

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

**Infeção Experimental de Camundongos C3H/HeJ
com *L. interrogans* sorovar Copenhageni –
Susceptibilidade e Resposta Imune Protetora**

Tatiane Mendes Varela Ramos

Rio de Janeiro
2007

Dissertação MBP -IOC

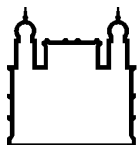
T.M.V RAMOS

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

TATIANE MENDES VARELA RAMOS

**Infecção Experimental de Camundongos C3H/HeJ com
L. interrogans sorovar Copenhageni – Susceptibilidade e
Resposta Imune Protetora**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Bacteriologia.

Orientadora: Prof. Dra Martha Maria Pereira

RIO DE JANEIRO
2007

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Manguinhos / CICT / FIOCRUZ - RJ

R175 Ramos, Tatiane Mendes Varela

Infecção experimental de camundongos C3H/HeJ com *L. interrogans* sorovar Copenhageni : susceptibilidade e resposta imune protetora / Tatiane Mendes Varela Ramos. – Rio de Janeiro, 2007.
xii, 63 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária, 2007.
Bibliografia: f. 57-63.

1. Leptospirose. 2. Camundongos. 3. Infecção experimental. 4. Fatores de virulência. 5. Proteínas de membrana bacteriana externa. 6. Vacinas.
I. Título.

CDD: 616.92

AGRADECIMENTOS

Nessa oportunidade, gostaria de agradecer a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desta dissertação.

A Deus, o autor da vida e de toda a Ciência, que me capacitou para realização deste trabalho.

Aos meus pais Carlos Alberto e Hilda, por me ajudarem na realização deste sonho e por todo esforço que fizeram para que eu chegasse até aqui.

À minha filha Deborah, minha bênção, por “compreender” cada momento em que precisei estar ausente e ainda me receber com aquele lindo sorriso.

Ao meu marido Marcelo, por todos os momentos em que estive ao meu lado e muitas vezes apenas para me ouvir.

À minha grande amiga Ilana Balassiano, que me ajudou em várias etapas deste trabalho, além de me dar força nos momentos mais difíceis.

À Dra Danielle Frias Ribeiro Bisaggio e a todos os meus amigos do laboratório que de alguma forma contribuíram durante o curso de mestrado.

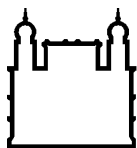
À minha orientadora, Dra Martha Maria Pereira, por permitir a realização desta dissertação e por tudo que aprendi neste período.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz, por oferecer a oportunidade de complementar a minha formação acadêmica e possibilitar a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	vii
SUMMARY	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
3- OBJETIVOS	26
4- METODOLOGIA	27
4.1- Identificação da cepa.....	27
4.2 – Infecção experimental.....	31
4.2.1- Testes de virulência.....	31
4.2.1.1- Cultivo da bactéria e preparação do inóculo.....	31
4.2.1.2 – Recuperação de leptospiras a partir de tecidos infectados.....	32
4.2.2 – Infecção experimental com camundongos C3H/HeJ	32
4.3 - Resposta de anticorpos nos camundongos infectados.....	33
4.3.1 – Sorologia por MAT.....	33
4.3.2 – <i>Western blotting</i> utilizando extrato de LPS e extrato enriquecido em proteínas de membrana externa (OMPs).....	33
4.3.2.1- Extração de LPS e proteínas de membrana externa (OMPs).....	34
4.3.2.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida -SDS-PAGE e <i>Western blotting</i>	35
4.4 – Presença de <i>Leptospira</i> e PCR nos tecidos de camundongos C3H/HeJ infectados.....	36
4.4.1 – Cultura a partir dos tecidos.....	36
4.4.2- Reação da polimerase em cadeia – PCR.....	36
5- RESULTADOS.....	38
5.1- Identificação da cepa.....	38
5.2- Infecção experimental.....	38
5.2.1- Hamsters.....	38
5.2.2- Camundongos C3H/HeJ.....	38
5.3 – Resposta de anticorpos específicos nos camundongos infectados.....	39
5.3.1 – Sorologia por MAT.....	39
5.3.2 – SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> utilizando extrato de LPS e extrato	

enriquecido em proteínas de membrana externa (OMPs).....	39
5.4 – Detecção de <i>Leptospira</i> nos tecidos por cultura e PCR.....	40
5.4.1- Cultura a partir dos tecidos.....	40
5.4.2- PCR a partir dos tecidos.....	40
6- DISCUSSÃO.....	50
7- CONCLUSÃO.....	56
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

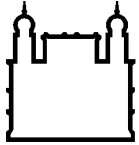
Infecção Experimental de Camundongos C3H/HeJ com *L. interrogans* sorovar Copenhageni – Susceptibilidade e Resposta Imune Protetora

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Tatiane Mendes Varela Ramos

A leptospirose humana e animal representam um problema de saúde pública de importância no Brasil e no Mundo. O homem pode se contaminar pela exposição ao animal infectado ou ao seu meio ambiente. Diversos estudos têm focalizado o desenvolvimento de uma nova geração de vacinas baseadas na identificação de proteínas da membrana externa (OMPs), as quais podem ser relevantes na interação parasito-hospedeiro e estimular imunidade heteróloga. Contudo, há limitações no estabelecimento de modelos experimentais para o estudo de vacinas, sendo o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a susceptibilidade e a resposta imune protetora em camundongos C3H/HeJ à infecção por *Leptospira*. Assim, foi utilizado um isolado clínico de *Leptospira* sorovar Copenhagen (25179) para os testes de susceptibilidade. Dezenove de 27 camundongos (4-5 semanas de idade) foram infectados com *Leptospira* nas doses equivalentes a $1,8 \times 10^5$, $2,5 \times 10^5$ e $2,3 \times 10^6$, nos três experimentos subsequentes. Deste total, 9 camundongos foram susceptíveis à dose letal, sendo que o evento fatal ocorreu 7 a 10 dias após a infecção experimental. No 21^o dia, os 10 camundongos que sobreviveram foram sacrificados para a coleta de sangue, assim como a retirada dos rins e do fígado. Todos apresentaram títulos elevados de anticorpos aglutinantes (1:1600 a 1:6400) detectáveis pelo teste de aglutinação microscópica (MAT). Após extração de antígenos (LPS e OMPs) da cepa 25179, um soro imune de camundongo revelou uma banda de 39,35kDa do extrato de OMPs pela técnica de *Western blotting* (anticorpo secundário anti-IgG de camundongo). Porém, não houve revelação da banda característica do LPS de *Leptospira* utilizando o mesmo anticorpo secundário. As leptospirosas foram isoladas em cultura dos rins de 8 e do fígado de 2, dentre 10 animais sobreviventes. PCR detectou DNA de *Leptospira* nos rins de 9 dos camundongos infectados. Os dados obtidos confirmam a susceptibilidade e a potencial utilização do modelo para estudos ligados à patogênese da leptospirose. Entretanto, tais resultados obtidos não são conclusivos devido à ausência de resposta imune de anticorpos dirigidos ao LPS, e de uma fraca resposta de anticorpos às proteínas da membrana externa. Investigações adicionais são necessárias na tentativa de entender o mecanismo imune e a patogênese da leptospirose humana.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Experimental infection of C3H/HeJ mice with *L. interrogans* serovar Copenhageni - Susceptibility and Protective Immune Response

SUMMARY

MASTER THESIS

Tatiane Mendes Varela Ramos

Human and animal leptospirosis represents a serious public health problem in Brazil and in many other parts. When in contact with infected animals or their environment human being can be infected. Several studies have been trying to develop a new generation of vaccines based on the identification of outer membrane proteins (OMPs). These epitopes can be relevant either to host-parasite relationship or to induce heterologous immunity. However, there are limitations to establish an animal experimental model to test the effectiveness of such vaccines. Hence, the main goal of this work is to evaluate the susceptibility and the protective immune response of C3H/HeJ mice to the leptospiral infection. In a previous study, a *Leptospira* strain isolated from a patient, identified as belonging to the serovar Copenhagen (25179), was used for the susceptibility tests. This strain was used to infect 19 out 27 mice (4 to 5-weeks old) with a dose of 1.8×10^5 , 2.5×10^5 and 2.3×10^6 in the three subsequent experiments. Approximately half of the mice tested ($n = 9$) showed susceptibility to a lethal dose and died 7-10 days later. In the 21st day, all the mice that survived ($n = 10$) were killed and had their blood, kidneys and liver collected or removed. All mice had shown high titre of agglutinate antibodies (1:1600 to 1: 6400) detected by the microscopy agglutination test (MAT). The antigens (LPS and OMPs) from the 25179 strain were extracted and the Western blotting using a secondary mouse antibody revealed a band of 39,35kDa of OMPs extract. On the other hand, the same secondary antibody did not recognize any band from the LPS extract. Of the 10 mice that have survived, *Leptospira* was recovered from the kidney ($n = 8$) and liver ($n = 2$). Although the results are still not conclusive, the PCR was positive for the kidney of nine infected mice. The results presented here confirm the susceptibility and a potential application of the model to test the *Leptospira* pathogenesis. Previous studies have shown an immune response against the OMPs, but in our work it was detected a weak immune response to the OMPs and no immune response to the LPS. This point out to need of additional investigations for a better understanding of the immune response and pathogenesis of human leptospirosis.

1. INTRODUÇÃO

Leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica, que afeta tanto os animais quanto o homem. É causada por espiroquetas invasivos pertencentes ao gênero *Leptospira*. A primeira descrição da doença conhecida ainda hoje como “Doença de Weil” ocorreu em 1886. O ambiente contaminado é fonte de infecção indireta para o homem e os animais domésticos. A infecção pode ser assintomática ou produzir uma ampla variedade de sinais e sintomas que se confundem com outras doenças febris. Atualmente são reconhecidos mais de 230 sorovares patogênicos de *Leptospira*. De acordo com os dados da literatura, a diversidade dos sorovares está relacionada a diferenças na estrutura e composição do Lipopolissacarídeo (LPS). O LPS das leptospiras representa o alvo primário para o sistema imune inato, porém, numerosos estudos mostraram que o LPS de leptospiras possui atividade endotóxica consideravelmente menor que o LPS típico das bactérias Gram-negativas. As proteínas de membrana externa (OMPs) representam também um dos principais alvos da resposta imune devido à localização na superfície da célula bacteriana. Algumas OMPs - já identificadas como potenciais imunógenos - têm sido objeto de estudos ligados ao desenvolvimento de vacinas de subunidades. As mesmas têm sido objeto de diversas publicações e incluem lipoproteínas (LipL32, LipL36, LipL41, LipL48, LipL21 e Q1p42), a proteína transmembrana designada OmpL1, proteínas periféricas como a LipL45 e proteínas com domínios semelhantes às imunoglobulinas. Os modelos experimentais mais utilizados no estudo da patogênese, manutenção de cepas virulentas e estudos de potência de vacinas são cobaios e *hamsters* recém-desmamados. Todavia, há diversas limitações no uso destes animais para o desenvolvimento de vacinas. Uma das principais razões é a falta de informação a respeito dos mecanismos imunológicos envolvidos na resposta imune protetora. Camundongos da linhagem C3H/HeJ são susceptíveis à infecção letal por *L. interrogans* sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni e representam uma alternativa em relação aos *hamsters* e cobaios.

2) REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Leptospirose

Leptospirose é uma zoonose de importância global, que afeta tanto os animais quanto o homem. É causada por espiroquetas invasivos pertencentes ao gênero *Leptospira*. A infecção humana pode ser subclínica, detectada por soroconversão em grupos de risco, ou apresentar diferentes graus de severidade (FAINE *et al.*, 1999).

2.2 – Histórico

O primeiro a descrever a doença infecciosa caracterizada por icterícia e insuficiência renal foi Adolf Weil, em 1886. Este quadro clínico, característico dos casos graves de leptospirose, ainda hoje é associado ao seu nome, sendo chamado de “doença de Weil”. Porém, uma síndrome aparentemente idêntica à doença descrita por Weil, que acometia trabalhadores de esgoto já havia sido descrita vários anos antes (FAINE, 1994).

Antes da descrição de Weil já existiam evidências de icterícia causada por leptospirosas no início do século XIX. Acredita-se que o espiroqueta *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae tenha sido introduzido na Europa oriental no século XVIII, com a disseminação de *Rattus norvegicus* vindos da Eurásia (FAINE, 1994).

A demonstração do agente etiológico da leptospirose ocorreu em Janeiro de 1915 por dois pesquisadores japoneses, Inada e Ido, que anunciaram a descoberta do agente causador da “doença de Weil”. O espiroqueta foi então nomeado *Spirochaeta icterohaemorrhagiae japonica*. Em outubro de 1915, após ser anunciada a detecção de um espiroqueta em paciente sofrendo da “doença de Weil” na Europa, o agente foi renomeado *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (INADA *et al.*, 1916; Kobayashi 2001).

Os primeiros relatos de casos humanos e da presença do *S. icterohaemorrhagiae* em roedores no Brasil ocorreram em 1917 (ARAGÃO, 1917). Em seguida, foram relatados casos esporádicos, até a ocorrência de surtos epidêmicos em grandes cidades, nos estados do Rio de Janeiro, Pernambuco, São Paulo e Bahia (GONÇALVES, 1988). As primeiras investigações epidemiológicas sistematizadas foram motivadas pelo impacto de epidemias urbanas, sendo

baseadas em inquéritos sorológicos e bacteriológicos que comprovaram a circulação da bactéria em animais portadores. Tais investigações também comprovaram taxas de prevalência de anticorpos em grupos populacionais expostos ao risco (PEREIRA & ANDRADE, 1988; 1990).

