dosagem de TBARS (estresse oxidativo), esteve muito elevada em relação a animais normais, e ao próprio animal prévio a inoculação.

Quanto a terapêutica percebeu-se que em quase todos os parâmetros, a utilização de Ampicilina e Ampicilina com NAC, mostrou-se eficaz, sem diferença entre estes.

5. Discussão

Após a descrição da Leptospirose, por Weil em 1886 (Weil, 1886), vários estudos experimentais em animais, e em humanos foram desenvolvidos.

Estudos em humanos e experimentais comprovaram através de técnicas de identificação de leptospiros nos tecidos, o tropismo desta, acarretando lesões características principalmente em órgãos como pulmão, rim, fígado, baço e miocárdio (Arean, 1962a; Arean, 1962b; Alves et al., 1992; Oliva et al., 1994; De Brito et al., 2006).

Nosso estudo experimental de Leptospirose em hamster, foi proposto com o intuito de mimetizar a Leptospirose, doença de Weil de humanos, verificando uma combinação de manifestações que incluem lesões destes órgãos específicos, conduzindo a icterícia, insuficiência renal, hemorragia, mais comumente a pulmonar, miocardite e choque, já comumente descritos (Levett, 2001; McBride et al., 2005; Spichler et al., 2005; Ricaldi e Vinetz, 2006).

No presente estudo, para análise mais detalhada, e para estudo de comprovação da existência da *Leptospira* ou seus produtos nos locais específicos, uma combinação de análise funcional, histopatológica e de apropriada metodologia de demonstração da leptospira proporcionou resultados integrados, e mais completos, com possibilidade de serem reproduzidos.

Neste trabalho, para a mimetização da doença de humanos, num modelo experimental, a avaliação clínica, laboratorial e sorológica é fundamental, mas a

comprovação ao nível microscópico, das lesões, através de histologia, análise celular, identificação da espiroqueta nos tecidos ou em culturas, permite estudos mais específicos com posterior intervenção, objetivando nova abordagem, com melhora do prognóstico e diminuição da letalidade.

Arean em 1962, iniciou esta investigação, realizando estudo com autópsias de pacientes com leptospirose, em Porto Rico. Nestas, verificou icterícia com graus variados; fígado com desorganização hepática, rins congestos com edema intersticial, lesão tubular renal de acordo com o período da doença, com pulmão congesto, e hemorragia grave em 60% dos pacientes (1962).

Em 2006, De Brito et al, igualmente em autópsias de pacientes no Brasil, comprovaram lesões semelhantes e apontaram para histopatologia compatível no pulmão com hemorragia pulmonar, no rim, nefrite intersticial focal, e no fígado uma desorganização do espaço- porta completa ou parcial. Neste momento, com técnicas mais precisas da identificação das leptospiras nos tecidos, constataram que não houve muita diferença na histopatologia comparativa de 1962. Os pacientes são de regiões diferentes, mas os autores observaram que recentemente ainda ocorrem óbitos por Leptospirose, e os órgãos são acometidos de maneira similar (2006).

Neste estudo em hamster, produzimos a mimetização através da inoculação com a *L. Interrogans* Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, que geralmente acarreta a forma grave. Estes achados que ocorrem em humanos, comprovam o modelo de doença grave, como já demonstrado por Arean e De Brito (1962b; 2006).

No nosso estudo realizamos, análise funcional, histopatológica, e concomitante verificação da *Leptospira* nos tecidos citados. Arean realizou estudo

funcional e morfológico, com demonstração do modelo experimental de doença grave em cobaias, assemelhando-se em parte ao nosso estudo (Arean, 1962b).

Após analisarmos o mecanismo de lesão tubular renal, com enfoque nos transportadores tubulares, avaliamos a intervenção terapêutica antibiótica com análise dos parâmetros mencionados.

Vários modelos experimentais de Leptospirose foram relatados em diferentes hospedeiros suscetíveis. Porém, cobaia e hamster foram os modelos mais estudados para patogênese renal, pulmonar e hepática (Arean, 1962a; Davila de Arriaga et al., 1982; Alves et al., 1992; Nally et al., 2005).

Estudos de tratamento e de imunoproteção foram mais relatados em hamster, ambos mimetizando a doença grave de humanos (Miller et al., 1974; Alexander et al., 1986; Oliva et al., 1994; Alt e Bolin., 1995; Barnett et al., 1999, Truccolo et al., 2002).

Selecionamos o modelo de hamster, por ser suscetível, desenvolver doença grave e principalmente por também ter sido realizada intervenção terapêutica.

Estudos prévios utilizaram cepas e inóculos diferenciados. Quando utilizou-se tratamento, este foi referido com antibióticos diversos, dia de início, duração de tratamento e vias de administração diferenciadas, além de observação clínica, em alguns estudos pertinentes.

Propusemos a verificação de dois modelos de doença grave, com lesão nos órgãos acometidos na leptospirose, realizados através de dois experimentos, experimento 1 (E1) e experimento 2 (E2). No primeiro, foi proposto doença muito grave, aguda e progressiva, e no segundo, uma lesão grave, mas com periodicidade do agravo mais lenta, podendo se comparar a uma doença “bifásica”. Como em humanos a doença de Weil pode ter formas de evolução diferentes, mimetizamos as duas formas.

Para comprovar que os achados experimentais confirmam a doença, realizamos nos dois experimentos, dois modelos de animal infectado sem tratamento, com inoculação de *L. Interrogans* Copenhageni L1-130, sempre respeitando o valor acima da dose letal (DL) 50%.

No presente estudo, a eutanásia foi programada de acordo com experimentos anteriores em hamster inoculados com esta mesma cepa, sugerindo, o dia provável do óbito para cada inoculo (Athanasio, 2005).

Foram analisadas avaliação funcional através de bioquímica, investigação histopatológica (através de H&E) de tecidos, como rim, pulmão e fígado, com destaque para as lesões mais específicas, e a demonstração de leptospiras nestes tecidos através de Imunohistoquímica (IH).

Existem várias metodologias para detecção de leptospiras nos tecidos. Entre elas, a cultura de tecido, porém as leptospiras exibem um crescimento lento e potencial para contaminação em culturas; a impregnação pela prata através da técnica de Warthin-Starry, que tem variabilidade dos resultados com relatos de baixa sensibilidade e especificidade; hibridização “*in situ*”; técnicas de PCR semi-quantitativo e Real Time PCR; e imunoperoxidase entre outras (Truccolo et al., 2002; De Brito et al., 2006).

A imunoperoxidase, é um método fidedigno que identifica os antígenos da *Leptospira* em tecidos (Yasuda et al., 1986). No tecido renal, observou-se depósitos de antígenos no citoplasma, e também na membrana tubular luminal (De Brito et al., 2006). Depósitos em citoplasma também foram observados em tecido pulmonar e hepático.

Em estudos prévios Oliva et al, avaliaram a atividade letal em modelo de hamster, de cepas como Canicola, Icterohaemorrhagiae, e Pomona, serovares mais prevalentes no local. Com inóculos que variaram de 3.8×10^6 a 6×10^7 leptospiras, realizaram observação clínica dos animais, com a necrópsia programada após o sétimo dia de inoculação, e com análise histopatológica. Esta mostrou alterações de hemorragia e congestão em todos os tecidos com graus variados, dependendo da cepa. (1994) Rins apresentaram-se com alteração de degeneração do epitélio tubular e hemorragia; pulmão com congestão e hemorragia, e o fígado com perda da arquitetura do tecido. A demonstração da *Leptospira* nos tecidos foi através da análise semi-quantitativa por método Warthym-Starryn, com evidência de leptospiras em todos os órgãos mencionados (Oliva et al., 1994).

Miller et al, realizaram experimento com hamster, e com a cepa *L. interrogans* Icterohamorrhagiae cepa SC 2165, inoculando-os com 1×10^8 leptospiras, e com períodos de sacrifício programados, variando de duas horas após a inoculação até noventa e seis horas. Após 2 horas, observaram através de cultura de sangue e tecidos, que no sangue, assim como no rim e no fígado já existia presença de leptospiras, com maior quantidade no fígado. Com noventa e seis horas após a inoculação, este número aumentou, e sempre existindo em maior concentração no tecido hepático. Em relação ao pulmão, lesões como hemorragia, e lesão de capilar pulmonar, foram observadas em 50% dos animais mesmo antes da presença da leptospira, após 12 horas de inoculação. Provavelmente no pulmão ocorreu menor lesão direta, em comparação com rim e fígado (Miller et al., 1974).

Barnett et al, realizaram experimentos em hamster com a cepa *L. kirschneri* serovar Grippothyposa cepa RM52, com inóculos que variaram de 10^2 a 10^6 , com

eutanásia programada para 10 e 28 dias após a inoculação. A dose letal 50% desta cepa era 10^2 .

Dez dias após a inoculação, as leptospiros já estavam localizadas no lúmen tubular, com achados de lipoproteínas LiPL41, LPS e OMPL1 neste local, e com LPS também no citoplasma da célula epitelial proximal. Poucos antígenos foram verificados no interstício. Porém, estes apareceram com 28 dias após a inoculação. A migração das leptospiros provavelmente ocorreu do lúmen tubular para o interstício (Sitprija et al., 1980; Barnett et al., 1999; Sitprija e Kearkiat, 2005).

Uma explicação aventada é a de que a célula epitelial lesada, pode resultar no aumento da permeabilidade à leptospira; ou através de um processo de vesículas endocíticas, ou por um transporte ativo do lúmen tubular para o interstício. Esta translocação da *Leptospira*, pode contribuir para a resposta inflamatória, e para a lesão renal na Leptospirose (Barnett et al., 1999).

Como estes estudos prévios foram individualizados, focalizando objetivos diferenciados, e com análise e técnicas diferenciadas, os experimentos propostos para o nosso objetivo, foi primeiro verificar doença letal aguda em hamster.

Escolhemos a cepa que gera doença letal aguda, e que provavelmente acomete de maneira similar, lesões em pulmão, rim e fígado. A discussão sobre os inóculos se baseou nos trabalhos prévios com outras cepas, e em recente estudo onde se utilizou a cepa em questão em hamster (Athanasio, 2005). Como já calculada a DL50%, nos inóculos propostos, nos baseamos nesta, e também nos dias programados de eutanásia no estudo prévio.

Nossa premissa foi de uma verificação mais geral das lesões renal e hepática, com bioquímica para análise de uréia, e bilirrubina total, estas selecionadas por

escassa quantidade sanguínea, até a análise mais específica, quase sempre referida nos estudos prévios.

Caso aventássemos analisar exatamente o momento das lesões nos órgãos, poderíamos ter realizado eutanásias seriadas com intervalos curtos. Desta forma saberíamos exatamente o momento da lesão, e provavelmente a quantidade de leptospira nos locais, visto que, em estudo prévio, duas horas após a inoculação, já foram identificadas leptospiras circulantes, e em doze horas, a lesão pulmonar (Miller et al., 1974).

Porém, assim como Barnett et al que analisaram os tecidos somente após dez dias, e Oliva et al, após sete dias da inoculação, nosso estudo optou por predizer que nos momentos escolhidos para a eutanásia, já ocorreriam as lesões nos órgãos, e não com realização de eutanásia diária ou em curtos períodos de tempo (Oliva et al., 1974; Barnett et al., 1999).

Os animais identificados como controle, ou seja infectados sem tratamento, para o nosso estudo de tratamento, foram os mesmos nos quais verificamos a comprovação da eficácia do modelo.

Como utilizamos dois inóculos diferentes, esperaríamos, lesões mais graves, e em menor tempo no E1, e provavelmente com maior número de Leptospiras. Porém, ambos apresentaram lesões da forma grave, e a presença da espiroqueta, já que o inóculo foi maior que a DL50% selecionada para esta cepa.

Portanto, no E1, comprovamos que o modelo foi eficaz analisando a bioquímica, em relação à insuficiência renal, com dosagem de uréia, no momento da eutanásia. Esta nestes animais se manteve muito elevada, acima do valor normal, sugerindo uma insuficiência renal grave.

Outra dosagem realizada foi a de bilirrubina total que também se manteve muito elevada em comparação aos valores normais.

No E1, tecidos renais apresentaram-se com lesões típicas de nefrite intersticial focal, com lesão tubular, principalmente de túbulo proximal, com mínima lesão glomerular.

O pulmão apresentou hemorragia intra-alveolar na maioria dos animais, com alvéolos apresentando hemácias na luz, e no fígado uma desorganização de hepatócitos, com destrabeculação dos espaços porta.

Na imunohistoquímica com análise semi-quantitativa, a verificação das leptospiros esteve presente em todos estes tecidos, distribuídas ao longo do tecido renal, e ao redor das células tubulares. No pulmão, demonstrou-se no interstício e ao redor dos alvéolos, e no fígado com apresentação semelhante.

No E2, comprovamos a eficácia do modelo por metodologias semelhantes, com uréia e bilirrubina muito elevadas em relação aos valores normais, indicando as mesmas considerações do E1. Na histologia, detectou-se mais a presença de lesões intersticiais, tanto no pulmão como no rim. Na imunohistoquímica, verificou-se menor quantidade de leptospiros, visto que o inóculo foi menor.