Depois de um grande surto epidêmico ocorrido no estado do Rio de Janeiro em 1988, foram identificados os primeiros casos graves de leptospirose. Estes foram marcados pela presença de hemorragia pulmonar e insuficiência respiratória, sendo manifestações mais proeminentes e fatais da doença (GONÇALVES *et al.*, 1992). Casos semelhantes têm sido detectados mais freqüentemente, sendo comprovados recentemente pelo isolamento e identificação do agente etiológico (Da SILVA *et al.*, 2002).

2.3 – A bactéria

Os agentes etiológicos da leptospirose compreendem um grupo heterogêneo de espécies patogênicas pertencentes ao gênero *Leptospira*. São espiroquetas que exibem uma forma em espiral longa, fina e flexível, sendo altamente móveis e apresentando uma ou ambas as extremidades em forma de gancho. As leptospiras são aeróbias obrigatórias e podem ser cultivadas em meios líquidos, semi-sólidos e sólidos, porém o crescimento *in vitro* é fastidioso. A temperatura ideal para o cultivo situa-se na faixa de 28-30°C e o tempo de geração em cultura ou em modelos animais é de 6 a 8 h. As leptospiras exibem movimentos característicos de rotação e translação auxiliados pela forma em espiral e por dois filamentos axiais ou flagelos com inserções polares, localizados no espaço periplasmático entre a membrana citoplasmática e o envoltório externo (BHARTI *et al.*, 2003; AVELAR & PEREIRA, 2004).



Figura 2.1 - Micrografia eletrônica de varredura mostrando a morfologia característica do gênero *Leptospira*. *L. biflexa* da coleção de culturas do Laboratório de Referência Nacional para Leptospirose. Imagem gentilmente cedida pela Dra Danielle Frias Ribeiro Bisaggio.

Os espiroquetas compartilham características de bactérias Gram-positivas e de Gram-negativas, porém não são classificados como pertencentes a esses grupos. Como observado nas bactérias Gram-positivas, a membrana citoplasmática de espiroquetas está intimamente associada com a parede celular de peptidoglicana. Os espiroquetas também possuem membrana externa, que age como uma barreira protegendo antígenos subjacentes, como o endoflagelo, do ambiente externo. Porém, a membrana externa dos espiroquetas parece ser fluida e lábil, em contraste com a membrana externa das bactérias Gram-negativas (HAAKE, 2000; BHARTI et al., 2003).

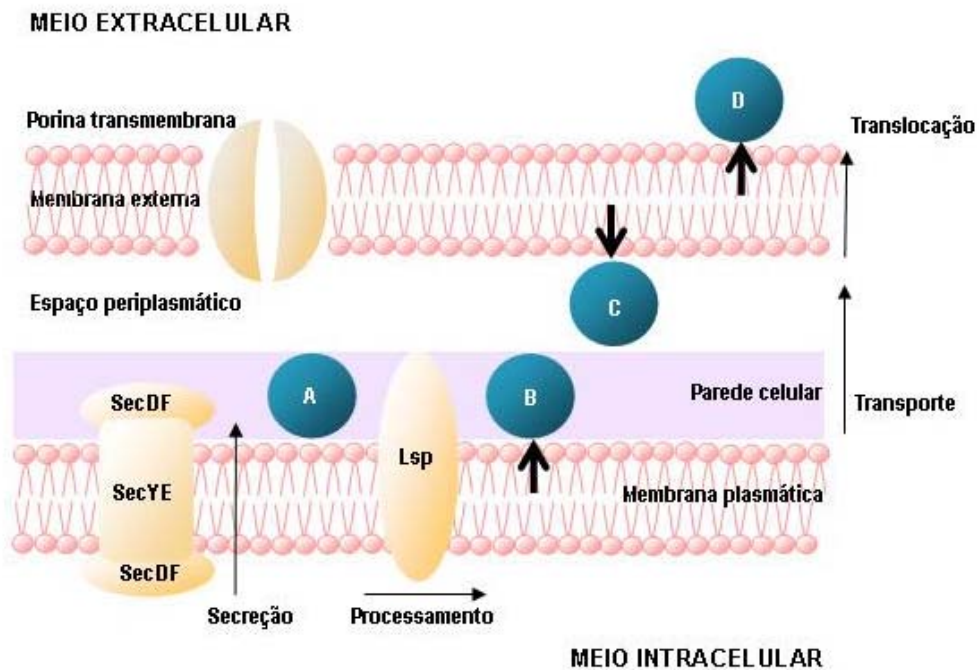


Figura 2.2- Modelo de exportação de lipoproteínas de espiroquetas.

A- Prolipoproteína (com peptídeo sinal) imediatamente após secreção; B- Lipoproteína na camada externa da membrana citoplasmática; C- Lipoproteína na camada interna da membrana externa; D- Lipoproteína exposta na superfície da membrana externa; Lsp - Peptidase de sinal; SecA/ SecYE/SecDF - Complexo translocase. Imagem adaptada de Haake, 2000.

O gênero *Leptospira*, do ponto de vista taxonômico, apresenta complexidade histórica e científica. Até 1989 eram conhecidas duas espécies de *Leptospira*: *L. interrogans*, que compreende todas as cepas patogênicas, e *L. biflexa*, contendo as cepas saprófitas isoladas do meio ambiente (FAINE & STALLMAN, 1982). Porém, o conceito de espécie evoluiu como um grupo de organismos que tem como origem um ancestral comum, na qual a geração de diversidade genética resultou em clones com diferentes graus de recombinação. Os clones são caracterizados com um considerável grau de consistência fenotípica, um grau significativo de hibridização DNA-DNA e um alto grau de similaridade na seqüência 16S rDNA (LUDWIG *et al.*, 1998).

Com base na homologia DNA-DNA são atualmente identificadas 17 espécies patogênicas e não patogênicas pertencentes ao gênero *Leptospira*, sendo pelo menos 8 patogênicas, e mais de 300 sorovares, dentre eles 230 patogênicos (BHARTI, 2003; PAPPAS & CASSIO, 2006). Entretanto, a classificação molecular é problemática uma vez que não corresponde ao sistema de classificação sorológica que tem sido útil para os clínicos e epidemiologistas por muitos anos. De acordo com a classificação genotípica, cepas patogênicas e não patogênicas podem pertencer a uma mesma espécie (YASUDA *et al.*, 1987). Além disso, a manutenção das designações *L. interrogans* e *L. biflexa* também leva a confusões de modo que são utilizados os termos *L. interrogans* sensu lato e *L. biflexa* sensu lato para se referir às espécies designadas pelos critérios de análise de DNA (BHARTI, 2003).

A sorotipagem se baseia na estabilidade de antígenos expressos na superfície da bactéria e nas reações antígeno-anticorpo, determinadas no teste de aglutinação microscópica com absorção cruzada (CAAT) (WHO, 2003). Para a realização do CAAT é necessário ter uma coleção de cepas de referência e preparar os anti-soros de coelho correspondentes, o que torna este teste demorado. Por esta razão, o CAAT é utilizado principalmente em casos de novas cepas, que representam novos sorovares, porém, não pode ser utilizado para identificação de rotina (WHO, 2003; YASUDA & ROMERO, 2006).

Na classificação sorológica o termo sorotipo foi substituído pela designação sorovar, que é definido como a unidade taxonômica básica das leptospiros e é representado por uma cepa de referência (WHO, 2003). De acordo com os dados da literatura, a diversidade de sorovares está relacionada com diferenças na estrutura e composição do Lipopolissacarídeo – LPS (CULLEN *et al.*, 2003).

Sorovares patogênicos de *Leptospira interrogans* são considerados como um grupo distinto de espiroquetas. Além de outros elementos, os estudos bioquímicos, sorológicos e genéticos demonstraram a presença de LPS e dos genes *lpx*, os quais codificam enzimas envolvidas na síntese do lipídio A (NASCIMENTO *et al.*, 2004; QUE-GEWIRTH *et al.*, 2004). Entretanto, o LPS de *Leptospira* difere do LPS típico de bactérias Gram-negativas nas atividades biológicas, estas serão explicadas adiante.

Tabela 2.1. Classificação de espécies do gênero *Leptospira*

Espécies	Sorovar	Sorogrupo	
Patogênicas			
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	
	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	
	Lai	Icterohaemorrhagiae	
	Canicola	Canicola	
	Australis	Australis	
	Bratislava	Australis	
	Bataviae	Bataviae	
	Hebdomadis	Hebdomadis	
	Pomona	Pomona	
	Pyrogenes	Pyrogenes	
	Hardjo	Sejroe	
	<i>L. alexanderi</i>	Manhao3	Manhao
	<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge
	<i>L. inadai</i>	Lyme	Lyme
<i>L. kirschneri</i>	Bim	Autumnalis	
	Cynopteri	Cynopteri	
	Grippotyphosa	Grippotyphosa	
	Mozdok	Pomona	
	Panama	Panama	
	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Ballum
	Castellonis	Ballum	
	Javanica	Javanica	
	Sejroe	Sejroe	
	Tarassovi	Tarassovi	
<i>L. weillii</i>	Celledoni	Celledoni	
<i>L. noguchii</i>	Fortbragg	Autumnalis	
<i>L. santarosai</i>	Brasiliensis	Bataviae	
	Georgia	Mini	
<i>L. broomii</i>	Não designado		
Genomoespécies 1	Pingchang	Ranarum	
Não patogênicas			
<i>L. biflexa</i>	Patoc	Semaranga	
<i>L. meyeri</i>	Semaranga	Semaranga	
<i>L. wolbachii</i>	Codice		
Genomoespécies 3	Holland	Holland	
Genomoespécies 4	Hualin	Icterohaemorrhagiae	
Genomoespécies 5	Saopaulo	Semaranga	

Tabela adaptada de Bharti, 2003 e Morey *et al.*, 2006

2.4 – Epidemiologia

Como já mencionado, a leptospirose é considerada a zoonose mais disseminada do mundo (WHO, 2003). O ambiente contaminado é a fonte de infecção indireta para o homem e animais domésticos, pois animais portadores eliminam leptospiras no ambiente pela urina. O clima tropical favorece a manutenção da bactéria no meio ambiente, e também o contato do homem com as fontes de infecção (AVELAR & PEREIRA, 2004).

A veiculação hídrica representa o principal mecanismo de transmissão de leptospiras dos animais infectados para o homem e, freqüentemente está associada aos surtos epidêmicos. Abrasões na pele decorrentes de imersão prolongada em água contaminada podem representar uma porta de entrada para o espiroqueta que apresenta propriedades invasivas peculiares (AVELAR & PEREIRA, 2004). Os roedores são os principais reservatórios nas áreas urbanas, sendo a espécie *Rattus norvegicus* a de maior importância epidemiológica (PEREIRA & ANDRADE, 1988; PEREIRA & ANDRADE 1990; FARIAS *et al.*, 1997).

Nos portadores naturais, a infecção é crônica com colonização da bactéria nos túbulos renais e eliminação intermitente através da urina, sem evidências de alterações patológicas. As interações do espiroqueta com os hospedeiros constituem processos dinâmicos nos quais algumas espécies podem ser suscetíveis a determinados sorovares e refratárias a outros. Há uma relação estreita entre determinados sorovares e algumas espécies de animais que representam os seus portadores naturais. O sorovar Copenhageni, por exemplo, é freqüentemente isolado de ratos, e os sorovares Canicola e Hardjo isolados de cães e bovinos, respectivamente. Baseado nisto, a identificação do sorovar pode indicar a provável fonte de infecção entre os animais. Porém, não há regras absolutas e uma espécie pode ser portadora de sorovares diferentes em áreas geográficas distintas no Brasil (FAINE *et al.*, 1999; PEREIRA, 2005).

No Brasil, todas as regiões apresentam relatos de casos de leptospirose que geralmente se concentram em áreas urbanas. Epidemias ocorrem a cada ano nos períodos de fortes chuvas. As comunidades urbanas carentes (favelas) são as mais afetadas, sendo notificados anualmente mais de 10.000 casos de leptospirose grave, devido à reincidência das chuvas. Os surtos epidêmicos nessas áreas são caracterizados por altas taxas de mortalidade em poucos dias de hospitalização, causando impacto na saúde pública, e contribuindo com uma elevada proporção

para o total de casos notificados e/ou confirmados no país (KO *et al.*, 1999; McBRIDE *et al.*, 2005).

L. interrogans sorovar Copenhageni é o principal agente etiológico nas regiões Sudeste e Nordeste do país. As informações a respeito da etiologia em outras regiões são escassas ou inexistentes. Durante epidemias que ocorreram em diferentes locais e períodos de tempo na região Sudeste do Brasil, cepas clínicas isoladas de seres humanos e de animais apresentaram relação clonal, indicando fontes e reservatórios comuns (PEREIRA *et al.*, 2000).

A leptospirose tem sido uma das primeiras hipóteses diagnósticas na investigação de casos de óbitos causados por febres hemorrágicas na periferia de áreas urbanas ou em áreas rurais. Porém, devido à distância dos laboratórios de referência e dificuldades na investigação epidemiológica, a maioria dos casos suspeitos não é confirmada através de exames laboratoriais específicos (PEREIRA, 2005).

2.5 – Manifestações clínicas

A infecção por espiroquetas do gênero *Leptospira* pode ser assintomática ou produzir uma ampla variedade de sinais e sintomas que se confundem com outras doenças febris. Evidências sorológicas de infecção são encontradas em 15 a 40% dos indivíduos que foram expostos, mas não desenvolveram a doença. Nos casos sintomáticos de leptospirose, as manifestações clínicas variam de leve a moderada ou grave, podendo ser fatais. Mais de 90% dos indivíduos sintomáticos apresentam a forma mais branda e, geralmente anictérica, enquanto a forma grave com icterícia ocorre em 5 a 10% dos pacientes infectados (WHO, 2003).

O período de incubação é de uma a duas semanas, podendo variar de 2 a 30 dias. A doença apresenta um caráter bifásico, mas a distinção entre a primeira e a segunda fase nem sempre é tão evidente. A primeira fase, ou fase de bacteremia, corresponde à disseminação das bactérias no sangue e em outros líquidos corporais, com duração de 4 a 7 dias. A segunda fase, ou fase imune inicia-se com o aparecimento de anticorpos e eliminação das bactérias na urina de forma intermitente, tendo duração de 10 a 30 dias (FAINE *et al.*, 1999).

2.5.1. Forma anictérica

O início da forma anictérica é quase sempre súbito, com febre alta e contínua com calafrios, ocorrendo cefaléia intensa e constante, algumas vezes com fotofobia. É comum o aparecimento de hiperemia conjuntival, além de mialgia que é intensa e generalizada, mais notável nas panturrilhas. Dor abdominal, diarreia, náuseas e vômitos são freqüentes e podem levar à desidratação. O comprometimento pulmonar manifesta-se através de tosse, dor torácica, em alguns casos com hemoptise. Podem ocorrer ocasionalmente linfadenomegalia, faringite, hepatomegalia, esplenomegalia e erupção cutânea, que dura menos de 24 h (FARIAS *et al.*, 1997; FAINE *et al.*, 1999).

A síndrome anictérica dura uma semana geralmente, e a resolução coincide com o aparecimento de anticorpos, caracterizando a segunda fase ou fase imune. Nesta fase, os sintomas são mais variáveis, com duração de poucos dias, mas ocasionalmente podem durar semanas. A febre e as mialgias são mais brandas do que na fase leptospirêmica. Durante a fase imune pode ocorrer o desenvolvimento de meningite asséptica em aproximadamente 15% dos pacientes (LEVETT, 2001).

2.5.2. Forma ictérica

Esta forma também é conhecida como leptospirose ictérica, leptospirose grave, leptospirose ictero-hemorrágica ou síndrome de Weil. A síndrome de Weil é caracterizada por icterícia, insuficiência renal, distúrbios hemorrágicos e alta mortalidade.

A apresentação clínica inicial não difere da forma anictérica. Porém, 10% dos pacientes após 4 a 9 dias de doença desenvolvem icterícia, disfunção renal e vascular, que distingue os casos mais graves e não segue o padrão bifásico que é característico e evidente na forma anictérica. A icterícia pode ser intensa e na maioria das vezes não está associada à necrose hepática grave. Raramente ocorre morte por insuficiência hepática, sendo comum a hepatomegalia, enquanto que a esplenomegalia é observada em 20% dos casos (FARIAS *et al.*, 1997; FAINE *et al.*, 1999).

A insuficiência renal ocorre geralmente durante a segunda semana da doença. A hipovolemia e a diminuição da perfusão sangüínea renal contribuem para o desenvolvimento de necrose tubular aguda com oligúria ou anúria. A diálise é sempre necessária, mas na maioria dos casos a função renal é completamente

recuperada (ESEN *et al.*, 2004). O comprometimento pulmonar é comum, resultando em tosse, dispnéia, dor torácica, hemoptise e até insuficiência respiratória (LEVETT, 2001).

Recentemente, tem sido caracterizada uma nova forma de evolução clínica da leptospirose, a forma pulmonar grave da leptospirose (FPGL). A FPGL representa a manifestação mais severa da doença, com evolução rápida, e taxa de mortalidade em torno de 51%, sendo caracterizada por hemorragia alveolar e insuficiência respiratória aguda (NALLY *et al.*, 2005^c; DURSUN *et al.*, 2007). De acordo com observações de casos bem documentados no Brasil, os pacientes são jovens adultos saudáveis e os casos relatados foram causados pelo sorovar Copenhageni (Da SILVA *et al.*, 2002). Os sintomas clínicos incluem a hemorragia pulmonar intensa e grave, que leva à insuficiência respiratória e à morte por asfixia. A evolução é rápida e o óbito pode acontecer em menos de 72h após o início dos sintomas respiratórios. Muitas vezes o paciente não desenvolve icterícia ou insuficiência renal. A fatalidade é na maioria dos casos inevitável, porém relatos de casos recentes sugerem que o diagnóstico e intervenção precoces podem melhorar o prognóstico da FPGL (Da SILVA *et al.*, 2002).

Contudo, ainda há dúvidas se a apresentação clínica recentemente diagnosticada constitui uma individualidade clínica ou representa apenas uma complicação pulmonar específica que ocorre na evolução da forma icterica ou leptospirose grave. Não são conhecidos os fatores que influenciam a relativa virulência do agente etiológico e o espectro das manifestações clínicas (PEREIRA, 2005).

2.6 - Diagnóstico laboratorial

A confirmação laboratorial de um caso suspeito de leptospirose é baseada na demonstração da presença de leptospiras, fragmentos de DNA ou detecção de anticorpos específicos. Portanto, a coleta de amostras deve ser realizada de acordo com a probabilidade de detecção do agente etiológico através do isolamento ou de reações positivas nos outros testes (WHO, 2003).

O cultivo de leptospiras a partir do sangue ou líquido e a reação em cadeia da polimerase (PCR) são positivos na fase de bacteremia, que equivale à primeira semana da doença. Nesta fase, os testes sorológicos podem ser negativos ou apresentarem títulos baixos. A partir da segunda semana da doença, as leptospiras

e os fragmentos de DNA são encontrados na urina e os testes sorológicos podem ser positivos. No caso de pacientes que evoluem para o óbito, a imunohistoquímica e a PCR são os métodos mais utilizados para confirmação da leptospirose. Porém, apenas os laboratórios de referência ou de pesquisa podem realizar testes com esse nível de complexidade, uma vez que dispõem de reagentes não comercializados como cepas e anti-soros de referência (FUNASA 2002; WHO 2003).

2.6.1 – Isolamento de leptospiras

O isolamento de leptospiras a partir do sangue pode ser feito através do cultivo em meio Ellinghausen (ELLINGHAUSEN, McCULLOUGH, 1965 a; 1965 b; 1967), ou similares. Contudo, as leptospiras crescem lentamente de modo que, os métodos de isolamento são pouco utilizados com propósito de diagnóstico. Porém, somente através deste método há a possibilidade de isolamento da bactéria e tipagem, o que permite obter informações sobre os sorovares circulantes na região, contribuindo para o estudo epidemiológico regional (FARIAS *et al.*, 1997; WHO, 2003).

Para isolamento de leptospiras a partir do sangue, o mesmo deve ser colhido com anticoagulante (heparina), em condições assépticas, antes da administração de antibióticos e nos primeiros 10 dias de doença. Após esse período, as amostras são geralmente negativas. O ideal é que o sangue seja colhido no leito do paciente e em seguida inoculado em meio de cultura. No caso de isolamento de leptospiras a partir da urina, é necessário que a amostra seja inoculada em meio de cultura, até duas horas após a coleta, pois as leptospiras morrem rapidamente na urina, devido ao pH ácido. O mesmo procedimento deve ser realizado para isolamento a partir de líquido (WHO, 2003).

2.6.2 – Reação da polimerase em cadeia - PCR

O diagnóstico molecular da leptospirose baseado em PCR permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA presentes no plasma, soro, urina, líquido ou tecidos obtidos na autópsia. A PCR é uma técnica que apresenta alta sensibilidade e rapidez de execução, além de permitir a detecção de leptospiras no início da infecção (BROWN *et al.*, 1995; WHO, 2003). Os testes baseados em PCR podem fornecer o diagnóstico precoce, o que é importante na conduta terapêutica e

essencial para a rápida identificação de casos, na iminência de epidemias (BROWN *et al.*, 1995; MERIEN *et al.*, 1995).

Para o diagnóstico da leptospirose, têm sido aplicados pares de iniciadores específicos para regiões do gene *flaB* (flagelo) e G1-G2 (16S RNA ribossomal), os quais geram fragmentos com 793pb e 285pb, respectivamente (GRAVEKAMP *et al.*, 1993; KAWABATA *et al.*, 2001). Estudos realizados por Kawabata e colaboradores (2001) demonstraram que ao ser utilizado o par de iniciadores específicos para o gene *flaB*, havia uma reação positiva para todas as espécies patogênicas de *Leptospira* analisadas, mas não para as saprofíticas. Contudo, estudos anteriores realizados por Gravekamp e colaboradores (1993), utilizando o par de iniciadores G1-G2, demonstraram que não havia reação positiva para *L. kirschneri*, a qual representa uma importante espécie patogênica.

2.6.3- Testes sorológicos

Dentre os testes sorológicos, os mais utilizados são os de ELISA-IgM e aglutinação microscópica (MAT, do inglês *microscopic agglutination test*). Os testes de ELISA-IgM são mais simples e estão disponíveis no mercado. Já o MAT baseia-se na estabilidade de antígenos expressos na superfície da bactéria, principalmente o LPS e nas reações antígeno-anticorpo. Este teste é restrito aos laboratórios de referência, pois requer a manutenção de uma bateria de antígenos de referência, que inclui os sorovares recomendados pela OMS (FAINE *et al.*, 1999; WHO 2003).

Devido às características de sensibilidade e especificidade, o MAT é considerado o teste sorológico “padrão-ouro”, recomendado pelos especialistas nas diversas publicações da Organização Mundial de Saúde (OMS). São utilizados painéis contendo diversas cepas de referência, a fim de permitir a detecção de infecções causadas pelos sorovares mais frequentes e por sorovares incomuns ou que não foram descritos na região. A necessidade de microscopia de campo escuro para visualização da aglutinação e a manutenção de uma grande bateria de antígenos vivos em cultura restringem o uso do MAT a laboratórios de referência (WHO, 2003).

A interpretação dos resultados dos testes sorológicos deve ser baseada no exame de amostras pareadas ou seqüenciais, uma vez que é importante detectar a soroconversão (resultado negativo na primeira amostra e reagente na segunda, ou variação de quatro vezes nos títulos entre duas amostras). As amostras devem ser

colhidas com intervalo de 7 a 21 dias e a sorologia negativa na fase inicial não exclui a hipótese diagnóstica (WHO, 2003).

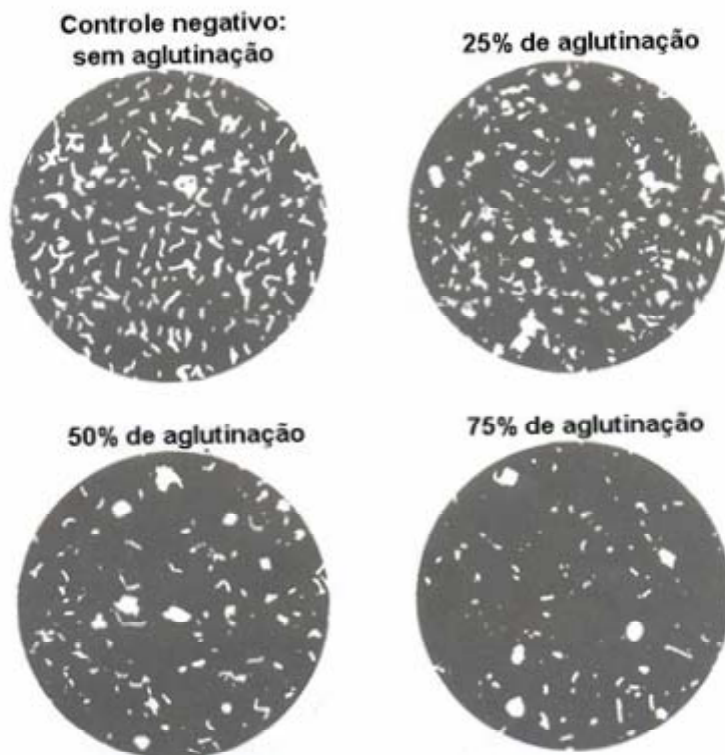


Figura 2.3- Representação esquemática do padrão de aglutinação passível de ser observado em microscópio de campo escuro. Imagem adaptada de Farias *et al.*, 1997.

2.7 – Patogênese

Os mecanismos envolvidos na patogênese da leptospirose podem envolver tanto os efeitos diretos das leptospirosas no hospedeiro, quanto a resposta imune do hospedeiro à infecção. Um mecanismo importante de virulência é a motilidade, que permite a migração das leptospirosas através dos meios viscosos, sendo importante no início da infecção e na disseminação das bactérias do sítio de entrada até sítios alvos dentro do hospedeiro (BHARTI *et al.*, 2003).

As infecções naturais iniciam-se com a entrada das leptospirosas através da pele, provocadas por diversos fatores, dentre eles ferimentos ou abrasões (ou pele

macroscopicamente intacta). Também pode ocorrer penetração através de membranas mucosas intactas, especialmente a conjuntiva, orofaringe e nasofaringe. Ao atingir o sangue, inicia-se uma fase de bacteremia, com rápida disseminação das leptospiras para diversos órgãos e sistemas. Esta fase ocorre entre 4 e 7 dias de doença, onde os espiroquetas podem ser isolados a partir do sangue e do líquido. As alterações patológicas mais proeminentes são observadas no pulmão, fígado e rim, mas podem ser encontradas em outros órgãos. Com a formação de anticorpos, as leptospiras desaparecem do sangue periférico e podem ser isoladas a partir da urina. As disfunções orgânicas e lesões teciduais mais marcantes coincidem com a fase de circulação de anticorpos no soro (FAINE *et al.*, 1999, LEVETT, 2001).