Como poucos estudos de patogênese em hamster foram relatados, verificamos apenas como uma metodologia complementar, alguns trabalhos de destaque em cobaias, para melhor entendimento da patogênese pulmonar (Nally et al., 2004), renal e hepática (Arean, 1962a; De Brito, 1968; Davila de Arriaga et al., 1982; Alves et al., 1992).

Na leptospirose, a lesão renal principal que ocorre é a nefrite túbulo-intersticial (Arean, 1962a; Alves et al., 1992; Levett, 2001; De Brito et al., 2006).

A nefrite, demonstrada em humanos, e em modelos experimentais ocorre mais relacionada com o tempo de sobrevivência do hospedeiro. A infiltração pode ser difusa ou focal, e LPS e proteínas da membrana externa, são encontrados no interstício renal, podendo contribuir para a nefrite (Sitprija et al., 1980; Alves et al., 1992; Barnett et al., 1999; Athanazio, 2005).

Após a comprovação em vários estudos, uma das explicações da nefrite, está relacionada às glicoproteínas da leptospira com produção de resposta inflamatória tardia (Alves et al., 1992).

Através de experimentos como os de Yang, proteínas da membrana externa de *L.shermani*, foram adicionadas à cultura de células da porção espessa medular renal ascendente de ratos. A adição de proteínas de *L.shermani* à esta cultura de células, induziu uma significativa ligação do DNA nuclear do fator NF- κ B, responsável por inflamação. Após 48 horas, a expressão de óxido nítrico, MCP1 e de TNF alfa aumentou. Este aumento, sugeriu uma adaptação hemodinâmica, de um mecanismo de vasodilatação protetor, ou aumento de lesões devido a produção de peroxinitrito e radicais livres. Os monócitos, participando da lesão com aumento do MCP-1 indicaram um envolvimento das proteínas de membrana da leptospira na nefrite. Quando realizado experimento semelhante com *Leptospira avirulenta* não ocorreu produção destes fatores (Yang et al., 2001; Yang et al., 2000).

A lesão tubular, é muito comum na insuficiência renal aguda na Leptospirose, envolvendo principalmente e primeiramente o túbulo proximal (Davila de Arriaga et al., 1982; Seguro et al., 1990; Barnett et al., 1999). Mas, estudos experimentais em cobaias mostraram lesões na junção córtico-medular (Davila de Arriaga et al., 1982, et al.), assim como outros questionam ou referem uma integridade do túbulo distal

(Sitprija et al.,1980; Magaldi et al.,1992). A presença de leptospiras e seus componentes diretamente relacionados com a membrana celular epitelial tubular também pode ser contribuinte da lesão renal.

Clinicamente, a insuficiência renal aguda, está associada a uma forma específica de disfunção tubular. Poliúria, hipocalemia, com elevada fração de excreção urinária de potássio, freqüentemente podem ser observadas (Seguro et al., 1990; Magaldi et al., 1992; Abdulkader et al., 1996; Sitprija et al., 2005).

Portanto, a lesão ocorre principalmente no túbulo proximal. A nefrite intersticial que surge em momentos diferentes da patogênese, também contribui para a inflamação. A presença da *Leptospira* gerando lesão direta, é um dos fatores contribuintes da patogênese (Davila de Arriaga., 1982; De Brito et al., 1987; Barnett et al., 1999).

Em nosso estudo, verificamos a presença da leptospira no tecido renal através de IH, com marcação do antígeno, utilizando-se um anticorpo policlonal. Observou-se por análise semi-quantitativa, que as leptospiras estavam presentes, distribuídas em todo o tecido renal, tanto no E1 como no E2.

Estudamos alguns dos transportadores que estiveram envolvidos nos mecanismos de distúrbios metabólicos e da poliúria comumente referidos na Leptospirose, atribuindo um mecanismo de lesão direta da cepa utilizada, provavelmente por alguns dos componentes da leptospira ou de sua lise.

No túbulo proximal, onde se verifica a maior reabsorção de sódio, e por ser o local onde existiria a maior concentração de leptospiras (estas podendo ou não gerar lesão direta), e a presença do trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (NHE3), responsável pela reabsorção de sódio, este poderia estar envolvido no mecanismo de poliúria e perda de sódio,

assim como num momento final, pela hipocalemia, que ocorre na leptospirose, caso a alteração se comportasse como um mecanismo de inibição.

Selecionamos a Imunohistoquímica análise semi-quantitativa com marcação do NHE3 no túbulo proximal. Verificamos a expressão deste trocador, comparando com a literatura em modelos experimentais, como também realizamos nossa marcação em hamster normal. Estudos prévios com metodologia semelhante foram demonstrados para verificação destes transportadores renais (Llama et al., 1998; Kim et al., 1999; Elkjzer et al., 2002).

Através da imunohistoquímica em tecido renal infectado, com ambos inóculos, comprovamos uma diminuição deste trocador, quando comparado ao hamster normal, não infectado. Isto pode em parte explicar as alterações metabólicas ocorridas na leptospirose. Na H&E do tecido renal, detectamos um padrão de lesão tubular, como também o estudo funcional apresentou um padrão de insuficiência renal muito grave.

Analizamos outro co-transportador NKCC2 que pode contribuir para análise das alterações apresentadas na insuficiência renal aguda na leptospirose (Kim et al., 1999).

Wu et al, verificaram peculiares alterações “*in vitro*”, indicando o provável defeito do co-transportador $Na^+-K^+-2Cl^-$ (NKCC2), na porção espessa da medula ascendente, utilizando a *Leptospira shermani* (2004).

O estudo “*in vitro*”, foi realizado adicionando às células da porção espessa ascendente medular de ratos, a proteína da membrana externa desta leptospira. Foi verificado através de RT-PCR, a expressão do m RNA do co-transportador. Neste, observou-se diminuição da expressão deste co-transportador, alcançando uma

inibição de até 98%. Para comprovar o efeito da leptospira provavelmente direto na inibição do co-transportador, realizaram outro experimento com a mesma leptospira, porém adicionando um anticorpo anti *L.shermani*, sendo o efeito parcialmente abolido (Wu et al., 2004).

Em nosso estudo, também verificamos as prováveis alterações geradas pela leptospirose, nos experimentos com análise deste co-transportador, como uma alteração adicional na patogênese renal. Já que o nosso mimetiza o de humanos, e a lesão renal foi muito grave comprovada por análise mais simples através de bioquímica e mais completa através de histologia, este co-transportador como uma continuação ao longo do néfron da lesão, ou por mecanismo compensatório deve estar alterado. Este também é o responsável pela reabsorção do sódio.

Mostramos através de IH, nos dois experimentos, uma diminuição deste co-transportador, também com marcação destes nos locais onde se encontram nos túbulos, comparando com a literatura, como também com tecido de hamster normal.

Estes resultados sugerem que ocorre alteração dos transportadores que reabsorvem sódio na Leptospirose, explicando em parte as alterações eletrolíticas, principalmente por inibição no túbulo proximal do NHE3, onde ocorre a maior reabsorção de sódio, e como contribuição na porção espessa, a inibição do NKCC2.

Em comparação com Wu, observamos com a *L. interrogans* Copenhageni, paralelamente o mesmo efeito, sendo nosso estudo “*in vivo*”, com hamster desenvolvendo doença letal aguda, e nossa cepa de maior virulência nos dois experimentos, apesar do autor ter estudado com a *L.shermani* e “*in vivo*”.

De acordo com Andrade et al, que realizaram experimentos com *L. Pomona*, os resultados em relação ao NHE3, foram semelhantes, porém com o NKCC2,

demonstramos uma disparidade, possivelmente pela diferença de cepa e inóculos utilizados, e por nosso modelo ser de insuficiência renal mais grave (2007a).

Ressalta-se a observação de como se comporta a atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase, com Glicolipoproteína (GLP) de *L.interrogans* associada à segmentos do néfron de coelhos, contribuindo possivelmente para a compreensão das alterações eletrolíticas (Younes-Ibraim et al., 1995).

Outra questão em discussão é quando deve-se utilizar a antibioticoterapia para Leptospirose, principalmente após o quinto dia de doença (Alexander et al 1986., Vinetz et al., 2003). Como não existiriam mais Leptospiras circulantes e sim a evidência da fase imune, para alguns autores o uso de antibiótico teria eficácia discutível (Edwards et al., 1988; Faine et al., 1999; Costa et al., 2003; Vinetz, 2003).

Porém, a fase imune poderia ocorrer em período não determinado, dependendo da resposta imune, não havendo mais leptospiras circulantes. Ou seja, dois importantes questionamentos em relação ao tratamento: como identificaremos os pacientes que se beneficiarão da utilização de antibiótico, e como otimizar a sua utilização (Vinetz, 2003).

Isto corrobora a justificativa dos dois experimentos realizados no nosso estudo, com modelos de doença grave e tratamentos diferenciados em momentos diferentes, e os modelos criados com inóculos diferentes, mimetizando uma doença muito grave e com período mais curto, e outra muito grave com tempo evolução mais lento.

Vários autores indicaram a utilização da antibioticoterapia, sendo o período de maior eficácia entre o sétimo e o décimo dia da doença (Watt et al.,1988; Faine et al., 1999; Bharti et al., 2003,; McBride et al., 2005). Porém em humanos, ocorre

dificuldade para prever exatamente o momento da doença, e a não indicação da antibioticoterapia, deve ser realizada com cautela.

Edwards et al, mesmo discutindo a eficácia da penicilina em efeitos clínicos significativos, indicaram a utilização para pacientes com suspeita clínica (Edwards et al., 1988).

Costa et al, realizaram estudo randomizado com utilização de penicilina em pacientes internados com suspeita de Leptospirose, analisando como desfecho o óbito. Os pacientes apresentaram com icterícia, insuficiência renal (níveis de creatinina acima de 3,0mg/dl-32% dos pacientes), e sangramentos (33% dos pacientes). Do grupo que recebeu penicilina, 28% realizou diálise peritoneal. A diferença em relação ao óbito, não foi estatisticamente significativa entre o grupo que recebeu penicilina e o que recebeu placebo, porém com maior taxa de letalidade naquele. O antibiótico não seria a única forma terapêutica para diminuir a letalidade da Leptospirose, e sim outros fatores e a terapia adjuvante (Edward et al., 1988; Costa et al., 2003; Leblebicioglu, 2003).

Em nosso estudo com modelo de doença grave, ficou mais evidente, a existência de duas formas de evolução da doença de Weil, com dois tipos de tratamento com o selecionado antibiótico: ampicilina. Ambos modelos foram idealizados com base nos estudos prévios, que são individualizados em relação a vários fatores, desde a cepa, até a terapêutica.

Dois relevantes estudos foram realizados na Tailândia, comparando-se a eficácia da utilização de penicilinas e cefalosporinas, doxiciclina, em momentos diferenciados da doença nestas áreas epidêmicas.

Nestes estudos, principalmente quando da ocorrência de febre, era verificado se o conjunto estava compatível com a suspeita clínica epidemiológica de Leptospirose, indicando-se então o antibiótico. A análise de alguns parâmetros e desfechos evoluiu satisfatoriamente com o uso destes (Panaphut et al., 2003; Suputtamongkol et al., 2004).

Em nosso estudo, propomos avaliar alguns parâmetros após utilização de antibiótico verificando-se a sua eficácia, alterando a morbidade, analisada em tecidos alvos, e mais especificamente no rim.

Observou-se igualmente como o tratamento interferiu nos transportadores renais citados. Se ocorresse melhora dos transportadores renais após a utilização do antibiótico eficaz em modelo de hamster, esta seria mais uma proposta de tratamento em humanos, reduzindo a lesão renal, com a terapia de suporte necessária associada, e provavelmente modificando o prognóstico. Faz-se mister referir que em humanos, sempre a terapia de suporte deve ser iniciada o mais precoce possível, concomitante ao uso do antibiótico, principalmente a hemodiálise, que pode interferir na morbidade e letalidade dos pacientes (Andrade et al., 2007b). A combinação de dopamina e furosemida pode ser benéfica no manejo da insuficiência renal aguda (Niwattayakul e Sitprija , 2007).

Vários antibióticos de várias classes, como penicilina, cefalosporinas, ampicilina, ciprofloxacina, e azitromicina, entre outros foram testadas em trabalhos experimentais e em humanos (Alexander et al., 1986; Watt et al., 1988; Panaphut et al., 2003; Suputtamongkol et al., 2004; Ghouse et al., 2006 ; Griffith et al., 2006).

Alguns estudos de destaque em modelo experimental de hamster foram selecionados, e dentre estes nos baseamos para a utilização do antibiótico ampicilina.

Outros estudos indicam propósitos diferenciados, como sobrevida, avaliação de leptospiras no sangue ou tecidos, quantificação destas em animais infectados e tratados, cepas diferenciadas, início de tratamento, doses, e vias diferenciadas; assim como alterações em tecidos, e eutanásias programadas (Sitprija et al., 1980; Alexander et al., 1986; Alt e Bolin, 1995; Barnett et al., 1999; Truccolo et al., 2002).

Alexander et al, testaram a eficácia do antibiótico iniciado no segundo dia da infecção, com dose única via subcutânea, entre o segundo e quarto dia da doença em hamster, com inoculação de *L.interrogans* Bataviae cepa 1415, com inóculos de 25.000 leptospiras. A concentração de infecção da cepa é de 8.500 a 25.000 leptospiras.