2.8- Resposta imune

O sistema imune compreende dois componentes, a imunidade inata e a adquirida, ambos trabalhando cooperativamente para proteção do hospedeiro contra agentes infecciosos. A imunidade inata precede e fortalece a resposta imune adaptativa. A imunidade adquirida é caracterizada por especificidade e memória, e é exercida por linfócitos T e B. Cada linfócito expressa receptores de superfície com especificidades únicas gerados durante a maturação. A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra o crescimento e dispersão bacteriana na fase inicial da infecção. Os maiores efetores da resposta imune inata são os fagócitos tais como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (ABBAS *et al.*, 2003; SHIZUO & HIROAKI, 2003).

A compreensão da imunidade inata foi acelerada a partir de 1990 com a identificação da proteína *Toll* presente em *Drosophila* e crítica para a defesa contra infecções fúngicas. Esta observação abriu as portas para a descrição de proteínas similares, chamadas receptores tipo *Toll* (TLRs, do inglês *Toll-Like Receptors*) em células de mamíferos (YANG *et al.*, 1998; SHIZUO & HIROAKI, 2003).

A família de TLRs em humanos consiste de 10 receptores que são críticos na resposta imune inata. Estes receptores reconhecem e respondem a um repertório distinto, porém limitado de produtos microbianos conservados nos chamados padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPS, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*). Assim, o sistema imune inato é capaz de discriminar diferentes grupos de patógenos e induzir uma cascata de respostas adaptativas

efetoras (Figura 2.4). Além disso, os TLRs são classificados como membros da superfamília de receptores da interleucina 1 (IL-1R) (SHIZUO; HIROAKI, 2003).

O reconhecimento ou detecção de PAMPs dispara uma complexa cascata de eventos que levam à indução de uma variedade de genes pró-inflamatórios. Em seres humanos, monócitos e macrófagos respondem ao LPS (endotoxina) por indução da expressão de citocinas, proteínas de adesão e enzimas envolvidas na produção de pequenos mediadores inflamatórios (YANG *et al.*, 1998; SHIZUO & HIROAKI, 2003).

O conhecimento da resposta imune à *Leptospira* spp. ou a patogênese da leptospirose permanecem ainda pouco elucidados. A imunidade naturalmente adquirida que protege contra reinfecção por *Leptospira* spp mostrou ser sorovar específica em modelos animais (ADLER & FAINE, 1977). Foi proposto que esta imunidade pode estar ligada aos anticorpos dirigidos contra oligossacarídeos do LPS de leptospiros. Este representa um alvo primário na resposta imune inata devido a sua imunodominância, e ao estimular o sistema imune inato através do receptor TLR2, mecanismo que pode ser importante na leptospirose (WERTS *et al.*, 2001). Além disso, experimentos também demonstraram que LPS de *Leptospira* spp ativa predominantemente TLR2 em células humanas, ao passo que em células de camundongos pode ativar tanto TLR2 quanto TLR4 (NAHORI *et al.*, 2005).

Estudos recentes utilizando modelos animais demonstraram que TLR4 exerce papel crucial na proteção do hospedeiro durante a infecção por leptospiros. Ensaios *in vitro* demonstraram que a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas em resposta a *Leptospira* spp. é dependente de TLR4 e MD-2, este presente na via de sinalização do TLR4, porém independente de CD14 (VIRIYAKOSOL *et al.*, 2006). CD14 é um componente importante na interação do LPS com o receptor TLR4, pois quando o LPS é capturado pela proteína ligadora de LPS (LBP, do inglês *Lipopolysaccharide binding protein*) forma-se o complexo LPB-LPS-CD14, que ativa o receptor TLR4 (SHIZUO & HIRAKI, 2003). Estas observações indicam que uma via da resposta imune inata, dependente de TLR4, contribui como importante componente na proteção contra morte de camundongos com leptospirose severa, e ainda controla a proliferação bacteriana durante infecção crônica subletal (VIRIYAKOSOL *et al.*, 2006).

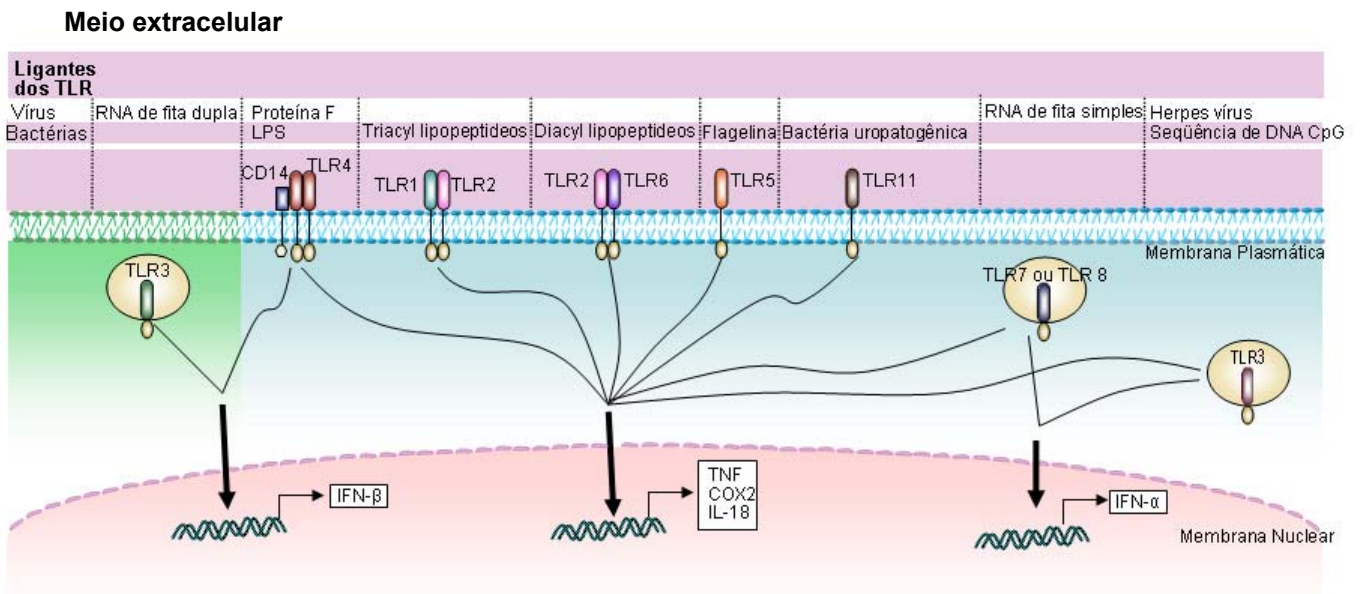


Figura 2.4. Esquema de ativação celular via TLRs por diferentes padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), com produção de mediadores inflamatórios. TLR- receptor tipo *Toll*; IFN- β – interferon –beta; IFN- α – interferon-alfa; TNF- fator de necrose tumoral; COX2- ciclo-oxigenase 2; IL-18- interleucina-18. Imagem adaptada de O’ Neill, 2004.

O ponto principal na resposta imune é a determinação do tipo de resposta adaptativa a ser ativada. Quando um linfócito T auxiliar (Th, do inglês *T helper*) “virgem” é ativado por uma célula apresentadora de antígeno (APC, do inglês *Antigen Presenting Cell*), ela pode se diferenciar em tipos de células efetoras, chamadas Th1 e Th2. A natureza do patógeno invasor e o tipo de resposta imune inata determinam qual tipo de Linfócito T auxiliar vai se diferenciar (ABBAS *et al.*, 2003).

A resposta tipo Th1 é um componente da imunidade mediada por células que geralmente é considerada necessária para resistência aos patógenos intracelulares. É caracterizada por produção de interferon-gama (IFN- γ) e IgG2, além de ativação de macrófagos e linfócitos T citotóxicos (NAIMAN *et al.*, 2001; ABBAS *et al.*, 2003).

A resposta tipo Th2 promove uma boa resposta de anticorpos, sendo importante para resistência aos patógenos extracelulares. É caracterizada pela

produção de IL-4 pelos linfócitos T e produção de anticorpos dos isotipos IgE, IgG1 e IgA pelos linfócitos B (NAIMAN *et al.*, 2001; ABBAS *et al.*, 2003).

O papel da imunidade mediada por células na defesa do hospedeiro à infecção por *Leptospira* spp. tem sido estudado porém com pouco conhecimento em modelos animais e em seres humanos. Um estudo recente mostrou que bovinos imunizados com vacina constituída de leptospiros mortas possuem Linfócitos T CD4+ e Linfócitos T gama-delta ($\gamma\delta$) que respondem com proliferação *in vitro*, produzindo IFN- γ após estimulação com preparação antigênica de *Leptospira* (NAIMAN *et al.*, 2001).

Estudos realizados em modelos animais e em seres humanos levaram às evidências indiretas de que Linfócitos T $\gamma\delta$ + podem exercer um papel importante na defesa contra infecções por bactérias (BOOM,1999). Os linfócitos T $\gamma\delta$ mostraram reconhecer fosfoantígenos não peptídicos, independente do processamento ou de APC e são capazes de produzir citocinas de ambas as respostas Th1 e Th2 (KLIMPEL *et al.*, 2003).

Outros estudos ainda demonstraram que pacientes com leptospirose aguda apresentaram um significante aumento do número de Linfócitos T $\gamma\delta$ no sangue periférico, indicando que *Leptospira* spp. pode ativar células T $\gamma\delta$ e células T $\alpha\beta$ (KLIMPEL *et al.*, 2003).

2.9 – Fatores de virulência

Os fatores de virulência de leptospira são expressos por cepas patogênicas apenas em hospedeiros suscetíveis (PEREIRA, 2005). Devido à habilidade de invadir os tecidos do hospedeiro, *Leptospira* spp. possui uma variedade de potenciais fatores de virulência que podem facilitar a colonização, adesão e invasão (BHARTI *et al.*, 2003).

2.9.1 – Lipopolissacarídeo

O LPS representa o componente mais abundante na composição da membrana externa de *Leptospira* no cultivo *in vitro*. Numerosos estudos mostraram que o LPS de leptospiros possui atividade endotóxica consideravelmente menor que o LPS típico das bactérias Gram-negativas, com diferentes propriedades bioquímicas, físicas e biológicas, provavelmente devido a diferenças na estrutura do

lipídio A, o qual representa a porção biologicamente ativa do LPS (QUE – GEWIRTH *et al.*, 2004). Entre as propriedades do LPS de *L. interrogans*, encontra-se a capacidade de ativação de macrófagos via TLR2, ao invés do TLR4, que é o receptor ativado pelo LPS típico das bactérias Gram-negativas (WERTS *et al.*, 2001; QUE – GEWIRTH *et al.*, 2004).

Devido à imunodominância do LPS, durante muitos anos os estudos realizados para determinação de potenciais imunógenos para vacinas foram focalizados nesta estrutura (GUERREIRO *et al.*, 2001). Preparações de LPS podem conferir imunidade protetora, mas geralmente é sorovar específica. Porém, utilizando um pequeno número de diferentes sorovares, preparações com proteínas da membrana externa mostraram conferir proteção heteróloga. Diante das dificuldades de preparação de vacinas de LPS multivalentes, a identificação de antígenos protéicos conservados para o uso em vacinas e diagnóstico de leptospirose é de crítica importância (AMUTHA *et al.*, 2006). O seqüenciamento do DNA genômico de *Leptospira interrogans* sorovar Lai cepa Lai (ZHANG, 2005) e sorovar Copenhageni (GAMBERINI, 2005) representa um novo campo para o desenho de novas vacinas e sorodiagnósticos.

2.9.2 – Proteínas de Membrana Externa

O estudo de proteínas de membrana externa (OMPs, do inglês *outer membrane proteins*) é de grande interesse. Estas proteínas estão localizadas na superfície celular, possibilitando a interação dos patógenos bacterianos com o hospedeiro (HAAKE, 2000).

Diferente das bactérias Gram-negativas, a membrana externa dos espiroquetas patogênicos apresenta baixa densidade de OMPs (SHANG *et al.*, 1995). Com base nesta hipótese, há uma correlação entre diminuição dos níveis de OMPs transmembrana e patogenicidade em *L. kirschneri* e *Borrelia burgdorferi* (HAAKE *et al.*, 1998). As OMPs podem participar na patogênese bacteriana atuando como adesinas, alvo de anticorpos, porinas e receptores para moléculas solúveis (HAAKE *et al.*, 1993). Além disso, todos os espiroquetas patogênicos compartilham a propriedade de serem capazes de causar infecção persistente em hospedeiros mamíferos. (HAAKE, 2000).

Pelo menos três classes de OMPs de leptospira já foram identificadas: lipoproteínas (LipL32, LipL36, LipL41, LipL48, LipL21 e Q1p42), a proteína

transmembrana designada OmpL1, proteínas periféricas como a LipL45 e proteínas com domínios semelhantes às imunoglobulinas (MATSUNAGA *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2005).

Como em outros espiroquetas, muitas das proteínas mais abundantes de *Leptospira* parecem ser lipoproteínas, as quais estão ancoradas à membrana não por domínios transmembrana, mas por ácidos graxos modificados no resíduo de cisteína amino-terminal (HAAKE *et al.*, 1998). A caracterização de lipoproteínas deve incluir a determinação se esta proteína é exportada para a membrana externa e/ou exposta na superfície, pois lipoproteínas de superfície podem estar envolvidas na interação dos espiroquetas com o ambiente, e na interação com o hospedeiro mamífero (Figura 2.2) (HAAKE, 2000).