A data estimada do óbito estava proposta entre o sexto e sétimo dia. Estes inóculos são maiores que a DL50% desta cepa de 10 a 100 vezes. A quantificação da *Leptospira* foi realizada por cultura de tecido renal (Alexander et al., 1986).

A ampicilina foi um dos antibióticos eficazes em relação à sobrevida com dose única de 40 e 160 mg/kg/dia, quando iniciada no segundo dia após a inoculação, porém mesmo com a dose de 160mg/kg/dia ainda ocorreu a leptospiúria.

No mesmo estudo foi testado o efeito tardio, com esta mesma cepa com inóculo de 9000 leptospiras, e início do tratamento no quarto ou quinto dia de infecção, com duração de cinco dias, porém com doses de 2,5mg/kg/dia e 5,0mg/kg/dia subcutâneo. A ampicilina se mostrou eficaz em relação à sobrevida e a presença de leptospiras em cultura, neste último.

Em nosso estudo, no E1, o inóculo foi muito maior que a DL50%. O inóculo do E1 foi de 10^8 . Porém, também iniciamos o tratamento 36 horas após a inoculação, com dose de 100mg/kg/dia subcutâneo. No presente estudo, observamos a lesão

renal, a presença de leptospiras, e a alteração específica de transportadores tubulares renais. Porém, mostramos que nos animais tratados, em comparação com os infectados, ocorreu nítida modificação da histologia, com melhora das lesões em órgãos alvo, e alteração dos transportadores estudados, com restabelecimento de sua expressão em relação ao controle infectado, e se assemelhando ao hamster normal. Não avaliamos sobrevida neste estudo.

Em 1995, Alt e Bolin, realizaram experimentos em suínos e hamster, testando alguns antimicrobianos, verificando a eficácia terapêutica, com a cepa *L. interrogans* serovar Pomona cepa PLM5, inóculo de 10^5 a 10^7 leptospiras (1995).

A ampicilina foi utilizada em doses que variaram de 5mg/kg/dia a 50mg/kg/dia, intramuscular, com duração de tratamento de 3 a 5 dias, e início de tratamento no terceiro ou quinto dia após a inoculação.

A eutanásia foi programada para o décimo quarto dia após a inoculação, sendo comparados animais infectados com os tratados. Os infectados manifestaram sinais e histopatologia compatíveis com leptospirose, em todos os esquemas terapêuticos com ampicilina, reduzindo-se o número de leptospiras nos tecidos.

No nosso estudo no E2, também modelo de doença grave, com inóculo de 10^3 , iniciamos o tratamento no oitavo dia após inoculação, com dose de 80mg/kg/dia de ampicilina via subcutânea.

Verificamos também na histologia, a presença de leptospiras nos tecidos, assim como os transportadores renais. Comprovamos também a eficácia da ampicilina, e o restabelecimento dos transportadores tubulares renais, através de técnica de IH.

Truccolo et al, realizaram experimento com hamster, e testaram através da técnica de PCR a detecção de leptospira em animais tratados, no sangue e tecidos. O inóculo foi *L. Interrogans Icterohaemorrhagiae* cepa Verdun, com 10^8 , e a ampicilina foi administrada com dose de 40mg/kg/dia e 100mg/kg/dia intramuscular, iniciando no terceiro dia, com duração de 4 dias. Vinte e quatro horas após o tratamento com 100mg/kg/dia, detectaram uma diminuição de leptospiras em todos os tecidos. Com dose de 100mg/kg/dia, no sexto dia de tratamento, no rim, ainda permaneceram leptospiras com 10^2 a 10^3 leptospiras/grama de tecido. Nos animais infectados realizaram eutanásia desde o primeiro dia, com detecção de leptospiras 24 horas após a inoculação. A maior densidade medida foi no quinto dia, e no rim demonstrou-se 10^7 leptospiras/g tecido. A técnica de PCR foi mais sensível para detecção das leptospiras do que a cultura, e a análise qualitativa através da IH que realizamos. Necessitamos ainda complementar a análise quantitativa.

Outros estudos “*in vitro*”, comprovaram a eficácia da ampicilina no tratamento da leptospirose, e com concentração inibitória mínima baixa (Hospental et al., 2003; Murray et al., 2004).

Como a inflamação poderia contribuir para a morbidade em geral na leptospirose, e está envolvida na nefrite por mecanismos a esclarecer, o tratamento adjuvante poderia contribuir para melhora da morbidade.

Estudos com malária em humanos, demonstraram aumento do estresse oxidativo por prováveis mecanismos descritos, e a utilização de antioxidantes com melhora em alguns parâmetros (Papas, 1999; Pabon et al., 2003; Becker et al., 2004).

Por analogia, como na Leptospirose a verificação do estresse oxidativo ainda não tinha sido testada, o fizemos no nosso modelo. Além de verificar trabalhos

experimentais de doenças agudas como pancreatite, doenças sistêmicas inflamatórias, e lesão pulmonar aguda, nos baseamos nestes estudos experimentais com roedores, e desenvolvemos modelo de utilização de antioxidante (Leme et al., 2002; Ozdulger et al., 2003; Ritter et al., 2004).

Baseado nestes estudos prévios adequamos aos experimentos E1 e E2, a utilização de antioxidante, N-acetilcisteína (NAC), associado à ampicilina.

No nosso estudo verificamos o nível de estresse oxidativo sistêmico, medido através do ácido tiobarbitúrico (TBARS) que é um produto da peroxidação lipídica. A consequência da lesão oxidativa está associada às reações de peroxidação nas membranas lipídicas.

O nível de estresse oxidativo foi aferido apenas no E1, devido à escassa quantidade sanguínea para o E2. Aferiu-se o TBARS sanguíneo, antes da inoculação dos animais, e após o tratamento nos grupos do E1. Verificou-se que os animais antes da inoculação apresentaram níveis de TBARS dentro da normalidade. Observamos que em todos os parâmetros nos animais tratados somente com ampicilina, e nos com ampicilina e NAC, não houve diferença significativa.

6. Conclusões

- Caracterizamos a leptospirose doença letal aguda, em modelo experimental de hamster com dois inóculos, mimetizando as duas formas de evolução da doença de Weil. O modelo foi detalhadamente avaliado através de histopatologia e imunohistoquímica com marcação de leptospira, em rim, pulmão e fígado.
- O tratamento com ampicilina nos dois experimentos resultou em reversão parcial ou completa da lesão histopatológica e diminuição ou ausência de *Leptospira* demonstrada através de imunohistoquímica.
- Demonstramos o estresse oxidativo através de medida de TBARS, assim como Uréia e Bilirrubina Total aumentados em animais infectados não tratados, em ambos os experimentos, em comparação com os animais tratados.
- Na avaliação de terapia adjuvante, a N-acetilcisteína não apresentou efeito potencializador nestes experimentos.
- Ressaltamos que o trocador NHE3 demonstrado por imunohistoquímica em animais infectados não tratados, apresentou-se com expressão muito diminuída. Nos tratados, a expressão foi restabelecida principalmente no Experimento 1. O co-transportador NKCC2 nos experimentos 1 e 2, demonstrado por imunohistoquímica apresentou expressão diminuída, restabelecida com o tratamento com ampicilina.
- A utilização de antibiótico mesmo na evolução da doença de curso prolongado resgatou a expressão dos transportadores renais.

7. Referências

1. Abdulkader RCRM; Seguro AC; Malheiro PS; Burdman EA; Marcondes M. Peculiar Eletrolytic and Hormonal Abnormalities in Acute Renal Failure due to Leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 54 (1): 1-6.
2. Alexander AD; Rule P. Penicillins, cephalosporins, and tetracyclines in treatment of hamsters with fatal leptospirosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 1986; 30(6): 835-9.
3. Alt D; Bolin C. Preliminary evaluation of antimicrobial agents for treatment of *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection in hamsters and swine. *AJVR.* 1996; 57(1): 59-62.
4. Alves VAF; Gayotto LCC; De Brito T; Santos TM; Wakamatsu A; Vianna MR; Sakata EE. Leptospiral antigens in the liver of experimentally infected guinea pig and their relation to the morphogenesis of liver damage. *Exp Toxic Pathol.* 1992; 44: 425-434.
5. Andrade L; Rodrigues Jr AC; Sanches TR; Souza RB; Seguro AC. Leptospirosis leads to dysregulation of sodium transporters in the kidney and lung. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007a; 292: 586-592.
6. Andrade L; Cleto S; Seguro AC. Door-to-dialysis time and daily hemodialysis in patients with leptospirosis: impact on mortality. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007b; 2(4):739-44
7. Areal VM. The Pathologic Anatomy and Pathogenesis of Fatal Human Leptospirosis. *Am. J. Pathol.* 1962a; 40:393-423.

8. Arean VM. Studies on The Pathogenesis of Leptospirosis. II – A Clinico-Parthological Evaluation of Hepatic and Renal Function in Experimental Leptospiral Infections. *Lab. Invest.* 1962b; 11: 273 – 288.
9. Athanazio DA. *Estudo experimental comparativo da infecção por leptospiras patogênicas no hamster e no rato* [Dissertação]. Salvador; Centro de pesquisa Gonçalo Moniz, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2005.
10. Barnett JK.; Barnett D.; Bolin CA; Summers TA; Wagar EA; Cheville NF; Hartskeerl RA; Haake DA. Expression and Distribution of Leptospiral Outer Membrane components during Renal Infection of Hamsters. *Infect Immun.* 1999; 67(2):853-61
11. Becker K; Tilley L; Vennerstrom JL; Ginsburg H. Oxidative stress in malaria parasited-infected erythrocytes: host-parasited interactions. *International Journal of Parasitology.* 2004;34:163-189.
12. Bharti AR; Nally JE; Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infectious Disease.* 2003;3:757-71.
13. Bishara J; Amitay E; Barnea A; Yitzhaki S; Pitlik S. Epidemiological and Clinical Features of Leptospirosis in Israel. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2002; 21(1):50-2.
14. Caglikulekci M; Pata C; Apa DD; Dirlik M; Tamer L; Yaylak F; Kanik A; Aydin S. The effect of *N*-acetylcysteine (NAC) on liver and renal tissue inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tissue lipid peroxidation in obstructive jaundice stimulated by lipopolysaccharide. *Pharmacological Research.* 2004; 49: 227-38.
15. Costa E; Costa YA; Lopes AA; Sacramento E; Bina JC. Severe forms of leptospirosis: clinical, demographic and environmental aspects. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2001; 34(3):261-7.

16. Costa E; Lopes AA; Sacramento E; Costa YA; Matos ED; Lopes MB; Bina JC. Penicillin at the late stage of leptospirosis: a randomized controlled trial. *Rev. Inst Med Trop S.Paulo.* 2003;45(3): 141-5.
17. Daher E; Zanetta DMT; Cavalcante MB; Abdulkader RCRM. Risk factors for death and changing patterns in Leptospirosis acute renal failure. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 6(14): 630-4.
18. Davila de Arriaga AJ; Rocha AS; Yasuda PH; De Brito T. Morpho-functional patterns of kidney injury in the experimental leptospirosis of the guinea-pig (*L.Icterohaemorrhagiae*). *J Pathology.* 1982; 138: 145-61.
19. De Brito. On the pathogenesis of the hepatic and renal lesions in Leptospirosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1968; 10(4): 238-41.
20. De Brito T; Bohm M; Yasuda P. Vascular damage in acute experimental leptospirosis of the guinea – pig. *J.Pathology.* 1979; 128: 177-82.
21. De Brito T; Menezes LF; Lima DMC; Lourenço S; Silva AMG; Alves VAF. Immunohistochemical and in situ hybridization studies of the liver and kidney in human leptospirosis. *Virchow Arch.* 2006; 448: 576-83.
22. Dorigatti F; Brunialti MK; Romero EC; Kallas EG; Salomao R. Leptospira interrogans activation of peripheral blood monocyte glycolipoprotein demonstrated in whole blood by the release of IL-6. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38(6):909-14.
23. Ecelbarger CA; Kim GH; Wade JB; Knepper MA. Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin. *Experimental Neurology.* 2001;171: 227-34.
24. Edwards CN; Nicholson GD; Hassel TA; Everard CO; Callender J. Penicillin therapy in icteric leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1988; 39: 388-90.

25. Elkjzer ML; Kwon TH; Wang W; Nielsen J; Knepper M; Froklzer J; Nielsen S. Altered expression of renal NHE3, TSC, BSC-1, and ENaC subunits in potassium-depleted rats. *Am J Renal Physiol.* 2002; 283:1376-88.
26. Eritsland J. Safety consideration of polyunsaturated fatty acids. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2000; 71(1): 197-201.
27. Faine S. Virulence in *Leptospira*. I. Reactions of guinea-pigs to experimental infection with *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Br. J. Exp. Pathol.* 1957; 38(1):1-7.
28. Faine S. Guidelines for the Control of Leptospirosis. *WHO Offset Publication.* 1982; 67: 171 p.
29. Faine S; Adler B; Bolin C; Perolat P. *Leptospira and leptospirosis*. CRC Press, 2nd ed. MedSci, Melbourne, 1999.
30. Ganoza CA; Matthias MA; Collins-Richards D; Brouwer KC; Cunningham CB; Segura ER; Gilman RH; Gotuzzo E; Vinetz JM. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *Plos Med.* 2006; 3(8): e308.
31. Ghouse M; Maulana AB; Ali MM; Sarasa VD. A two-year study of the efficacy of azithromycin in the treatment of leptospirosis in humans. *Indian Journal Med Microbiol.* 2006; 24(4): 345-6.
32. Griffith ME; Hospenthal D; Murray CK. Antimicrobial therapy of leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases,* 2006: 19:533-537
33. Gunduz H; Karabay O; Tamer A; Ozaras R; Mert A; Tabak OF. N-acetyl cistein therapy in acute viral hepatitis. *World J Gastroenterology.* 2003; 9(12): 2698-70.

34. Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology*. 2000a; 146; 1491: 1504.
35. Haake DA; Chao G; Zuerner RL; Barnett JK; Barnett D; Mazel M; Matsunaga J; Levett PN; Bolin C.A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect. Immun.* 2000b; 68(4):2276-85.
36. Haake DA; Dundoo M; Cader R. Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. *Clin Infect Dis*. 2002a; 34: e40-43
37. Haake DA; Matsunaga J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane protein. *Infect Immun.* 2002b; 70:4936-4945.
38. Hayek MG; Taylor SF; Bender BS. Vitamin E, supplementation decreases lung virus and titers in mice infected with influenza. *J Infect Dis*. 1997; 176: 273-6.
39. Hosphental D; Murray C. In Vitro susceptibilities of seven leptospira species to traditional and newer antibiotics. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. 2003: 2646-8.
40. Kim GH; Ecelbarger CA; Mitchell C; Parker RK; Wade JB; Knepper MA. Vasopressin increases Na-K-2cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1999; 276:96-103
41. Knepper MA; Brooks HL. Regulation of the sodium transporters NHE3, NKCC2, and NCC in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001; 10(5): 655-9.
42. Ko AI; Reis GM; Riley LW. Urban epidemic of severe Leptospirosis in Brazil. *The Lancet*. 1999; 354: 820-25.

43. Koizumi N; Watanable H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine*. 2004; 22: 1545:1552.
44. Leblebicioglu H. Penicillin at the late stage of Leptospirosis: a Randomized controlled trial. *Rev Inst Med Trop S. Paulo*. 2003; 45(4): 237.
45. Leme A; Lichtenstein A; Arantes-Costa FM; Landucci ECT; Martins M. Acute Lung injury in experimental pancreatitis in rats: pulmonary protective effects of crotopotin and N-acetylcysteine. *Shock*. 2002; 18(5): 428-33.
46. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:296-326.
47. Levett PN; Branch S. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute Leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 66(6): 745-48.
48. Levett PN. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe Leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases* 2003;36:447-452
49. Lin CL; Wu MS; Yang CW; Huang CC. Leptospirosis associated with hypokalaemia and thick ascending limb dysfunction. *Nephron Dial Transplant*. 1999; 14: 193-5.
50. Llama FP; Andrews P; Ecelbarger C; Nielsen S; Knepper MA. Concentrating defect in experimental nephritic syndrome: altered expression of aquaporins and thick ascending limb Na⁺ transporters. *Kidney International*. 1998; 54:170-9.
51. Locatelli F; Canaud B; Eckardt KU; Stenvinkel P; Wanner C; Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18: 1272-80.

52. Magaldi AJ; Yasuda PN; Kudo LH; Seguro AC; Rocha AS. Renal involvement in Leptospirosis: a pathophysiologic study. *Nephron*. 1992; 62(3): 332-9.
53. Marotto PCF; Nascimento CMR; Seguro AC. Acute lung injury in Leptospirosis: Clinical and Laboratory Features, outcome, and factor associated with mortality. *Clinical Infectious Diseases*. 1999;29:1561-3.
54. McBride A; Athanazio DA; Reis MG; KO AI. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2005; 18(5):376-86.
55. Miller NG; Allen JE; Wilson RB. The pathogenesis of hemorrhage in the lung of the hamster during acute leptospirosis. *Med Microbiol Immunol*. 1974; 160:269-78.
56. Meites E; Jay MT; Deresinski S; Smith S. Reemerging Leptospirosis, California. *Emerging Infectious Diseases*. 2004;10:406-411.
57. Mishra NC; Kabilan L; Sharma A. Oxidative stress and malaria-infected erythrocytes. *Indian J Malariol*. 1994;2:77-87.
58. Moon JE; Rivard RG; Griffith ME; Ressler RA; McCall S; Reitstetter RE; Hospenthal DR; Murray CK. Efficacy of macrolides and telithromycin against leptospirosis in a hamster model. *Antimicrobial Chemotherapy*, 2006 Sep; 50(9):3231-4
59. Murray CK; Hospenthal DR. Broth microdilution susceptibility testing for *Leptospira spp*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004: 1548-52.
60. Nally JE; Chantranuwat C; Wu XY; Fishbein MC; Pereira MM; Da Silva JJ; Blanco DR; Lovett MA. Alveolar Septal deposition of Immunoglobulin and complement parallels Pulmonary Hemorrhage in a Guinea Pig model of severe Pulmonary Leptospirosis. *Am. J. Pathol*. 2004; 164(3):1115-27.

61. Nally JE; Fishbein MC; Blanco D; Lovett M. Lethal Infection of C3H/HeJ and C3H/SCID mice with an isolate of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Infect Immun.* 2005; 73: 7014-17.
62. Nally JE; Whitelegge JP; Bassilian S; Blanco DR; Lovett MA. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. *Infect Immun.* 2007; 75(2): 766-73.
63. Niwattayakul K; Sitprija V. Leptospiral acute renal failure: effects of dopamine and furosemide. *Ren Fail.* 2007; 29(2):159-62.
64. Noguchi H; Muller HR; Torres O. Experimental studies in yellow fever in northern Brazil. *Monographs Rockefeller Inst Med Res.* 1924;20:1-35.
65. Ohkawa H; Ohishi N; Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95: 351-8.
66. Oliva R; Infante JF; Gonzales M; Perez V; Sifontes S; Marrero O; Valdes Y; Farinas M; Estevez L; Gonzales I. Pathologic-Clinical Characterization of Leptospirosis in a golden Syrian hamster model. *Archives of Medical Research.* 1994; 25(2): 165-70.
67. Ozdulger A; Cinei I; Koksel O; Cinel L; Avlan D; Unlu A; Okcu H; Dikmengil M; Oral U. The protective effect of N-acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis model. *Shock.* 2003; 19(4): 366-72.
68. Pabon A; Carmona J; Blair S. Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. *Clinical Biochemistry.* 2003; 36:71-78:6-20.
69. Papas AM. *Antioxidant, status, diet, nutrition, and health.* Massachusetts. ed CRC; 1999.

70. Palmer MF; Zochowski WJ. Survival of leptospire in commercial blood culture system revisited. 2000; 53: 713-4.
71. Panaphut T; Domrongkitchaiporn S; Vibhagool A; Thinkamrop B; Susaengrat W. Ceftriaxone compared with sodium penicillin G for treatment of severe leptospirosis. *Clin Infect Dis*. 2003; 36: 1507-13.
72. Qureshi ST; Medzhitov R. Toll like receptors and their role in experimental models of microbial infection. *Genes and Immunity*. 2003; 4: 87-94.
73. Reed LJ; Muench HA. Simple method of determining fifty percent endpoints. *Am J Hyg*. 1938; 27: 494-7.
74. Ren S.X; Fu G; Jiang XG.; Zeng R; Miao YG; Xu H; Zhang YX; Xiong H; Lu G; Lu LF; Jiang HQ; Jia J; Tu YF; Jiang JX; Gu WY; Zhang YQ; Cai Z; Sheng HH; Yin HF; Zhang Y; Zhu GF; Wan M; Huang HL; Qian Z; Wang SY; Ma W; Yao ZJ; Shen Y; Qiang BQ; Xia QC; Guo XK; Danchin A; Saint Girons I; Somerville RL; Wen YM; Shi MH; Chen Z; Xu JG; Zhao GP. Unique Physiological And Pathogenic Features of *Leptospira Interrogans* Revealed By Whole-Genome Sequencing. *Nature*. 2003; 422(6934):888-93.
75. Ricaldi J; Vinetz JM. Leptospirosis in the tropics and in travelers. *Curr Infect Dis Reports*. 2006; 8: 51-8.
76. Ristow P; Bourhy P; McBride FW; Figueira CP; Huerre M; Ave P; Girons IS; Ko AI; Picardeau M. The OmpA-Like Protein Loa22 Is Essential for Leptospiral Virulence. *Plos Pathog*. 2007; ;3(7): 1:10
77. Ritter C; Andrades ME; Reinke A; Menna-Barreto S; Moreira JCF; Dal-Pizzol F. Treatment with *N*-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med*. 2004; 32(2): 342-9.

-
78. Romero EC; Bernardo CCM; Yasuda P. Human Leptospirosis: a twenty-nine year serological study in São Paulo, Brazil. *Revista do Inst Med Trop São Paulo*. 2003;45(5):245-248.
79. Segura ER; Ganoza CA; Campos K; Ricaldi JN; Torres S; Silva H; Cespedes MJ; Matthias MA; Swancutt MA; Lopez Linan R; Gotuzzo E; Guerra H; Gilman RH; Vinetz JM; Peru-United States Leptospirosis Consortium. Clinical Spectrum of Pulmonary Involvement in Leptospirosis in a Region of Endemicity, with Quantification of Leptospiral Burden. *Clin. Infect. Dis*. 2005;40(3):343-51.
80. Seguro AC; Lomar AV; Rocha AS. Acute renal failure of leptospirosis: Non-oliguric and hypokalemic forms. *Nephron*. 1990; 55:146-151.
81. Seguro AC; Kudo LH; Helou CMB. *Função tubular. Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólíticos*: Guanabara Koogan, 1996: 37-48.
82. Shalit I; Barnea A; Shahar A. Efficacy of ciprofloxacin against *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 1989: 788-9.
83. Silva EF; Medeiros MA; McBride AJ; Matsunaga J; Esteves GS; Ramos JG; Santos CS; Croda J; Homma A; Dellagostin AO; Haake DA; Reis MG; KO AI. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine*. 2007; 25 (33): 6277-86.
84. Sitprija V; Pipatanagul V; Mertowidjojo K; Boonpuckanavig V; Boonpucknavig S. Pathogenesis of renal disease in Leptospirosis. *Kidney Int*. 1980; 17:827-36.
85. Sitprija V; Kearkiat P. Nephropathy in Leptospirosis. *J Postgrad Med*. 2005;51:184-8.

86. Spichler A; Moock M; Chapola EG; Vinetz J. Weil's disease: an unusually fulminant presentation characterized by pulmonary hemorrhage and shock. *Brz J Infect Dis.* 2005; 9(4): 336-40.
87. Spichler A; Athanazio D; Buzzar M; Castro B; Chapolla E; Seguro AC; Vinetz JM. Using Death Certificate Reports to Find Severe Leptospirosis Cases, Brazil. *Emerging Infectious Diseases.* 2007a; 13 (10): 1559-61.
88. Spichler A; Vilaça P; Albuquerque J; Buzzar M; Castro B; Athanazio D; Seguro AC; Vinetz J. Prominent characteristics of fatal outcome in human leptospirosis in Sao Paulo, Brazil. Case-control study. 5th Meeting of International Leptospirosis Society. 2007b; Quito, Equador.p.2.
89. Spichler A; Spichler E; Moock M; Vientz JM; Leake JA. Acute pancreatitis in fatal anicteric leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2007c; 76(5):886-7.
90. Stimson AM. Note on an organism found in yellow-fever tissue. *Public Health Reports.* 1907; 22: 541
91. Suputtamongkol Y; Niwattayakul K; Suttinont C; Losuwanaluk K; Limpaboon R; Chierakul W; Wuthiekanum V; Surapee T; Chenchittikul M; White NJ. An open Randomized Controlled Trial of Penicillin, Doxycycline, and Cefotaxime for Patients with Severe Leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 2004; 39: 1417-24.
92. Trevejo RT; Rigau-Perez JG; Ashford DA; McClure EM; Jarquin-Gonzalez C; Amador JJ; De Los Reyes JO; Gonzalez A; Zaki SR; Shieh WJ; Mclean RG; Nasci RS; Weyant RS; Bolin CA; Bragg SL; Perkins BA; Spiegel RA. Epidemic Leptospirosis Associated with Pulmonary Hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J. Infect. Dis.* 1998;178 (5):1457-63.
93. Trimarchi H; Mongitore MR; Baglione P; Forrester M; Freixas EA; Schropp M; Pereyra H; Alonso M. N-acetylcysteine reduces malonaldehyde levels in chronic hemodialyses patients- a pilot study. *Clin Nephrol.* 2003 Jun; 59(6): 441-6

94. Truccolo J; Serais O; Merien F; Perolat P. Following The Course Of Human Leptospirosis: Evidence of a Critical Threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR Assay. *Fems Microbiol Lett.* 2001; 204(2):317-21.
95. Truccolo J; Charavay F; Merien F; Perolat P. Quantitative Pcr Assay To Evaluate Ampicillin, Ofloxacin, And Doxycycline For Treatment Of Experimental Leptospirosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002 46(3):848-53.
96. Turrens JF. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Molecular Aspects of Medicine.* 2004;25:211-220.
97. Vinetz JM. A mountain out of a Molehill: Do we treat acute Leptospirosis, and if so, with What? *Clinical Infectious Diseases.* 2003;36:1514-15.
98. Vinetz JM. Leptospirosis. *Curr Opinion Infect Dis.* 2001;14:527-38.
99. Vinetz JM; Glass GE; Kaslow DC. Sporadic Urban Leptospirosis 1996;10:794-798.
100. Viriyakosol S; Matthias MA; Swancutt MA; Kirkland TN; Vinetz JM. Toll-like receptor 4 protects against lethal leptospira interrogans serovar icterohaemorrhagiae infection and contributes to in vitro control of leptospiral burden. *Infect Immun.* 2006; 74: 887-895.
101. Watt G; Padre LP; Tuazon ML. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. *Lancet.* 1988;1: 433-5.
102. Watt G; Jongsakul K; Ruangvirayuth R. A pilot study of N-acetylcysteine as adjunctive therapy for severe malaria. *Q J Med.* 2002; 95: 285-90.
103. Weil A. Ueber eine eigentumliche mit milztumor, icterus and nephritis einhergehende acute infektiionskrankheit. *Dtsche Arch Klin Med.* 1886;39:209-232.