OmpL1 foi a primeira OMP a ser descrita em *Leptospira*, sendo originalmente identificada por imunoprecipitação de superfície, comparando-se culturas de *L. kirschneri* virulentas e atenuadas (HAAKE *et al.*, 1991). Neste estudo, foi observado que OmpL1 está presente em quantidades extremamente pequenas, o que foi correlacionado com a baixa densidade de partículas da membrana externa observada por microscopia eletrônica (HAAKE *et al.*, 1991). Com a realização da clonagem e do seqüenciamento do gene *ompL1*, foi demonstrado que este gene está presente em todas as espécies patogênicas de *Leptospira* que foram estudadas e está ausente nas não patogênicas. Sua massa molecular foi estimada em 31kDa (HAAKE *et al.*, 1993).

Em estudos realizados por Shang *et al* (1996), foram descritas oito lipoproteínas em *L. kirschneri*, além da clonagem e seqüenciamento de uma dessas proteínas, a LipL41. Após clivagem do peptídeo sinal pela peptidase, a massa molecular estimada é de 36,8kDa (SHANG *et al.*, 1996). Ensaio de imunoprecipitação de superfície indicaram que LipL41 é exposta na superfície (HAAKE *et al.*, 1998). Outros estudos demonstraram que OmpL1 e LipL41 são antigenicamente conservados entre espécies patogênicas de *Leptospira*. Foi demonstrado que quando expressas como proteínas de membrana, OmpL1 e LipL41 juntas promovem significativo nível de proteção em *hamster* (HAAKE *et al.*, 1999).

Outra lipoproteína presente na membrana externa já identificada foi a LipL36, a qual difere da LipL41 na sua expressão e localização. Há evidências de que LipL41 é exportada para região externa da membrana externa, enquanto a LipL36 é restrita à região periplasmática. Após clivagem do peptídeo sinal, a massa molecular

estimada é de 35,3kDa (HAAKE *et al.*, 1998). Ensaio de imunoprecipitação de superfície mostraram que LipL36 não está exposta na membrana (SHANG *et al.*, 1996).

Estudos demonstraram que LipL36 é expressa de formas diferentes durante crescimento em cultura, enquanto que LipL41 permanece constante. LipL36 está presente em grandes quantidades em *L. kirschneri* durante o início da fase de crescimento, porém começa a diminuir na metade da fase Log (HAAKE *et al.*, 1998). Além disso, ensaios de imunohistoquímica demonstraram a presença de OmpL1 e LipL41 no tecido renal de *hamster* infectado, porém LipL36 não foi detectada, indicando que há diminuição da expressão desta proteína *in vivo* (BARNETT *et al.*, 1999).

Dentre as lipoproteínas, a LipL32 é a proteína mais abundante dentro do perfil de proteínas de *Leptospira* spp. A seqüência do gene *lipL32* é altamente conservada entre espécies patogênicas de *Leptospira*. Após clivagem do peptídeo sinal, a massa molecular foi estimada em 27,6kDa (HAAKE & MATSUNAGA, 2002). Assim como OmpL1 e LipL41, LipL32 é expressa por *L. kirschneri* dentro dos túbulos renais (HAAKE *et al.*, 2000).

Estudos com OMPs de *L. kirschneri* demonstraram que LipL32 pode estar envolvida na patogênese da leptospirose levando à nefrite túbulo-intersticial, pela indução de resposta inflamatória através da ativação do fator de transcrição nuclear NF-κB (YANG *et al.*, 2002). Também foi demonstrada reação forte de LipL32 com soros humanos positivos para leptospirose, o que sugere que esta proteína pode ser uma forte candidata ao desenvolvimento de novas técnicas de sorodiagnóstico (HAAKE *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2005).

A LipL21 é a segunda proteína mais abundante no perfil de proteínas da membrana externa em *L. interrogans* sorovar Lai. Ensaio de hibridização de DNA revelaram a presença do gene *lipL21* em todas as espécies patogênicas analisadas, mas não foi detectado nas espécies saprófitas. Além disso, a expressão de LipL21 parece não variar entre cepas patogênicas virulentas e atenuadas. Sua massa molecular foi estimada em 19,8kDa (CULLEN *et al.*, 2003).

O reconhecimento de LipL21 recombinante por soros de pacientes com leptospirose sugere que LipL21 é expressa durante infecção em seres humanos (CULLEN *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2005). Também foi observado reconhecimento de LipL21 recombinante por soro de *hamster* infectado com cepa isolada do

hospedeiro, confirmando a hipótese de que esta proteína é expressa durante a infecção (CULLEN *et al.*, 2003).

A transmissão de leptospiros requer que a bactéria se adapte e sobreviva em diferentes condições do ambiente, tais como as encontradas no ecossistema ou nos tecidos e órgãos do hospedeiro infectado. Estudos recentes mostraram que a mudança de temperatura de cultivo de 30°C para 37°C, semelhante ao que ocorre durante a infecção de um hospedeiro no ambiente, está associada com a síntese diferencial de várias proteínas de membrana externa, periplasmáticas e citoplasmáticas. Foram descritas duas proteínas, a Q1p42 e a Hsp15, cuja expressão é aumentada com a elevação da temperatura (NALLY *et al.*, 2001).

A LipL45 ou P31_{LipL45} foi a primeira proteína periférica de membrana identificada. O gene *lipL45* foi o primeiro gene de leptospira que expressou uma proteína associada à virulência (MATSUNAGA *et al.*, 2002). Sua massa molecular foi estimada em 39,8kDa após clivagem do peptídeo sinal, porém a proteína é convertida em antígeno de 31kDa (P31), sendo a P31 produto do processamento de LipL45, derivado da porção carboxi-terminal. P31_{LipL45} apresenta níveis alterados com a fase de crescimento do microrganismo. Os níveis de P31_{LipL45} aumentam conforme a cultura de *Leptospira* entra na fase estacionária (MATSUNAGA *et al.*, 2002).

Durante infecção no hospedeiro, as leptospiros multiplicam-se rapidamente no sangue, mas são eliminadas pelos fagócitos. As leptospiros que conseguem escapar da fagocitose migram para o túbulo proximal do rim, onde se multiplicam. O microambiente dos túbulos renais pode simular a fase estacionária de cultivo, o que leva ao aumento da expressão de proteínas. Uma destas proteínas é a P31_{LipL45}, uma vez que LipL45 foi detectada em rim de *hamster* infectado (MATSUNAGA *et al.*, 2002).

Recentemente foi identificada uma nova família de proteínas de superfície de leptospira denominada Lig (do inglês *leptospiral immunoglobulin-like*), presente em espécies patogênicas de *Leptospira* (MATSUNAGA *et al.*, 2003). Proteínas bacterianas com domínios semelhantes às imunoglobulinas (Big, do inglês *bacterial immunoglobulin-like*), tais como invasina de *Yersinia pseudotuberculosis* e intimina de *Escherichia coli*, são proteínas expressas na superfície que agem como adesinas, envolvidas na adesão e invasão de células dos hospedeiros mamíferos.

A organização estrutural e a localização de proteínas Lig compartilham regiões comuns àquelas encontradas em intimina e invasina. As Ligs parecem estar ancoradas à membrana com a mesma orientação amino-terminal, observada em intimina e invasina. No entanto, as Ligs foram classificadas como lipoproteínas, sendo ancoradas à membrana externa por ácidos graxos (MATSUNAGA *et al.*, 2003).

2.9.3- Outros fatores de virulência

Diversas proteínas de *Leptospira* spp com atividade hemolítica, esfingomielinase e fosfolipase foram descritas *in vitro* e os respectivos genes específicos foram caracterizados incluindo hemolisinas, esfingomielinase C, esfingomielinase H e proteína 1 associada à hemólise (Hap 1, também conhecida por LipL32) (BHARTI *et al.*, 2003). Ao contrário da esfingomielinase C, a esfingomielinase H não apresenta atividade de esfingomielinase, porém mostrou ser uma proteína citotóxica formadora de poros em diversas células de mamíferos (LEE *et al.*, 2002).

Um componente de natureza glicolipoproteica (GLP) resultante da lise celular de *Leptospira* pode estar associado à toxicidade de leptospirosas. Foi demonstrada a presença de GLP nos sítios de alteração do tecido renal de *hamsters* infectados com sorovar Canicola (PEREIRA *et al.*, 1997). Estudos mais recentes demonstraram que GLP de *L. interrogans* inibe a bomba de sódio e potássio de forma dose-dependente e em células do túbulo renal de coelhos ativa monócitos do sangue periférico (DIAMENT *et al.*, 2002).

2.10- Modelos experimentais

Os modelos experimentais mais utilizados para o estudo da patogênese da leptospirose são cobaias e *hamsters* recém-desmamados, os quais são susceptíveis à infecção. No entanto, a alta susceptibilidade desses modelos a cepas de *Leptospira* spp altamente virulentas gera dificuldade nas análises (HAAKE *et al.*, 1999; KOIZUMI & WATANABE 2003).

Foram desenvolvidos alguns estudos com modelos animais utilizando cepas clínicas altamente virulentas, isoladas do sangue de pacientes que desenvolveram hemorragia pulmonar grave e fatal. Nesses estudos, as cepas causaram infecção grave semelhante aos casos humanos em cobaios e primatas não-humanos da espécie *Callithrix jacchus* (NALLY *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2005). Com exceção de *hamsters* e cobaios, roedores em geral representam os principais reservatórios de leptospiros na natureza. Tais animais podem ser refratários ou desenvolver um estado de portador renal sem evidências de alterações patológicas semelhantes as que ocorrem no homem (FAINE *et al.*, 1999).

Os camundongos da linhagem C3H/HeJ apresentam uma mutação *missense* na porção citoplasmática do receptor TLR-4, que resulta na substituição de prolina por histidina. Devido a esta mutação, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas são hiporresponsivas ao LPS típico das bactérias gram-negativas (SHIZUO & HIROAKI, 2003).

Os camundongos dessa linhagem são susceptíveis à infecção letal por *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae, apresentando lesões pulmonares e renais, com quadros hemorrágicos semelhantes aos casos humanos, conforme previamente demonstrado por Pereira e colaboradores (1998) e, mais recentemente, confirmado por Viriyakosol e colaboradores (2006). Estudos recentes também demonstraram que camundongos C3H/HeJ são susceptíveis à infecção letal por *L. interrogans* sorovar Copenhageni, porém não foi observado desenvolvimento do quadro hemorrágico (NALLY *et al.*, 2005^b).

JUSTIFICATIVA DO PROJETO

Diversos grupos de pesquisa têm se dedicado ao desenvolvimento de vacinas para prevenção da leptospirose humana e animal. Uma das maiores limitações consiste no estabelecimento de modelos experimentais animais, para os testes com potenciais imunógenos e avaliações de potência ou eficácia das vacinas.

Os animais de laboratório mais utilizados são *hamsters* e cobaios, que são suscetíveis à infecção letal. Os modelos murinos, em geral, representam os principais reservatórios na natureza, podendo ser refratários à infecção ou desenvolver um estado de portador renal sem evidências de alterações patológicas semelhantes as que ocorrem no homem, ou em animais domésticos.

Estudos prévios demonstraram que a linhagem de camundongos C3H/HeJ - entre várias outras linhagens refratárias - é suscetível à infecção letal com leptospirose e pode ser utilizada nos estudos ligados ao desenvolvimento de vacinas. Mas, até o momento, os mesmos ainda não foram utilizados com esse fim e há poucas informações a respeito da resposta imune protetora decorrente da infecção por leptospirose.

A utilização desse modelo para entendimento da patogênese da leptospirose e a identificação de possíveis estruturas de natureza protéica, reconhecidas por este hospedeiro durante o quadro infeccioso, pode contribuir para os estudos relacionados ao desenvolvimento de vacinas, o que justifica os principais objetivos deste trabalho.

3- OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar alguns aspectos da patogênese da leptospirose por meio de infecção experimental de camundongos C3H/HeJ .

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demonstrar a susceptibilidade de camundongos C3H/HeJ a uma cepa isolada de paciente com forma pulmonar grave de leptospirose;
- Detectar a presença de anticorpos aglutinantes nos soros dos animais infectados através do teste de MAT;
- Avaliar a resposta de anticorpos dirigidos ao LPS e a proteínas da membrana externa de *Leptospira* (OMPs) pela técnica do *Western blotting*;
- Utilização da PCR para detecção de leptospiros em tecidos com base na amplificação de um gene que codifica proteínas do flagelo de *Leptospira* (flaB).

4- METODOLOGIA

4.1. Identificação da cepa

Neste estudo foi utilizada uma cepa oriunda da Coleção de Culturas do Laboratório de Referência Nacional para Leptospirose. A amostra foi isolada de um paciente com forma grave de leptospirose e evolução para óbito. A cultura de número 25179 foi identificada utilizando-se um painel de soros imunes de referência produzidos em coelho e um painel de anticorpos monoclonais, ambos fornecidos pelo Instituto de Medicina Tropical, Amsterdam, Holanda (TERPSTRA *et al.*, 1985; WHO, 2003).

Para a identificação do sorogrupo foi realizado o teste de aglutinação microscópica (MAT) utilizando-se 18 soros imunes de referência (Tabela 4.1) de acordo com procedimentos previamente descritos (FAINE, 1982; WHO, 2003). Com base nos resultados obtidos, a cultura foi posteriormente testada por MAT com um painel de anticorpos monoclonais, que permite a diferenciação dos sorovares pertencentes ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* (tabela 4.2).