104. Wu M; Yang C; Pan M; Chang C; Chen Y. Reduced renal $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ co-transporter activity and inhibited NKCC2 mRNA expression by *Leptospira shermani*: from bed-side to bench. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19: 2472-9.
105. Yang CW; Wu MS; Pan MJ et al. Leptospira outer membrana protein activates NF- κ B and downstream genes expressed in medullary thick ascending limb cells. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11: 2017-26.
106. Yang CW; Wu MS; Pan MJ. Leptospirosis renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16; S5: 73-7.
107. Yang CW. Leptospirosis renal disease: Understanding the initiation by Toll-like receptors. *Kidney*. 2007 "in Press"
108. Yasuda PH; Hoshino-Shimizu S; Yamashiro EH; De Brito T. Experimental Leptospirosis (*L. Interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae) of the detection in the Kidney. *Exp Pathol*. 1986;29(1):35-43.
109. Younes-Ibraim M; Burth P; Faria MVC; Meyer-Bulfin B; Barlet-Bas C; Cheval L; Doucet A. Inhibition of Na-K-ATPase by an endotoxin extracted from *Leptospira interrogans*: a possible mechanism for the physiopathology of Leptospirosis. *C.R.Acad.Sci.Paris. Ser III*. 1995;318: 619-25.
110. Zafarullah M; Li WQ; Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. Review. *CMLS*. 2003;60: 6-20

Apêndice

Decision Letter

From: ajtmh@ameritech.net

To: annespichler@terra.com.br

Cc:

Subject: American Journal of Tropical Medicine & Hygiene - AJTMH-07-0141.R1

Body: 22-May-2007

To: Dr. Anne Spichler

RE: AJTMH-07-0141.R1, REVERSAL OF RENAL TUBULE TRANSPORTER DOWN-REGULATION DURING SEVERE LEPTOSPIROSIS WITH ANTIMICROBIAL THERAPY by Spichler, Anne; Ko, Albert; Façonde, Everton; De Brito, Thales; Silva, Ana; Athanzio, Daniel; Silva, Cleiton; Seguro, Antonio

Dear Dr. Spichler:

On behalf of Dr. Joseph Vinetz I would like to thank you for submitting your manuscript to the American Journal of Tropical Medicine & Hygiene. Your manuscript has been accepted for publication.

Please be sure that you have sent in your signed copyright form, which can be located on the journal's submission site (<http://mc.manuscriptcentral.com/ajtmh>) under the link to "Instructions and Forms" and that all authors have sent in a signed statement indicating participation in the study and acceptance of the original submission and subsequent revisions submitted by you. We will NOT send your manuscript to press until these items have been received and will let you know if any of these items are missing from your file.

We will contact you if questions arise during the copyediting process. Otherwise, you can expect to receive your galley proofs by email within the next six to eight weeks. Please be sure to return your corrected galley proofs, page charge form, and reprint order form (if you wish to purchase reprints) within 48 hours of receiving your galley proofs.

Sincerely,
Laura Buckley
Editorial Assistant
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene
ajtmh@ameritech.net

Date Sent: 22-May-2007

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

The American Journal of
Tropical Medicine and Hygiene

**REVERSAL OF RENAL TUBULE TRANSPORTER DOWN-REGULATION
DURING SEVERE LEPTOSPIROSIS WITH ANTIMICROBIAL THERAPY**

Journal:	<i>American Journal of Tropical Medicine & Hygiene</i>
Manuscript ID:	AJTMH-07-0141.R1
Manuscript Type:	Original Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Spichler, Anne; University of São Paulo School of Medicine, Department of Nephrology, LIM 12 Ko, Albert; Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ, Fundação Oswaldo Cruz Fagonde, Everton; Federal University of Pelotas, Biotechnology Centre De Brito, Thales; University of São Paulo, Institute of Tropical Medicine Silva, Ana; University of São Paulo, Institute of Tropical Medicine Athanasio, Daniel; Federal University of Bahia, Health Sciences Institute, Department of Biointeraction Silva, Cleiton; Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Brazilian Ministry of Health, Goncalo Moniz Research Centre Seguro, Antonio; University of São Paulo School of Medicine, Department of Nephrology, LIM 12; University of São Paulo School of Medicine, Department of Nephrology, LIM 12; University of Sao Paulo, Av. Doutor Arnaldo 455
Key Words:	Leptospirosis, renal transporters, treatment

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

LRH: SPICHLER AND OTHERS**RRH:** RENAL TRANSPORTERS IN SEVERE LEPTOSPIROSIS**Title:** REVERSAL OF RENAL TUBULE TRANSPORTER DOWN-REGULATION DURING SEVERE LEPTOSPIROSIS WITH ANTIMICROBIAL THERAPY**Authors:** ANNE SPICHLER, ALBERT I KO, EVERTON FAGONDE SILVA, THALES DE BRITO, ANA MARIA SILVA, DANIEL ATHANAZIO, CLEITON SILVA, AND ANTONIO SEGURO

Department of Nephrology, LIM 12, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil; Goncalo Moniz Research Centre, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Brazilian Ministry of Health, Salvador, Brazil; Division of International Medicine and Infectious Disease, Weill Medical College of Cornell University, New York, USA; Biotechnology Centre, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil; Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; Department of Biointeraction, Federal University of Bahia, Health Sciences Institute, Salvador, Brazil.

Abstract. Tubular dysfunction is a hallmark of severe leptospirosis. Antimicrobial therapy is thought to interfere on renal involvement. We evaluated the expression of proximal tubule type 3 Na⁺/H⁺ exchanger (NHE3) and thick ascending limb Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC2) in controls and treated hamsters. Animals infected by a serovar Copenhageni isolate, were treated or not with ampicillin and/or N-acetylcysteine (NAC). Leptospiral antigen/s and expression of renal transporters were evaluated by immunohistochemistry, and serum thiobarbituric acid (TBARS) was quantified. Infected hamsters had high amounts of detectable leptospiral antigen/s in target tissues while renal expression of NHE3 and NKCC2 decreased. Ampicillin treatment was associated with minimal or no detection of leptospiral antigens, normal expression of NHE3 and NKCC2 transporters, and reduced levels of TBARS. NAC effect was restricted to lowering TBARS. Early and late ampicillin treatment rescued tubular defects in leptospirosis severe disease, and there was no evidence of benefit from antioxidant therapy.

Key words: Leptospirosis, severe disease, treatment, renal sodium transporters

Introduction

Leptospirosis is a zoonosis of worldwide distribution.^{1,2} About 5-10% of all human infections course with severe forms. Weil's syndrome, the most common presentation of severe forms of leptospirosis, may present either as a biphasic or as a single monophasic disease characterized by a combination of hemorrhage, particularly in the lung, renal failure, and jaundice, with fatality rates ranging from 5 to 25%.^{1,3,4} Hamsters and guinea pigs reproduce both severe forms of leptospirosis under experimental conditions.⁵⁻⁷

The kidney is an important target organ in leptospiral infection.⁸⁻¹⁰ Clinically, renal involvement in leptospirosis occurs in 16% to 40% of cases and is unique because of the atypical presentation of polyuria, hypokalemia, sodium and potassium wasting.^{9,11,12} Severe renal dysfunction progresses to dehydration, hyperkalemia and oliguria, paralleled by acute tubular necrosis, and predicts higher lethality.^{13,14} The pathogenesis may be related to direct toxic effects of leptospiral compounds on renal transporters and microcirculation or to indirect effects of the pro-inflammatory response, with severe tissue damage due to oxidative stress.¹⁵⁻¹⁷ N-acetylcysteine, an antioxidant, scavenger of reactive oxygen species, could be considered for adjunctive therapy in this disease, interferes with oxidative effects of inflammation.¹⁸

The postulated targets of tubular dysfunction in leptospirosis are related to the major sodium transporters expressed along the nephron.¹⁹⁻²¹ The type 3 Na⁺/H⁺ exchanger (NHE3) provides the major route for sodium transport across the apical membrane of the proximal tubule. The Na⁺-K⁺-Cl⁻ co-transporter (NKCC2) plays a role in the regulation of water excretion and fine control of sodium balance in the thick

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

ascending limb. (TAL) ²²⁻²⁴, and Na⁺/K⁺-ATPase participates in the sodium and potassium balance.²⁵ During leptospiral infection, lesions involves the proximal tubules, with leptospiral antigens shown mainly in that segment.¹⁰ Previous experiments showed a downregulation of NKCC2 co-transporter activity, in TAL segments during leptospiral infection.¹⁹

A wide range of antimicrobial therapy for leptospirosis was described in human and experimental studies,²⁶⁻²⁹ and benefits have been disputed for cases with more than four days of clinical disease.^{30,31} There is also evidence that, after a threshold of leptospiremia, the delayed use of antibiotics is unlikely to reduce lethality.^{32,33} Supportive treatment for renal failure is crucial in clinical management with a major impact on fatality.^{13,14} A limited number of specialized studies have focused on the molecular basis of ionic transport dysfunction in kidneys among patients with severe leptospirosis¹⁹ however, no reports have evaluated the impact of antibiotics on their expression.

The present study addresses therapeutic removal of leptospores from infected target tissues, its importance on the baseline expression of NHE3 and NKCC2 in infected hamsters reproducing the two forms of clinical presentations of Weil's syndrome. We also propose to determine the levels of systemic markers of oxidative stress in the same model and the effect of N-acetylcysteine (NAC) as adjunct therapy.

Materials and Methods

Leptospira

Leptospira interrogans serovar Copenhageni strain FIOCRUZ L1-130 was originally isolated from a patient with severe leptospirosis during an epidemic outbreak in 1996³⁴. The strain was passaged and re-isolated four times from hamsters after isolation from a blood culture from the patient, and stored at -70°C. Frozen aliquots were thawed and passaged in liquid medium seven times prior its use as a low-passage-number isolate. Leptospire were cultivated in liquid Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) medium (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) at 29°C, and counted in a Petroff-Hausser counting chamber by darkfield microscopy (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa).

Animals

Female golden Syrian hamsters weighting 80 to 85 g (Fiocruz-Bahia), were maintained under conventional environmental conditions, and observed twice daily. Animals were inoculated intraperitoneally with 1ml of Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) medium (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) adjusted to obtain 10^8 leptospire, in Experiment 1 (E1) and 10^3 in Experiment 2 (E2).

Both experiments intended to reproduce two clinical forms of Weil's diseases: E1- acute monophasic progressive illness model, and E2 - prolonged course of infection model. Animals were euthanized with sodium thiopental at defined dates. At necropsy, blood and target organs (kidney, lung and liver) were collected for serum and histopathology analysis respectively. All experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.

Experimental design

This work was divided into two sets of experiments.

In experiment 1, animals were injected with 10^8 leptospire and received no treatment (infected-untreated group). The ampicillin-treated group was infected with the same inoculum and received ampicillin subcutaneously, 100 mg/kg/day bid. (AMP-group) The NAC-treated group received a NAC dose of 100 mg/kg/bid intraperitoneally. (NAC-group) The ampicillin plus NAC group was treated with both drugs.(AMP+NAC-group) Therapy was started after clinical detection of fever, prostration and piloerection. Animals were sacrificed on the fifth day based on previous pilot experiments which identified this as the probable date of death for hamsters infected with the same strain and inoculum. For each antimicrobial tested, the treated group included 6 animals per group. Untreated infection group was inoculated under the same condition and included 6 animals per group.

In Experiment 2, animals were injected with 10^3 leptospire and received no treatment. (infected-untreated1 group) The ampicillin-treated group received ampicillin subcutaneously, 80 mg/kg/day bid (AMP1-group). The NAC-treated group received a dose of 100 mg/kg/bid intraperitoneally (NAC1-group), and the ampicillin plus NAC group was treated with both drugs (AMP+NAC1-group). Each group included six animals. Therapy was started 6 days after infection and was continued for four days. Animals were sacrificed on the tenth day, based on previous pilot experiments which identified this as the probable date of death for hamsters infected with the same strain and inoculum. The antimicrobial drugs were tested with lower dosage also in this experiment. Ampicillin subcutaneously, 80 mg/kg/day bid (AMP2-group), and ampicillin plus NAC (AMP+NAC2- group) Therapy was started 8 days after infection

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

and was continued for 3 days. The animals were sacrificed on the eleventh day. Each subgroup included three animals.

Previous observations indicated that both ampicillin doses were effective^{28,29}, but the different doses used were selected in an attempt to recapitulate two forms of treatment in Weil's syndrome. The higher inoculum presumably induces earlier symptoms and requires a higher antimicrobial dose, while the lower inoculum induces a longer preclinical interval and requires lower but also effective antibiotic doses. Parallel to this study, non-infected hamsters were examined to verify baseline expression of NHE3 and NKCC2 on renal tissue.

Serum analysis

A product of lipid peroxidation and a marker of oxidative stress, were determined by the thiobarbituric acid method as described elsewhere³⁵, while urea and bilirubin were determined by spectrophotometry.

Histology and Immunohistochemistry (IHC) assay

Tissues (kidney, lung and liver) from untreated and treated animals were fixed in 4% formalin, embedded in paraffin, cut into 3 µm sections, and used for conventional histology (H&E) and IHC to assess the presence of leptospiral antigen/s (LAg). Immunohistochemistry was also performed to determine the expression of the renal sodium transporters NHE3 and NKCC2 in kidney tissue from infected untreated and treated animals, and also baseline expression of non-infected hamsters.

IHC protocol for LAg:

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

Immune serum was raised in rabbits according to a previously described standard procedure.³⁶ Primary antibody titer was use in of 1:7000 dilution. Kidney, liver and lung 3- μ m sections were analyzed using EnVision (DAKO code K4011)-based on immunohistochemistry methods.³⁶

NHE3 and NKCC2 Protocol:

The sections were dewaxed and rehydrated, and the endogenous peroxidase was blocked by incubation with 3% H₂O₂ in absolute methanol for 10 min at room temperature. Sections were then incubated with 1 mmol/l Tris solution (pH 9.0) supplemented with 0.5 mM EDTA and heated using a microwave oven for 10 min to unmask antigen/s. Nonspecific binding of immunoglobulin was prevented by incubating the sections in 50 mM NH₄Cl for 30 min, followed by blocking in PBS supplemented with 1% BSA, 0.05% saponin, and 0.2% gelatin. Sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in PBS supplemented with 0.1% BSA and 0.3% Triton-X-100.

Primary antibodies (rabbit polyclonal) NHE3 and NKCC2 were used in 1:100, and 1:50 dilutions respectively.^{37,38} Reactions were completed by incubating tissues with a dextran polymer (En Vision ,DAKO code K4011). DAB was used to reveal the end products of the reactions.

Statistical analysis

Data are reported as mean \pm standard deviation. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to compare serum marker measurements between groups.

Comparison between two independent groups was performed by the non-parametric Mann-Whitney test. Correlation coefficients between variables were

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

determined by Spearman rank correlation. The level of significance was set at $p < 0.05$ in all analyses. The SPSS package was used in this study.(SPSS Inc., Chicago, IL).

Results

Course of Weil's syndrome

In E1, in which antimicrobial treatment was programmed to start after the initial signs of Weil's syndrome, fever, prostration and/or piloerection were observed 36 hours after infection. Hemorrhage, mainly in the nasal mucosa, was observed on the third day. In untreated animals signs persisted until death, whereas ampicillin treated animals showed no abnormalities until the day of sacrifice. All untreated animals developed clinical signs of disease and half of them died before the fifth day.

In E2, the animals showed signs related to severe disease by the eighth day. Clinical signs were seen in 2/3 of untreated and NAC-treated animals. Only one death each was observed in the AMP-NAC groups, on day 8 in the first group and on day 10 in the second group. (Table 1).

Histopathology and Immunohistochemistry(IHC) assay .

Kidneys of infected animals were obtained from Experiment 1 (day 5) and Experiment 2 (day 10 and day 11). The kidneys showed tubular necrosis in both experiments, and evidence of focal interstitial nephritis in E2 (Figure 1).

Persisting mild lesions or almost normal tissues were observed in animals treated with ampicillin in E1 and E2. IHC staining detected large amounts of leptospiral antigen/s (LAg) in tubular cells and this feature was more evident in E1. All of the

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

ampicillin-treated animals of E1 and E2 showed lesser amounts or cleared LAg in kidney tissue. (Figure 1). NAC did not induce any additional effect in either experiment.

Lung sections from the animals of both experiments revealed focal alveolar hemorrhage more prominent in E1 samples. Ampicillin-treated animals showed normal lung histology. LAg could be detected in lung tissue but in smaller amounts when compared to other tissues. Treated animals showed a significant decrease of tissular LAg. No differences were observed in either experiment when NAC was added to the treatment (Figure 2).

Liver sections from the animals of both experiments revealed a typical picture of hepatocyte trabecular disarray and regenerative features. Ampicillin- treated animals showed normal appearing hepatic trabeculae. Similar to other tissues, only ampicillin treatment was associated with decreased amounts or clearance of LAg (Figure 3).

IHC demonstration of NHE3/NKCC2

The expression of NHE3 and NKCC2 in experiment 1 and 2 was compared with that of normal, non-infected hamsters. In kidney tissues from E1 and E2, decreased or absent NHE3 activity was observed in the proximal tubules of infected hamsters, with the decrease being more marked in E1. In animals treated with ampicillin and ampicillin plus NAC, anti-NHE3 antibody labeled the apical plasma membrane domains of the proximal tubules, and showed increased activity compared to normal and infected animals (Figure 4). Similarly, IHC revealed a decrease in NKCC2 in the apical part of TAL cells of infected animals in both experiments, whereas an increase was observed in treated animals, especially in E1 (Figure 5). After antimicrobial treatment, and after *Leptospira* clearance, the expression of the transporters recovered.

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

A semi-quantitative analysis from 0 (absent) to +++ (intense) was applied to verify LAg semi-quantitative analysis, NHE3 and NKCC2 expression, from all animals.

When sacrificed, all of them showed LAg distribution on kidney, lung and liver tissues. Animals that were treated with ampicillin and ampicillin with NAC demonstrated leptospiral decreased distribution, or clearance. The kidney semi-quantitative analysis of LAg, and NHE3 and NKCC2 expression from infected non-treated, and treated animals with ampicillin in both experiments, are in table 2.

Serum analysis

In E1 and E2, the urea values of untreated controls were 412 ± 150 mg/dl and 392.5 ± 57 mg/dl respectively, being significantly higher than those of the AMP group: 63 ± 18 mg/dl; 102 ± 9 mg/dl and AMP+NAC group: 62 ± 04 mg/dl; 98 ± 10 mg/dl respectively ($p < 0.005$). There was no difference between the untreated and NAC groups.

In E1 and E2, the serum bilirubin values of untreated controls were: 11.0 ± 2.8 mg/dl; 17 ± 3.5 mg/dl respectively, being significantly higher than those of the AMP group: < 1.0 mg/dl (E1 and E2) and AMP+NAC group: < 1.0 mg/dl (E1 and E2) ($p < 0.005$). There was no difference between the untreated and NAC groups.

In E1, in untreated control animals, serum TBARS levels were 17.6 ± 7.2 $\mu\text{mol/L}$, being significantly higher than those of the NAC (3.2 ± 1.7 $\mu\text{mol/L}$), AMP (3.1 ± 1.6 $\mu\text{mol/L}$) and AMP+NAC (2.1 ± 1.2 $\mu\text{mol/L}$) groups ($p < 0.005$).

Discussion

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

In the present study we were particularly interested in the effects of antibiotics and adjuvant antioxidant therapy on the NHE3 and NKCC2 renal transporters which have been recently implicated in leptospiral acute renal failure.^{19,20}

Two experiments simulating two clinical presentations of Weil's disease were designed: the high inoculum experiment (E1) was associated with earlier disease onset (fulminant monophasic illness) and higher amounts of leptospiral antigen/s in tissues. The low inoculum experiment (E2) was associated with prolonged disease (prolonged course of infection illness) and with the detection of lower amounts of LAg in target tissues.

Guinea-pigs and hamsters are the suitable experimental models for acute lethal leptospirosis.⁵⁻⁷ The spectrum of physiological and morphological lesions ranges from renal tubular and interstitial damage to pulmonary hemorrhages and jaundice^{7,39,40} which were demonstrated in untreated infected hamsters in both experiments.

Blood urea has been previously used as a marker of renal failure in experimental leptospirosis^{6,39}, and also in our study infected animals presented a high serum urea levels. Blood samples obtained were too small to allow measurements of other biochemical parameters.

The two deaths seen in the treated groups probably indicate the limitation of antimicrobial therapy in the late stage of infection⁴¹. Renal tubular lesions, focal alveolar hemorrhage and liver plate disarray induced in the present animal model are the typical features of human and experimental leptospirosis.^{39,42-44} Identification of leptospira and/or their antigen/s by IHC showed more LAg in kidney, liver and lung in E1. The low amount of LAg detected in lung tissue is in accordance with previous findings.^{6,45,46}

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

The effect of antimicrobial therapy for leptospirosis in clinical practice is a debated issue. Although most authors indicate the use of antibiotics irrespective of the duration of symptoms^{26,47}, available data from human disease and experimental models, question the impact of antimicrobial therapy on late infection (after 4-5 days of symptoms).^{28,32,33} A wide range of antibiotics are effective against leptospires *in vitro*, in experimental animal models and in clinical trials.^{27,28,29} The probable explanation for the lack of impact of antimicrobial therapy on mortality in some instances is that, once installed, renal and lung complications cannot be reversed by antibiotics and thus supportive care (peritoneal dialysis, mechanic ventilation) is an important tool to improve survival.

We believe these data are particularly important in the case of NHE3 and NKCC2 renal transporters since recent data have implicate direct toxic effects of leptospiral compounds on their inhibition.¹⁹

Ampicillin was selected because previous studies demonstrated benefits *in vivo*.^{28,29} Our choice to start antibiotics after the onset of clinical signs of leptospirosis in E1, and late in E2 better reflects the reality of clinical practice.

In both E1 and E2, treated hamsters presented significant decreased levels of systemic urea and bilirubin. Bilirubin is not directly related to renal failure but, when jaundice is present in Weil's disease, it increases morbidity and in some cases it has been used as a marker of disease severity.⁴⁸ Histopathology of all treated animals in both experiments demonstrated a reduction or clearance of LAg, and also a reduction of the most common lesions occurring in severe disease.

Leptospirosis is associated with peculiar defects in ionic transport along the nephron, resulting in excessive sodium and potassium wasting.^{9,10} Different mechanisms have been postulated and recent evidence points to inactivation and down-

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

regulation of NKCC2 in TAL cells or a toxic inhibition of Na^+/K^+ -ATPase by leptospiral lipids.^{19,25} Recently, down-regulation of NHE3 in renal proximal tubules was also demonstrated.²⁰

Previous studies have shown that the main factors associated with the pathogenesis of the disease are the presence of organisms and possibly the production of toxins.^{5,6} The proximal tubular location of leptospires and their products has been confirmed by some studies.^{6,15}

Wu et al., demonstrated the inhibitory effect of *Leptospira santarosai* serovar Shermani outer membrane protein on NKCC2 in TAL cells. This inhibition results in more distal sodium delivery and subsequent renal potassium loss. Specific antiserum against the outer membrane protein of that leptospiral strain showed that inhibitory effects were partially abolished by antiserum.¹⁹ There is at least a direct effect from leptospira or leptospira compounds on renal transporters. In this experiment using an outer membrane protein from L.shermani, it inhibits $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ co-transporter (NKCC2) activity in medullary TAL cells, and these changes were dose dependent and reversed using antibody against outer membrane protein from L.Shermani. In the same study, they suggested that cultured mTAL cells after 48 hours of incubation with L.Shermani, decreased NKCC2 activity and it was not related to cell damage.¹⁹

These experimental observations are in accordance with the physiological characterization of ionic imbalance in patients with severe leptospirosis.^{19,21}

In parallel to this study, we detected in both experiments a reduced NKCC2 expression in infected animals reestablished after antimicrobial treatment. This was more striking in E1, but a limitation of the study, was that quantification of renal transporter activity was not feasible. However, the differences between infected-

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

untreated and treated hamsters, were evident. These results were similar to those observed for NHE3.

Andrade et al., demonstrated inhibition of NHE3 activity, but increased NKCC2 activity in hamster with acute renal failure infected with serovar Pomona.²⁰ The difference between our study and that of Andrade et al. is that our model represents severe disease, with inocula of serovar Copenhageni producing more marked acute renal failure.

Since our model reproduced severe renal failure, it could temporarily affect these renal transporters. The present study did not focus on the primary event that triggers renal transporter dysfunction, but showed that antibiotic therapy improves the expression of target molecules and renal function, as observed by serum urea measurements.