Para o ensaio do MAT, duas etapas foram seguidas: a de triagem e a de titulação. Na etapa de triagem, a cepa a ser identificada foi submetida ao teste de aglutinação frente aos 18 soros imunes em uma única diluição. O teste foi realizado em microplaca de 96 orifícios (Nunc) e a cada orifício foram adicionados 50 μ L da cultura diluída (seguindo o tubo 0,5 da escala de McFarland) a ser testada, a 50 μ L de cada soro de referência diluído a 1:50. Após 2h de incubação à temperatura ambiente, foi realizada a leitura em microscópio de campo escuro (Leitz Wetzlar SM-lux) com objetiva de 10X, para observação da aglutinação. Foram selecionados para titulação os soros que apresentaram percentual de aglutinação maior que 50% com a cepa a ser identificada.

Já para a etapa de titulação, os soros foram diluídos serialmente de 1:100 a 1:102.400. As reações foram realizadas em microplaca de 96 orifícios (Nunc), com uma diluição inicial do soro de 1:50 e volume final de 50 μ L. Em seguida, foram adicionados 50 μ L da cepa teste diluída (seguindo o tubo 0,5 da escala de McFarland) a cada orifício, de modo que a primeira diluição do soro passou a ser 1:100. Após 2h de incubação à temperatura ambiente, a leitura em microscópio de

campo escuro (Leitz Wetzlar SM-lux) com objetiva de 10X foi realizada. O título de cada soro corresponde à recíproca da diluição onde se observa 50% de aglutinação.

Os títulos obtidos foram comparados com os títulos dos soros imunes em relação aos sorovares homólogos. Em seguida a cultura foi submetida a testes de MAT com os anticorpos F70-C14-7, que identifica o sorovar Icterohaemorrhagiae, F70-C24-15, que identifica o sorovar Copenhageni e F89-C12-4 que reage com todos os sorovares do sorogrupo Icterohaemorrhagiae, exceto com o próprio sorovar Icterohaemorrhagiae. O anticorpo F89-C12-4 foi incluído nos testes por revelar reações com qualquer sorovar do sorogrupo Icterohaemorrhagiae e eventualmente indicar a necessidade de testes complementares como um novo painel de anticorpos monoclonais, eletroforese de campo pulsado (PFGE) e etc.

Os anticorpos monoclonais liofilizados foram suspensos em PBS (pH 7,6) conforme orientação do fornecedor (Instituto de Medicina Tropical, Amsterdam, Holanda) e submetidos a diluições seriadas, em microplaca, com diluição inicial de 1:10, e volume final de 50 μ L. Foram adicionados 50 μ L da cepa teste a cada orifício de modo que a primeira diluição passou a ser 1:20, utilizando-se a faixa de diluições de 1:20 a 1:20.480. Após 2h de incubação à temperatura ambiente, foi realizada a leitura em microscópio de campo escuro (Leitz Wetzlar SM-lux), com objetiva de 10 X. O título foi obtido pela diluição máxima dos anticorpos monoclonais, que produziram mais de 50% de aglutinação das leptospiros ao exame em microscópio de campo escuro (TERPSTRA *et al.*, 1985).

Tabela 4.1 – Relação de soros imunes de referência produzidos em coelhos utilizados no teste de MAT para identificação do sorogrupo da cepa 25179.

Designação	Sorogrupo	Sorovar
1	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
2	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
3	Canicola	Canicola
4	Grippotyphosa	Grippotyphosa
5	Pomona	Pomona
6	Australis	Australis
7	Bataviae	Bataviae
8	Celledoni	Celledoni
9	Cynopteri	Cynopteri
10	Djasiman	Djasiman
11	Hebdomadis	Hebdomadis
12	Javanica	Javanica
13	Panama	Panamá
14	Pyrogenes	Pyrogenes
15	Sejroe	Hardjo
16	Sejroe	Saxkoebing
17	Shermani	Shermani
18	Tarassovi	Tarassovi

Tabela 4.2 - Painel de anticorpos monoclonais utilizados para identificar o sorovar da cepa 25179.

Sorovares ^a	Anticorpos monoclonais ^b		
	F 70-C14	F 70-C24	F 89-C12
	Título	Título	Título
1- Icterohaemorrhagiae	40960	160	-
2- Copenhageni	80	40960	5120
3- Mankarso	160	160	20480
4- Birkini	-	-	20480
5- Bogvere	-	-	1280
6- Dakota	-	-	1280
7- Gem	-	-	320
8- Lai	-	-	40960
9- Mwogolo	-	-	5120
10- Naam	-	-	10240
11- Ndahambukuje	-	-	1280
12- Ndambari	-	-	1280
13- Smithi	-	-	40960
14- Tonkini	-	-	40960
15- Zimbabwe	-	-	5120

a- Sorovares do sorogrupo Icterohaemorrhagiae; b- Títulos dos anticorpos monoclonais com as cepas de referência do sorogrupo Icterohaemorrhagiae; - : negativo.

4.2 – Infecção experimental

4.2.1- Testes de virulência

Para os ensaios e manutenção das propriedades de virulência da cepa 25179 foram utilizados *Hamsters* (*Mesocricetus auratus*). Os animais foram mantidos em condições ambientais adequadas (temperatura ambiente de aproximadamente 25°C, umidade de 65% e iluminação adequada), sendo alimentados com ração própria fornecida pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL), e tendo disponibilidade de água à vontade. O manejo e a observação de sinais clínicos foram realizados diariamente de acordo com as normas de Biossegurança para manipulação de animais experimentais.

Foram utilizados animais recém-desmamados, com 4 a 6 semanas de idade, fornecidos pelo CECAL, os quais foram inoculados por via intra-peritoneal com 0,1 mL do cultivo da cepa 25179, contendo aproximadamente $5,4 \times 10^5$ leptospiras (WHO, 2003). Para os testes foram utilizados 12 animais, sendo 8 infectados e 4 não infectados (inoculados apenas com meio de cultura). Alguns dos animais infectados foram destinados ao reisolamento da bactéria a partir dos órgãos (rim e fígado).

4.2.1.1- Cultivo da bactéria e preparação do inóculo

A preparação do inóculo foi realizada segundo descrito por Faine, 1982. A cepa foi cultivada em meio EMJH líquido e utilizada com 7 a 8 dias de incubação em temperatura de 28°C a 30°C. Os cultivos foram examinados ao microscópio de campo escuro (Leitz Wetzlar SM-lux) com objetiva de 25X para avaliação de aspectos gerais como ausência de contaminação por outras bactérias e movimentos característicos do espiroqueta, que comprovam a identidade do gênero e viabilidade do cultivo. As leptospiras foram contadas em câmara de Petroff Hausser. A cultura foi diluída na proporção de 1:10 e inativada com formol a 1% em PBS pH 7,6 da seguinte forma: 100 µL da cultura + 890 µL de PBS + 10 µL de formol (PA). Após 10 min, tempo para inativação das leptospiras, foram adicionados aproximadamente 15 µL da preparação na câmara para contagem. Para a obtenção do número de leptospiras/mL, foi aplicado o seguinte cálculo, conforme instruções do fabricante da câmara: **n° de células X diluição X 50000 = n° de células/mL**

A quantidade de aproximadamente 10^5 leptospiras foi ajustada para estar contida em um volume de 0,1 mL para o inóculo.

4.2.1.2- Recuperação de leptospiras a partir de tecidos infectados

Os animais que apresentaram sinais como apatia, prostração, adinamia, anorexia e desidratação, foram submetidos à eutanásia utilizando câmara de CO₂ (1 min de exposição ao gás e 1 min sem gás). Foram retirados sangue, rim e fígado para recuperação de leptospiras através do cultivo *in vitro*.

Alguns pedaços do rim e do fígado foram retirados e macerados com o auxílio de uma seringa estéril, sem agulha, pressionando-se o êmbolo e colocando o tecido macerado em um tubo contendo 5 mL de PBS (pH 7,6) estéril. O conteúdo foi submetido à agitação (agitador LAB-LINE- 3508) orbital contínua (50 rpm; 2h), para decantação do macerado de órgãos. Ao término deste período, 0,5 mL do sobrenadante de cada órgão foi transferido separadamente para um tubo contendo 4,5 mL de PBS (pH 7,6) estéril, e a partir deste tubo foram feitas diluições seriadas de 1:10, 1:100 e 1:1000. Quinhentos microlitros de cada diluição foram inoculados em tubos contendo 5 mL de meio de EMJH semi-sólido. Os tubos foram mantidos a 28-30°C e examinados semanalmente, até um período de 2 meses. Estes procedimentos basearam-se no Manual da OMS e em publicação recente com adaptações às condições do laboratório (WHO, 2003; NALLY *et al*, 2005^a).

4.2.2- Infecção experimental com camundongos C3H/HeJ

Foram utilizados 27 camundongos C3H/HeJ do sexo masculino, com 4 e 5 semanas de idade, fornecidos pelo CECAL/FIOCRUZ. Os animais foram mantidos em condições semelhantes àsquelas descritas no item 4.2.1.2. As culturas reisoladas dos *hamsters* foram utilizadas nos camundongos com no máximo 5 passagens *in vitro*. Foram preparados inóculos de 0,1 mL contendo aproximadamente 10^5 a 10^6 leptospiras em cultura.

Um total de 19 camundongos foram inoculados em três experimentos subseqüentes com a cepa 25179. Para o controle negativo oito foram inoculados com 0,1 mL de meio de cultivo e mantidos sob as mesmas condições daqueles inoculados com a cepa 25179.

4.3 – Resposta de anticorpos nos camundongos infectados

O sangue dos animais foi retirado por punção cardíaca no momento da eutanásia. O soro foi separado para a realização do MAT com a cepa infectante e *Western blotting* utilizando extrato de LPS e um extrato enriquecido em proteínas de membrana externa (OMPs).

4.3.1- Sorologia por MAT

A sorologia por MAT foi realizada segundo descrito por Faine (1982) e WHO (2003). Os soros dos camundongos foram submetidos a diluições seriadas de 1:100 a 1:102.400, em microplaca de 96 orifícios, com diluição inicial de 1:50 e volume final de 50 μ L. Em seguida, foram adicionados 50 μ L da cepa 25179, cultivada em meio líquido, diluída segundo o tubo 0,5 da escala de McFarland. Após 2h de incubação à temperatura ambiente, foi realizada a leitura em microscópio de campo escuro, para observação de aglutinação. O título foi determinado pela recíproca da diluição do soro onde foi observado no mínimo 50% de aglutinação (ver figura 2.3).

4.3.2- *Western blotting* utilizando extrato de LPS e extrato enriquecido em proteínas de membrana externa (OMPs)

Vinte soros humanos positivos no teste de MAT, oriundos da soroteca do LRNL, foram selecionados para obter um controle positivo que permitisse avaliar os parâmetros da reação como: perfil de proteínas e LPS presentes nos extratos, concentração mínima de antígenos, condições da corrida eletroforética e da transferência (*Western blotting*). Foram escolhidos soros de pacientes em fase aguda e convalescente com títulos que variaram de 1:800 a 1:25.600 para o sorovar Copenhageni. Os soros que apresentaram reações mais intensas com os extratos de LPS e OMPs foram selecionados como padrões positivos.

4.3.2.1- Extração de LPS e de proteínas de membrana externa (OMPs)

A cepa 25179 foi cultivada em frascos contendo 300 mL de meio EMJH líquido, em temperatura de 28 - 30°C por 10 a 14 dias, para obtenção de massa bacteriana suficiente para a extração de antígenos. A cepa foi utilizada apenas até a 5^a passagem *in vitro*.

A extração de LPS foi realizada segundo Hitchcock & Brown (1983), com algumas modificações. Cinquenta mililitros do cultivo foram centrifugados a 15.000 xg, por 20 min (rotação e tempo modificados para o gênero *Leptospira*). Os sedimentos obtidos foram suspensos em 1250 µL de tampão de lise (2% de SDS, 4% de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol e 100 mM de Tris-HCl pH 6,8) e mantidos a 100°C por 10 min. Após resfriamento à temperatura ambiente, foram acrescentados 250 µL de proteinase K (2,5 mg/mL) e incubado a 60°C por 2h. O extrato foi dividido em alíquotas e mantido a -20°C até o momento do uso.

A extração de OMPs foi realizada segundo Yang e colaboradores (2002) e Cullen e colaboradores (2003), com algumas modificações. Duzentos e cinquenta mililitros do cultivo da cepa 25179 foram centrifugados a 15.000 xg, por 20 min. O sedimento obtido foi lavado 2x em PBS (pH 7,6) contendo MgCl₂ 5 mM. Em seguida, as células foram suspensas em 5 mL de tampão de lise (1% de Triton X-114, 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris pH 8 e 1 mM de EDTA). A mistura foi agitada em vortex por 2 min e mantida a 4°C por 40 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 17.000 xg por 10 min e ao sobrenadante foram adicionados 200 µL de CaCl₂ 1M. Para separação das fases, o sobrenadante foi mantido a 37°C por 10 min e em seguida, centrifugado a 2000 xg por 10 min. A fase de separação foi feita acrescentando-se 500 µL de acetona PA.

Os extratos de proteínas foram quantificados pelo método de Bradford (Kit Quick Start; Bio-Rad), seguindo as instruções do fabricante e guardados a -20°C até o momento do uso. Alíquotas de 1 mL dos extratos de OMPs a 125 µg/mL foram liofilizadas e o sedimento foi suspenso em 200 µL de PBS (pH 7,6) antes da corrida no gel.

4.3.2.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida -SDS- PAGE e *Western blotting*

A técnica de SDS-PAGE foi realizada segundo Laemmli (1970). Amostras dos extratos de LPS e de OMPs foram solubilizadas em tampão de amostra contendo 62 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 10% de glicerol, 5% de 2-mercaptoetanol e 2% de Dodecil sulfato de sódio (SDS), na proporção de 20 µL de amostra contendo 2,5 µg de proteínas (extrato de OMPs) para 5 µL de tampão de amostra. Para o SDS-PAGE do LPS foram utilizados géis 12,5 % e 12% para extrato enriquecido em OMPs. Os géis foram submetidos à eletroforese (100 volts; 20 mA) em tampão de corrida (25 mM de Tris, 192 mM de Glicina e 0,1% de SDS, pH 8,3). Como controle da corrida, foi utilizado um padrão de peso molecular de proteínas (PROMEGA – V8491) na faixa de 10 kDa até 225 kDa.

Para visualização das bandas nos géis, a impregnação pelo método da prata foi utilizado (Kit SILVER STAIN; BIO-RAD), seguindo as instruções do fabricante.

As reações de *Western blotting* foram realizadas com base em descrições prévias (Pereira *et al.*, 1997, Guerreiro *et al.*, 2001 e Nally *et al.*, 2005^a). Após o SDS-PAGE, as bandas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Millipore) utilizando tampão Tris-Glicina (24,7 mM de Tris, 192 mM de Glicina com 20% de metanol). Realizou-se a transferência *overnight* (30 volts; 40 mA). Após transferência, as membranas foram bloqueadas *overnight* em tampão Tris Buffered Saline -Tween pH 7,4 -TBS-T (Tris 50 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 a 0,05%) e 5% de “Skim-Milk”. No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS-T por 30 min, trocando a solução a cada 10 min.

As membranas foram incubadas individualmente por 1h, à temperatura ambiente, com os anticorpos primários (soros humanos ou de camundongos) na diluição 1:100 em tampão de bloqueio (5% de Skim milk). Depois de sucessivas lavagens com TBS-T, foram incubadas por 1h com anticorpos secundários (anti-IgG humano ou anti-IgG de camundongo) conjugados à peroxidase (Sigma Immuno Chemicals), na diluição 1:2000 .

Para revelação, as membranas foram mantidas em solução de Acetato de sódio 0,05 M por 4 min, sob agitação. A solução foi então descartada e uma nova adicionada contendo AEC (3-Amino -9-etil- carbazol;10 mg/mL) em uma proporção de 24 mL de Acetato de sódio 0,05 M e 1 mL de AEC, e agitada por 2 min. Após

esse período, 15 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂; 10 volumes) foi acrescentado para revelação.

Todos os testes foram realizados em triplicata. Os pesos moleculares foram estimados com base em uma curva utilizando padrão de peso molecular de proteínas (PROMEGA – v8491) na faixa de 10kDa a 225kDa.

4.4. Presença de *Leptospira* e PCR nos tecidos de camundongos C3H/HeJ infectados

4.4.1- Cultura a partir dos tecidos

A obtenção de leptospiros a partir do cultivo dos tecidos foi realizada segundo WHO (2003) e NALLY e colaboradores (2005^a). No 21^o dia após a infecção, os camundongos C3H/HeJ sobreviventes foram submetidos à eutanásia, utilizando câmara de CO₂ (item 4.2.1.2), tendo sangue, rim e fígado retirados para recuperação de leptospiros através do cultivo *in vitro*. O reisolamento de leptospiros foi realizado segundo a metodologia já descrita no item 4.2.1.2.

4.4.2- Reação da polimerase em cadeia - PCR

Utilizou-se a reação da PCR como um método adicional para evidenciar a presença da bactéria nos tecidos dos camundongos infectados. Foram realizadas adaptações das técnicas originalmente descritas para extração de DNA a partir de tecidos. Kawabata e colaboradores (2001) já haviam descrito esta técnica para detecção de leptospiros no sangue e urina de humanos. As seqüências iniciadoras para o gene *flaB* são específicas para as cepas patogênicas de *Leptospira* spp, gerando um fragmento de 793pb (KAWABATA *et al.*, 2001), e têm sido utilizadas no LRNL para diagnóstico de casos humanos (dados não publicados). As seqüências dos iniciadores específicos para regiões do gene *flaB* são mostradas abaixo:

flaB- F1 5'- TCTCACCGTTCTCTAAAGTTCAAC- 3' e

flaB- R1 5'- CTGAATTCGGTTTCATATTTGCC - 3'

Pedaços do rim e do fígado com peso em torno de 25 mg foram coletados dos animais infectados para a realização da técnica de PCR. A extração de DNA a partir dos tecidos foi realizada utilizando o Kit DNeasy tissue kit (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante.

Para a realização da PCR foram adicionados 10 µL do DNA extraído de cada órgão a 40 µL da mistura de reação, contendo 200 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP - PROMEGA), 2,5 mM de MgCl₂, 8 ng de albumina de soro bovino (BSA - Promega), 2,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (PROMEGA) e 0,5 pmol das seqüências iniciadoras do gene *flaB* (Promega). Como controles positivo e negativo, foram utilizados DNA extraído da cepa de referência M20 (sorovar Copenhageni) e a mistura de reação sem DNA, respectivamente.

Ciclo de reação utilizado:

- 1) Desnaturação inicial: 95°C / 3 min
 - 2) Desnaturação: 95°C / 30 s
 - 3) Anelamento: 50°C / 30 s
 - 4) Extensão: 72°C / 60 s
 - 5) Extensão Final: 72°C / 5 min
- } 35 vezes

Para visualização do produto da PCR foi realizada eletroforese (100 volts) em géis de agarose 2% em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7,9). Foi utilizado padrão de tamanho molecular de DNA de 100pb (Promega). Os géis foram corados com brometo de etídio (10 µg/mL) e visualizados em transiluminador. As imagens foram captadas por fotografia Polaroid ou Imagemaster (Pharmacia Biotec).

5-RESULTADOS

5.1. Identificação da cepa

A tabela 5.1 mostra os resultados da identificação da cepa 25179 em nível de sorogrupo. Os títulos altos obtidos com os soros imunes 1 e 2 (preparados com os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni) sugerem que a cepa pertencia a um dos sorovares do sorogrupo Icterohaemorrhagiae. Já a tabela 5.2 mostra os resultados obtidos com os anticorpos monoclonais. F70 C14-7, F70 C24-15 e F89 C12-4. O título mais elevado foi obtido com o anticorpo monoclonal F70 C24-15 e foi significativamente mais elevado do que os títulos obtidos com os monoclonais F70 C14-7 e F89 C12-4. Com base nessa análise, a cepa 25179 foi identificada como pertencente ao sorovar Copenhageni. Este sorovar pertence à espécie *L. interrogans*. Assim sendo, a cepa 25179 pertence à espécie *L. interrogans*, sorovar Copenhageni

5.2. Infecção Experimental

5.2.1 - *Hamsters*

No quinto dia após o inóculo, 7 dos 8 animais infectados foram encontrados mortos. Apenas 1 sobreviveu até a manhã do sexto dia, tempo suficiente para ser submetido aos procedimentos de reisolamento da bactéria. Todos os animais do grupo não infectado sobreviveram no período de observação de 21 dias. As leptospiros foram recuperadas dos rins e fígado após 2 semanas de incubação em meio de EMJH semi-sólido.

5.2.2- Camundongos C3H/HeJ

A tabela 5.5 mostra que os camundongos C3H/HeJ são suscetíveis à infecção letal com a cepa 25179, pertencente a espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Dentre os 19 animais de 4-5 semanas infectados com doses de aproximadamente 10^5 a 10^6 leptospiros, 9 (47,4%) morreram entre 7 e 10 dias.

Os 10 animais que sobreviveram (52,6%) após esse período permaneceram vivos e sem sinais clínicos evidentes até o 21º dia de observação. Todos os animais não infectados permaneceram vivos e sem sinais de infecção até 21 dias de observação. O maior número de sobreviventes foi observado no grupo 3, composto de animais de 5 semanas de idade inoculados com a menor dose utilizada nos experimentos ($1,8 \times 10^5$). Do total de 4 animais, 3 sobreviveram (75%).

5.3- Resposta de anticorpos específicos nos camundongos infectados

5.3.1- Sorologia por MAT

Foram testados 10 soros de camundongos infectados e 8 soros dos camundongos não infectados. Os soros dos camundongos que sobreviveram 21 dias após o inóculo apresentaram títulos de anticorpos na faixa de 1:1600 a 1: 6400. Todos os animais não infectados apresentaram reação negativa (Tabela 5.4).

5.3.2 - SDS-PAGE e *Western blotting* utilizando extrato de LPS e extrato enriquecido em proteínas de membrana externa (OMPs)

O SDS-PAGE do extrato de LPS corado pela prata revelou o padrão de bandas esperado. No *Western blotting*, utilizando soros humanos positivos no teste de MAT, foram observadas reações na faixa de peso molecular correspondente à banda do LPS de 14,5kDa e uma faixa de 20kDa a 30kDa (Figura 5.1). Os soros dos camundongos infectados não reagiram com o extrato de LPS. Os soros humanos negativos no MAT não revelaram nenhuma banda com o extrato de LPS.

O SDS-PAGE do extrato enriquecido em OMPs corado pela prata revelou um perfil de bandas na faixa de 21kDa a 90kDa. As bandas com pesos moleculares de aproximadamente 21kDa, 26kDa, 35kDa e 40kDa do SDS-PAGE foram reconhecidas no *Western blotting* com os soros humanos (Figura 5.2)

O soro de camundongo com título de 1:6400 no MAT reconheceu uma banda de proteína com peso molecular aproximado de 39kDa (Figura 5.3). Nenhuma banda foi revelada nos testes com soros dos animais não infectados.

5.4- Detecção de *Leptospira* nos tecidos por cultura e PCR

5.4.1- Cultura a partir dos tecidos

A tabela 5.5 mostra os dados comparativos dos resultados das técnicas de isolamento em cultura e PCR a partir do fígado e rins dos camundongos infectados. Do total de 10 tentativas de isolamento a partir do fígado, foram obtidos os cultivos de 2 animais infectados. Das 10 tentativas a partir dos rins, foram obtidos 8 cultivos. Nenhum cultivo foi obtido dos animais não infectados.

5.4.2- PCR a partir dos tecidos

Os rins de 9 camundongos infectados, entre os 10 que sobreviveram até o 21^o dia apresentaram PCR positiva nos extratos de DNA dos rins, gerando fragmento de 793pb (Figura 5.4). Não foi observada amplificação nas amostras de DNA extraídas do fígado dos 10 animais e nos 8 não infectados (tabela 5.5). A banda de 793pb também foi observada no controle positivo (cepa M20) em todos os géis.

Tabela 5.1- Teste de aglutinação microscópica (MAT) da cepa 25179 com soros imunes de referência produzidos em coelho.

Designação	Sorogrupo	Título com sorovares de referência	Título com cepa teste
1	Icterohaemorrhagiae	25600	25600
2	Icterohaemorrhagiae	6400	12800
3	Canicola	51200	---
4	Grippotyphosa	25600	---
5	Pomona	6400	---
6	Australis	204800	---
10	Bataviae	25600	---
11	Celledoni	800	---
12	Cynopteri	6400	---
13	Djasiman	25600	---
14	Hebdomadis	1600	---
15	Javanica	1600	---
16	Panama	3200	---
17	Pyrogenes	6400	---
18	Sejroe	204800	---
19	Sejroe	6400	---
20	Shermani	1600	---
21	Tarassovi	12800	---

--- = reação negativa

Tabela 5.2 – Teste de aglutinação microscópica da cepa 25179 com anticorpos monoclonais.

Antígenos	Anticorpos Monoclonais		
	F70 C14-7	F70 C24-15	F89 C12-4
Icterohaemorrhagiae	20480	80	---
Copenhageni	160	20480	640
Cepa 25179	640	20480	640

--- = negativo

Tabela 5.3 - Mortalidade e sobrevivência em camundongos C3H/HeJ infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni - 7 a 21 dias de observação.

Grupo	Qt./ grupo	Idade (sem.)	Inóculo em 0,1 mL	Mortalidade 7-10 dias	Sobrevivência	
					14 dias	21 dias
1	05	4	$2,5 \times 10^5$	3 (60%)	2 (40%)	2 (40%)
2	10	5	$2,3 \times 10^6$	5 (50%)	5 (50%)	5 (50%)
3	04	5	$1,8 \times 10^5$	1 (25%)	3 (75%)	3 (75%)
4	08	4-5	Não infectado	0	8 (100%)	8 (100%) ^c
Total	27	4-5		09 (47,4%)^a	10 (52,6%)^b	10 (52,6%)^b

a- 47,4% de mortalidade nos grupos de camundongos infectados; b- 52,6% de sobrevivência nos grupos de camundongos infectados; c-100% de sobrevivência nos grupos controle.

Tabela 5.4 - MAT dos soros dos camundongos sobreviventes 21 dias após infecção frente à cepa 25179.

Experimento	Dose Infectante	Camundongo	Título de anticorpos
I	$2,5 \times 10^5$	1	3200
	$2,5 \times 10^5$	2	6400
	-----	Não infectados (n= 2)	negativos
II	$2,3 \times 10^6$	1	1600
	$2,3 \times 10^6$	2	3200
	$2,3 \times 10^6$	3	3200
	$2,3 \times 10^6$	4	1600
	-----	Não infectados (n= 3)	negativo
III	$1,8 \times 10^5$	1	6400
	$1,8 \times 10^5$	2	3200
	$1,8 \times 10^5$	3	1600
	$2,3 \times 10^6$	4	6400
	-----	Não infectados (n= 3)	negativo

Tabela 5.5 - Reisolamento de leptopiras e detecção do gene *flaB* por PCR nos tecidos dos camundongos C3H/HeJ infectados.