A role for systemic inflammation in leptospirosis is still disputed. A cross sectional study on humans with severe disease demonstrated elevated serum markers of oxidative stress.¹⁷ A positive correlation between serum nitric oxide levels and creatinine in patients with acute severe leptospirosis was observed.⁴⁹ Human and experimental studies using NAC demonstrated benefits against systemic inflammation and oxidative stress in different diseases and appeared to be a promising adjuvant therapy for malaria.

50

In the present study, NAC decreased the serum levels of TBARS when administered alone to infected animals and had no beneficial effect on the histopathology and immunohistochemistry assays, when administered alone or in combination with ampicillin.

The present study confirmed the reduced expression of NHE3 in the proximal tubules in a model of severe disease in both experiments, with expression being rescued

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

by ampicillin treatment, probably due to leptospiral clearance. The same findings were observed for NKCC2 in TAL in both experiments. Our findings do not provide evidence of any benefit of antioxidant therapy in experimental leptospirosis. We suggest that tubular dysfunction in leptospirosis is probably related to direct effects of leptospire and/or their products on renal transporters, and can be reversed by early and late antimicrobial therapy. This observation provides a further rationale to support the use of antibiotics in clinical practice even in late infection complicated by severe renal and respiratory disease.

Financial support: Financial support for this study was provided by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, the Fundação Faculdade de Medicina USP, and the Laboratório de Investigação Médica USP, and Public Health Service grants AI052473 and TW00919 from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases; grants 300861/96-11 and 420067/2005-1 and the Renorbio Program from the Brazilian National Research Council.

Author's addresses: Anne Spichler and Antonio Seguro, Department of Nephrology, LIM 12, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil, Laboratório Pesquisa Básica LIM/12, Faculdade de Medicina USP, Av. Dr. Arnaldo, 455 3th floor, room 3310, Mail code: 01246-903, E-mails: annespichler@terra.com.br and trulu@usp.br. Albert I Ko and Everton Fagonde, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz,

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

Fundação Oswaldo Cruz/MS, Rua Waldemar Falcão, 121, Salvador, Bahia Mail code: 40295-001, Brazil. E-mails: aik2001@med.cornell.edu and efagonde@hotmail.com

Thales de Brito e Ana Maria Silva, Institute of Tropical Medicine, University of Sao Paulo Medical School, LIM 06, Sao Paulo, Brazil E-mail: thalesbr@usp.br Phone: +55-11-30617066 Fax:+55 -11-30645132., Daniel Athanazio, Departamento de Biointeração – ICS – UFBA, Av. Reitor Miguel Calmon s/nº – Campus do Canela. Mail code: 40.110-100, Salvador – Bahia – Brazil.. E-mail: dathanazio@cpqgm.fiocruz.br

Corresponding author:

Anne Spichler, MD; PhD Student of University of Sao Paulo, Department of Nephrology, Sao Paulo, Brazil. Laboratorio Pesquisa Basica LIM/12, Faculdade de Medicina USP, Av. Dr. Arnaldo, 455 3º andar, sala 3310, CEP: 01246-903 São Paulo, SP, Brazil. E-mail: annespichler@terra.com.br

References:

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

- 1 Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM, 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3: 757-771.
- 2 Levett PN, 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296-326.
- 3 Ricaldi J, Vinetz JM, 2006. Leptospirosis in the tropics and in travelers. *Curr Infect Dis Reports* 8: 51-58.
- 4 Spichler A, Mook M, Chapola EG, Vinetz JM, 2005. Weil's disease: an unusually fulminant presentation characterized by pulmonary hemorrhage and shock. *Braz J Infect Dis* 9: 336-340.
- 5 De Brito T, Freymuller E, Hoshino S, Penna DO, 1966. Pathology of the kidney and liver in the experimental leptospirosis of the guinea-pig. A light and electron microscopy study. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 341: 64-78.
- 6 Nally JE, Chantranuwat C, Wu XY, Fishbein MC, Pereira MM, Da Silva JJ, Blanco DR, Lovett MA, 2004. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Pathol* 164:1115-1127.
- 7 Oliva R, Infante JF, Gonzalez M, Perez V, Sifontes S, Marrero O, Valdes Y, Farinas M, Esteves L, Gonzalez I, 1994. Pathologic-clinical characterization of leptospirosis in a golden Syrian hamster model. *Arch Med Res* 25:165-170.
- 8 Seguro AC, Lomar AV, Rocha AS, 1990. Acute renal failure of leptospirosis: nonoliguric and hypokalemic forms. *Nephron* 55:146-151.
- 9 Yang CW, Wu MS, Pan MJ, 2001. Leptospirosis renal disease. *Nephrol*

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

- Dial Transplant* 16; S5: 73-77.
- 10 Sitiprija V, Kearkiat P, 2005. Nephropathy in Leptospirosis. *J Postgrad Med* 51: 184-188.
- 11 Abdulkader RCRM, Seguro A, Malheiro PS, Burdman EA, Marcondes M, 1996. Peculiar eletrolytic and hormonal abnormalities in acute renal failure due to Leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 54 (1): 1-6.
- 12 Covic A, Goldsmith DJ, Gusbeth-Tatomir P, Seica A, Covic M, 2003. A retrospective 5-year study in Moldova of acute renal failure due to leptospirosis: 58 cases and a review of the literature. *Nephrol Dial Transplant* 18:1128-1134.
- 13 Marotto PCF, Nascimento CMR, Seguro AC, 1999. Acute lung injury in Leptospirosis: Clinical and Laboratory Features, outcome, and factor associated with mortality. *Clinical Infectious Diseases* 29:1561-1563.
- 14 Sitiprija V, 2006. Renal Dysfunction in leptospirosis: a view from the tropics. *Nature Clinical Practice Nephrology* 12: 658-659.
- 15 Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, Summers TA, Wagar EA, Cheville NF, Hartskeerl RA, Haake DA, 1999. Expression and Distribution of Leptospiral Outer Membrane components during Renal Infection of Hamsters. *Infect Immun* 67 :853-861
- 16 Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hong JJ, Yu CC, Vandewalle A, Huang CC, 2000. Leptospira outer membrane protein activates NF- κ B and downstream genes expressed in medullary thick ascending limb cells. *J Am Soc Nephrol* 11: 2017-2026.
- 17 Spichler A, Shimizu M, Seguro AC, 2005. Oxidative stress in leptospiroses: first report. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical;

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

- Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul; 2005; Florianópolis: *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 459.
- 18 Zafarullah M, Li WQ, Ahmad M, 2003. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. Review. *CMLS* 60 :6-20.
- 19 Wu M, Yang C, Pan M, Chang C, Chen Y, 2004. Reduced renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ co-transporter activity and inhibited NKCC2 mRNA expression by *Leptospira shermani*: from bed-side to bench. *Nephrol Dial Transplant* 19 :2472-2479.
- 20 Andrade L, Rodrigues Jr AC, Sanches TR, Souza RB, Seguro AC, 2007. Leptospirosis leads to dysregulation of sodium transporters in the kidney and lung. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: 586-592
- 21 Lin CL, Wu MS, Yang CW, Huang CC, 1999. Leptospirosis associated with hypokalaemia and thick ascending limb dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 14: 193-195.
- 22 Knepper MA, Brooks HL, 2001. Regulation of the sodium transporters NHE3, NKCC2, and NCC in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10: 655-659.
- 23 Elkjzer ML, Kwon TH, Wang W, Nielsen J, Knepper M, Frokizer J, Nielsen S, 2002. Altered expression of renal NHE3, TSC, BSC-1, and ENaC subunits in potassium-depleted rats. *Am J Renal Physiol* 283:1376 -1388.
- 24 Wang W, Know TH, Li C, Frokler J, Knepper M, Nielsen S, 2002. Reduced expression of Na-K-2Cl cotransporter in medullary TAL I vitamin D-induced hypercalcemia in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F34-44.

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

- 25 Younes-Ibrahim M, Buffin-Meyer B, Cheval L, Burth P, Castro-Faria MV, Barlet-Bas C, Marsy S, Doucet A, 1997. Na-K-ATPase: a molecular target for *Leptospira interrogans* endotoxin. *Braz J Med Biol Res* 30 :213-223.
- 26 W.H.O, 2003. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.
- 27 Griffith ME, Hospenthal D, Murray CK, 2006. Antimicrobial therapy of leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 19: 533-537.
- 28 Alexander AD, Rule PL, 1986. Penicillins, cephalosporins, and tetracyclines in treatment of hamsters with fatal leptospirosis. *Antimicrob Agents Chemother* 30: 835-839.
- 29 Truccolo J, Charavay F, Merien F, Perolat P, 2002. Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:848-853.
- 30 Panaphut T, Domrongkitchaiporn S, Vibhagool A, Thinkamrop B, Susaengrat W, 2003. Ceftriaxone compared with sodium penicillin G for treatment of severe leptospirosis. *Clin Infect Dis* 36:1507-1513.
- 31 Suputtamongkol Y, Niwattayakul K, Suttinont C, Losuwanaluk K, Limpai boon R, Chierakul W, Wuthiekanun V, Triengrim S, Chenchittikul M, White NJ, 2004. An open, randomized, controlled trial of penicillin, doxycycline, and cefotaxime for patients with severe leptospirosis. *Clin Infect Dis* 39:1417-1424.
- 32 Costa E, Lopes AA, Sacramento E, Costa YA, Matos ED, Lopes MB, Bina JC, 2003. Penicillin at the late stage of leptospirosis: a randomized controlled trial. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 45:141-145.

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

- 33 Daher E, Nogueira CB, 2000 Evaluation of penicillin therapy in patients with leptospirosis and acute renal failure. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 42:327-332.
- 34 Ko AI, Galvao RM, Ribeiro DCM, Jonhson WD, Riley LW, 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 354: 820-825.
- 35 Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K, 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
- 36 De Brito T, Prado MJBA; Negreiros VAC; Nicastrri AL; Sakata EE; Yasuda PH; Santos RT, Alves VAF, 1992. Detection of leptospiral antigens (*L.interrogans* serovar Copenhageni serogroup *Icterohaemorrhagiae*) by immunoelectron microscopy in the liver and kidney of experimentally infected guinea-pigs. *Int J Exp Pathol* 73: 633-642.
- 37 Llama-PF, Andrews P, Ecelbarger CA, Soren Nielsen, Knepper M, 1998. Concentrating defect in experimental nephritic syndrome: altered expression of aquaporins and thick ascending limb Na⁺ transporters. *Kidney International* 54:170-179.
- 38 Kim GH, Ecelbarger CA, Mitchell C, Parker RK, Wade JB, Knepper MA, 1999. Vasopressin increases Na-K-2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol Renal Physiol* 276: F96-103.
- 39 Arean VM, 1962. Studies on the pathogenesis of leptospirosis. II. A clinicopathologic evaluation of hepatic and renal function in experimental leptospiral infections. *Lab Invest* 11:273-288.

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

- 40 Davila de Arriaga AJ, Rocha AS, Yasuda PH, De Brito T, 1982. Morpho-functional patterns of kidney injury in the experimental leptospirosis of the guinea-pig (*L. icterohaemorrhagiae*). *J Pathol* 138:145-161.
- 41 Faine S, Kaipainen WJ, 1955. Erythromycin in experimental leptospirosis. *J Infect Dis* 97:146-151.
- 42 Arean VM, 1962. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *Amer J Path* 40: 393-423.
- 43 De Brito T, Menezes LF, Lima DM, Lourenco S, Silva AM, Alves VA, 2006. Immunohistochemical and in situ hybridization studies of the liver and kidney in human leptospirosis. *Virchows Arch* 448:576-583.
- 44 Alt DP, Bolin CA, 1996. Preliminary evaluation of antimicrobial agents for treatment of *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection in hamsters and swine. *Am J Vet Res* 57:59-62.
- 45 Miller NG, Allen JE, Wilson RB, 1974. The pathogenesis of hemorrhage in the lung of the hamster during acute leptospirosis. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 160:269-278.
- 46 Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Ricaldi JN, Torres S, Silva H, Cespedes MJ, Matthias MA, Swanvutt MA, Lopez Linan R, Gotuzzo E, Guerra H, Gilman RH, Vinetz JM, 2005. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with a quantification of leptospiral burden. *Clin Infect Dis* 40 :343-51.
- 47 Vinetz JM, 2003. A mountain out of a molehill: do we treat acute leptospirosis, and if so, with what? *Clin Infect Dis* 36:1514-1515.
- 48 Burth P, Younes-Ibraim M, Santos MC, Castro-Faria Neto HC, de Castro Faria MV, 2005. Role of nonesterified unsaturated fatty acids in the

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

pathophysiological processes of leptospiral infection. *J Infect Dis* 191: 51-57.

- 49 Maciel EAP, Athanazio DA, Reis EAG, Cunha FQ, Queiroz A, Almeida D, McBride AJ, Ko AI, Reis MG, 2006 High serum nitric oxide levels in patients with severe leptospirosis. *Acta Tropica* 100: 256-260
- 50 Watt G, Jongsakul K, Ruangvirayuth R, 2002. A pilot study of N-acetylcysteine as adjunctive therapy for severe malaria. *QJM* 95:285-290.

For Peer Review

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

Legend for figures

Figure 1. Histopathology of kidney tissue in infected and treated hamsters. a and b: kidney from infected, non-treated hamsters in E1 and E2, respectively. Note tubular cells with degenerative cytoplasmic alterations (a) Dilated tubules with flat epithelial lining, interstitial inflammation and edema (b) H&E X 200. c: renal tissue showing normal tubules in a treated animal in E1. (c) H&E X200. d and e: IHC staining of renal tissue from infected, non-treated hamsters with LAg present in the cytoplasm of interstitial inflammatory cells in the kidney interstitium, prominent in (d,e) X 200. f: LAg deposits are almost absent in treated animals in E2. (f) X200.

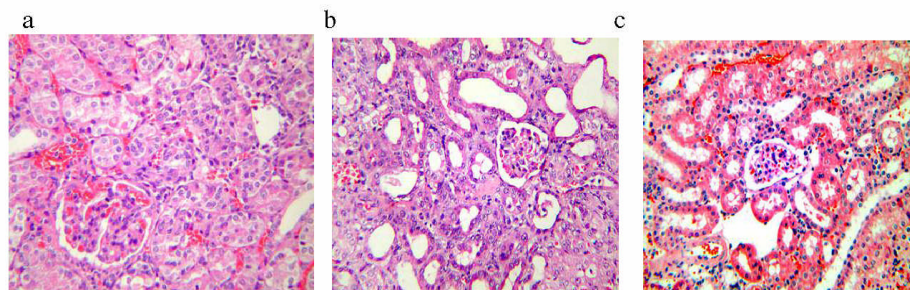
Figure 2. Histopathology of lung tissue in infected and treated hamsters. a and b: lung from infected, non-treated hamsters from E1 and E2, respectively. Focal pulmonary hemorrhage in lungs is more prominent in E1. (a,b) H&E X 200 c: treated animals showed normal lung histology in E1. (c) H&E X200 .d and e: IHC-LAg deposits in lung from infected, non-treated hamsters are more evident in E1. (d,e) X 200. f: Absence of LAg deposits in treated animals in E2. (f) X200.

Figure 3. Histopathology of liver tissue from infected hamsters. a and b: liver from infected, non-treated hamsters from E1 and E2, showing liver plate disarray, particularly evident at the centrilobular region in both experiments. (a,b) H&E X 200. c and d: IHC- LAg in liver from infected, non-treated hamsters is more evident in E1. (c,d) X 200.

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

Figure 4. Immunohistochemical (IHC) analysis of NHE3 expression in proximal tubules. a: infected hamster in E1, showing decreased NHE3 in the apical domain of proximal tubule cells. (a) X 400. b: NHE3 is not expressed in infected hamsters in E2. (b) X200 c: treated animals in E1; NHE3 is clearly expressed. d: treated animals with ampicillin started 8 days after infection in E2; there was a light expression of NHE3 (d) X200

Figure 5. IHC of NKCC2 expression in thick ascending limb. a,b: lower apical NKCC2 expression. (a) X 200, (b) X360. c,d: Expression of NKCC2 in treated animals in E1 and E2 (treated animals with ampicillin started 8 days after infection). (c) X360, (d) X200



American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

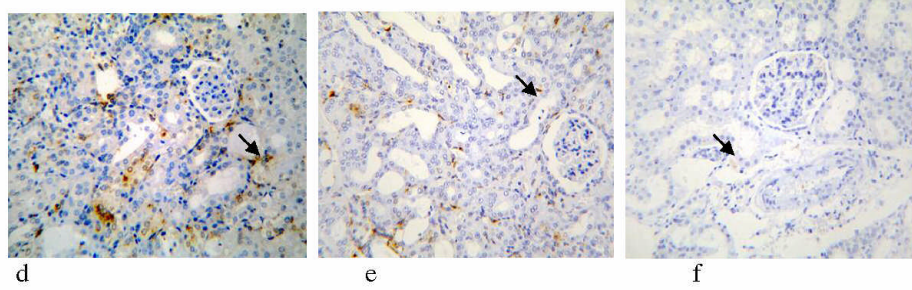


Figure 1.

For Peer Review

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

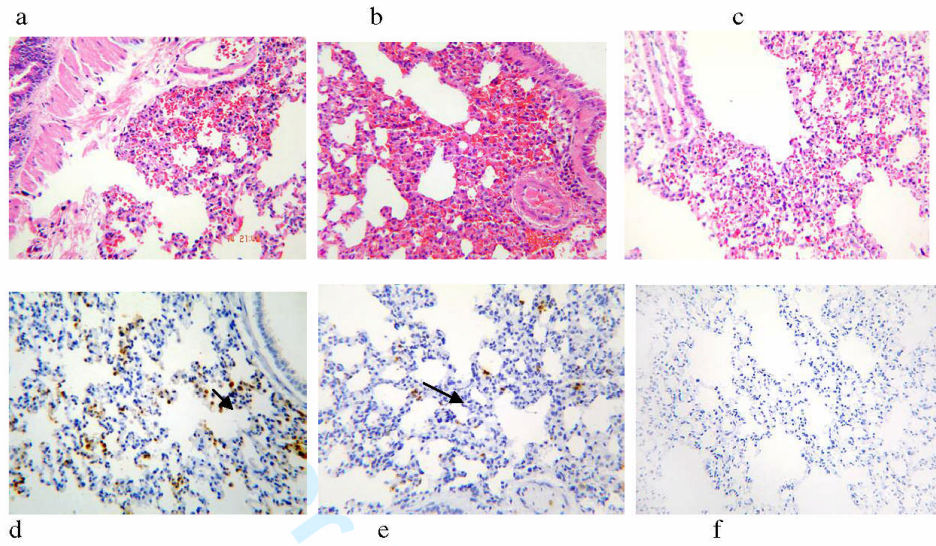


Figure 2.

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

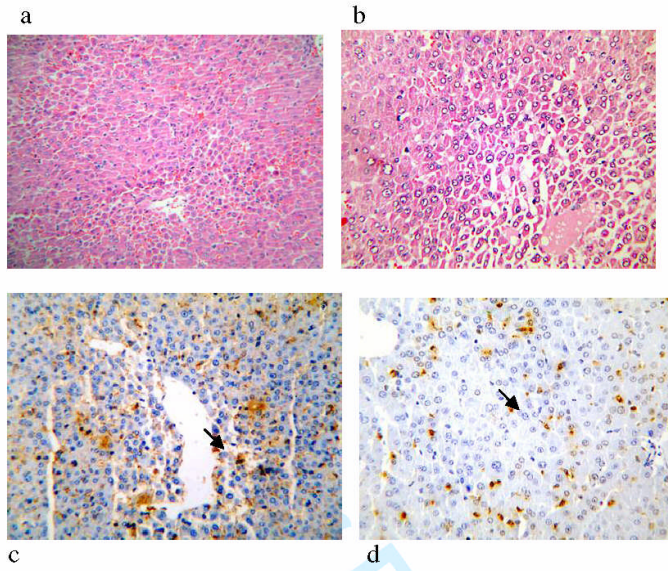


Figure 3.

Peer Review

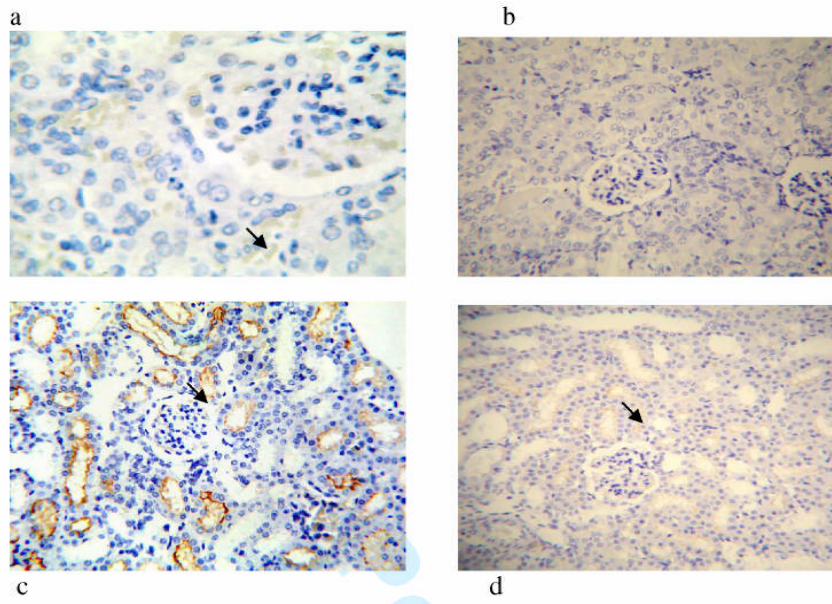


Figure 4.

Peer Review

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

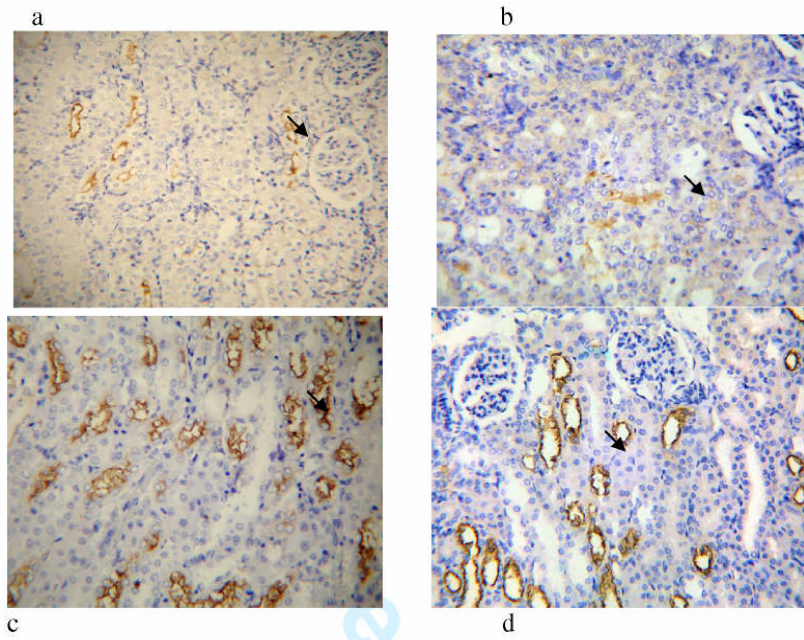


Figure 5.

Table 1. Clinical signs and outcome of experimentally infected hamsters

	Fever n (%)	Hemorrhage n (%)	Prostration n (%)	Jaundice n (%)	Piloerection n (%)	Deaths N (%)
Experiment E1						
Groups						
N = 6						
UNTREATED	4/6 (67)	2/6 (33)	6/6 (100)	2/6 (33)	2/6 (33)	3/6 (50)
AMP	-	-	-	-	-	-
NAC	2/6 (33)	3/6 (50)	5/6 (84)	2/6 (33)	2/6 (33)	3/6 (50)
AMP+NAC	-	-	-	-	-	-
Experiment E2						
Groups						
N = 3						
UNTREATED(1)	1/3(33)	-	1/3(33)	-	2/3(67)	-
AMP(1)	-	-	-	-	-	-
NAC(1)	2/3(67)	-	2/3(67)	-	2/3(67)	-
AMP+NAC(1)	-	-	-	-	-	1/3(33)
AMP(2)	-	-	1/3(33)	-	1/3(33)	1/3(33)
AMP+NAC(2)	-	-	1/3(33)	-	1/3(33)	-

Note: UNTREATED (untreated controls), AMP (ampicillin-treated group), NAC (N-acetylcysteine-treated group), and AMP+NAC (ampicillin plus N-acetylcysteine-treated groups, (1)- first group of E2, (2)-second group of E2.

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

Table 2 - A semi-quantitative analysis to verify LAg, NHE3 and NKCC2 expression

Experiment 1 animals	Group	LAg In kidney tissue	NHE3	NKCC2	Signs hemorrhage	fever	death
G1A1	UNTREATED	Not done	-	-	no	yes	yes
G1A2		+++	0	+	No	yes	no
G1A3		+++	0	+	yes	yes	no
G1A4		+++	+	+	No	no	no
G1A5		Not done	-	-	Yes	no	yes
G1A6		+++	0	+	no	yes	yes
Experiment 2 animals							
G1A1	UNTREATED	++	0	+	No	No	No
G1A2		+++	+	0	No	Yes	No
G1A3		+++	+	+	no	no	No
Experiment 1 animals		LAg In kidney tissue	NHE3	NKCC2	Signs hemorrhage	fever	death
G2A1	AMP treated	-	+++	++	-	-	-
G2A2		-	++	++	-	-	-
G2A3		-	+++	+	-	-	-
G2A4		-	++	++	-	-	-
G2A5		-	+++	+	-	-	-
G2A6		-	++	++	-	-	-
Experiment 2 Animals							
G2A1	AMP 1 treated	+	+++	++	-	-	-
G2A2		-	++	+	-	-	-
G2A3		+	++	++	-	-	-
G2A1	AMP 2 treated	+	+	+	-	-	yes
G2A2		-	++	+	-	-	-
G2A3		+	++	+	-	-	-

Note: UNTREATED (untreated controls), AMP treated (ampicillin-treated group) from E1;

AMP 1 treated (ampicillin-treated group) from E2, started treatment on day 6 post infection; AMP 2 treated (ampicillin-treated group) from E2 started treatment on day 8 post infection.

LAg (Leptospiral Antigen)

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](#)