Grupo	Inóculo em 0,1 mL	Sobreviventes	Cultura Positiva Fígado	Cultura Positiva Rim	PCR Positiva Rim
1	2,5 X10⁵	2	0	0	1
2	2,3 X 10⁶	5	2	5	5
3	1,8 X 10⁵	3	0	3	3
Subtotal - Infectados		10	2	8	9
4	Não infectados	8	0	0	0

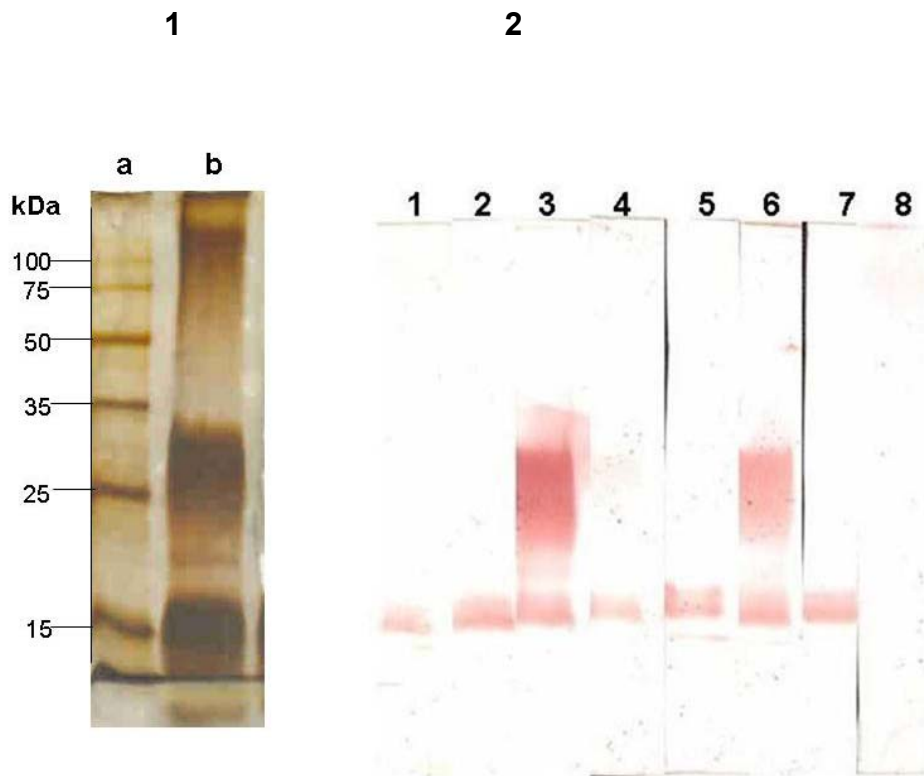


Figura 5.1- 1) a: padrão de peso moelcular de proteínas em kDa; b: perfil de bandas do LPS da cepa 25179. 2) *Western blotting* após revelação com anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado à peroxidase. As linhas 1,2,3,4,5,6,7 representam os soros humanos (MAT positivos) que reconheceram determinadas regiões do LPS; Linha 8- reação com soro humano negativo para

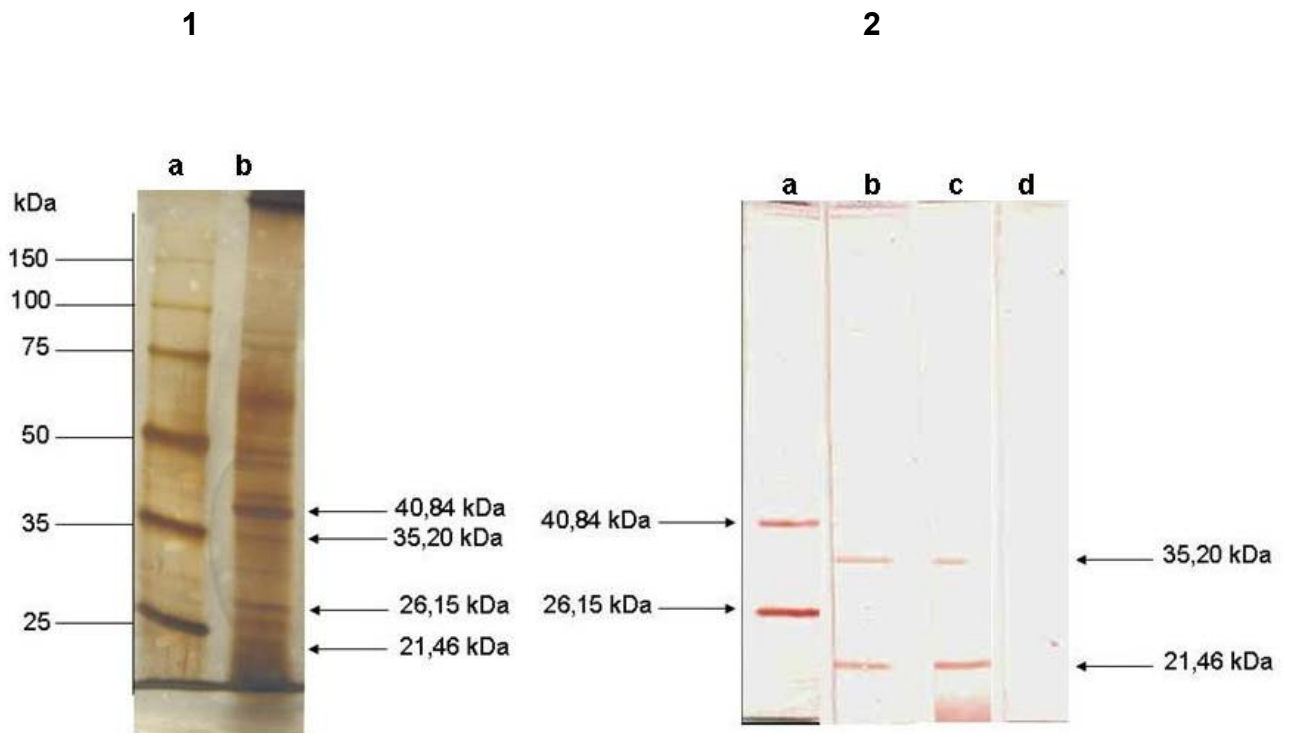


Figura 5.2- 1) a: padrão de peso molecular de proteínas em kDa; b: SDS-PAGE do perfil de OMPs da cepa 25179; 2) *Western blotting* após a revelação com anticorpo secundário anti- IgG humana conjugado à peroxidase; linhas a, b e c representam os soros humanos (MAT > 800) que reconheceram OMPs; linha d – soro humano negativo no MAT. As setas indicam o peso molecular estimado das proteínas.

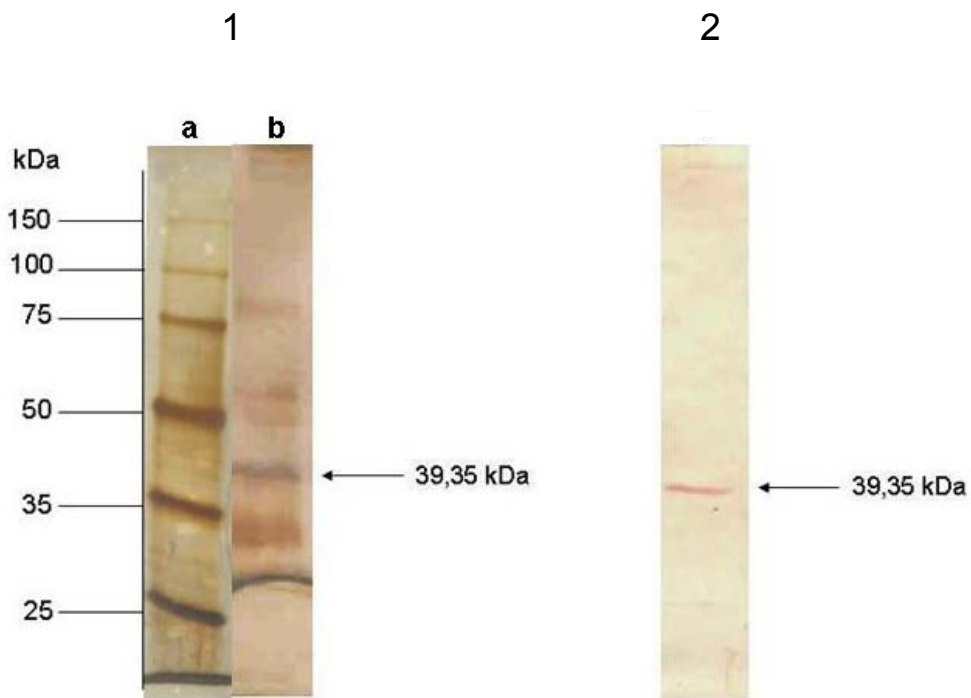


Figura 5.3 - 1) a: padrão de peso molecular de proteínas em kDa; b: SDS-PAGE do extrato enriquecido em OMPs da cepa 25179; 2) *Western blotting* após revelação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase. As setas indicam a banda com peso molecular estimado em 39,35kDa, reconhecida pelo soro de camundongo infectado.

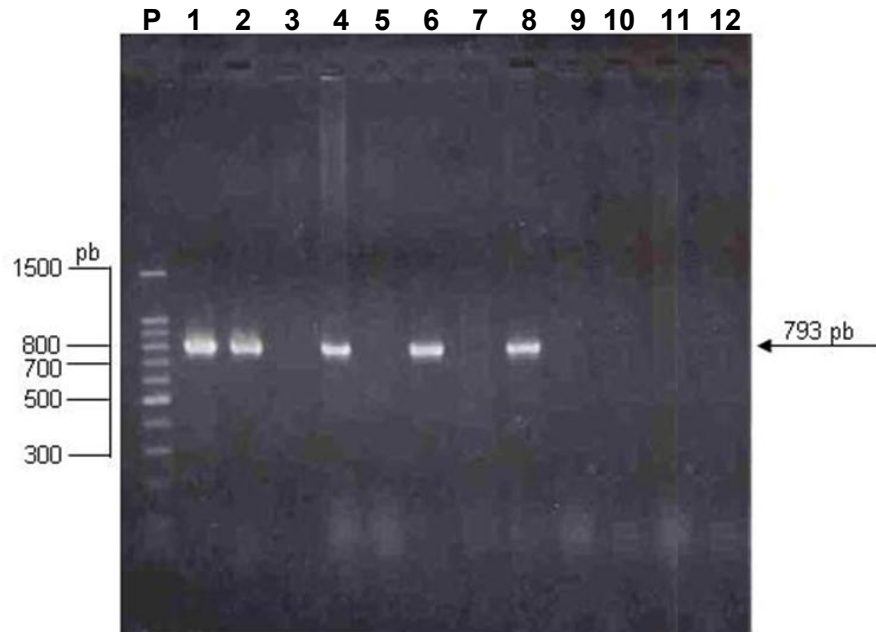


Figura 5.4 – PCR do gene *flaB* (793pb) a partir do DNA extraído dos órgãos dos camundongos C3H/HeJ infectados. Canaletas: P- padrão de tamanho molecular 100pb DNA Ladder; 1- Controle positivo (cepa M20 sorovar copenhageni); 2, 4, 6, 8 – rim; 3, 5, 7, 9 – fígado; 10 – controle do rim não infectado; 11- controle do fígado não infectado; 12- branco da reação.

DISCUSSÃO

Os resultados observados confirmam a susceptibilidade da linhagem C3H/HeJ à infecção letal por *Leptospira interrogans*, sorovar Copenhageni. Os estudos iniciais foram realizados com um outro sorovar da espécie *Leptospira interrogans*, o sorovar Icterohaemorrhagiae. Posteriormente, investigações similares foram realizadas por outros laboratórios fora do país, utilizando outros sorovares (NALLY *et al.*, 2005, VIRIYAKOSOL *et al.*, 2006).

O sorovar Copenhageni é o principal agente etiológico da leptospirose humana nas regiões sudeste e nordeste do Brasil (PEREIRA *et al.*, 2000). Este sorovar está implicado na etiologia das formas mais graves da doença, hoje conhecidas como formas pulmonares graves (Da SILVA *et al.*, 2002, PEREIRA *et al.*, 2005).

A cultura de número 25179, utilizada para infectar os camundongos C3H/HeJ, foi obtida de um paciente que apresentou a forma pulmonar grave da leptospirose, com evolução para o óbito. Os testes convencionais empregados na identificação mostraram que a mesma pertencia ao sorovar Copenhageni, sorogrupo Icterohaemorrhagiae. É importante assinalar ainda que os casos humanos descritos no Brasil com as características das formas pulmonares graves (FPGL) foram causados por leptospirosas pertencentes ao sorovar Copenhageni (Da SILVA *et al.*, 2002).

O inóculo de aproximadamente 10^5 leptospirosas causou 100% de letalidade em *hamsters* de 21 dias, em um período de 5 dias após o inóculo. Esta observação mostra que a cepa manteve as propriedades de virulência na ocasião do experimento.

Para avaliar a resposta imune de anticorpos em camundongos C3H/HeJ, foi necessário estabelecer uma padronização do inóculo e a idade dos animais, que permitissem a sobrevivência de aproximadamente 50% dos animais infectados. Verificou-se que doses de aproximadamente 10^5 e 10^6 leptospirosas, inoculadas em camundongos de 4-5 semanas, foram adequadas para atingir o objetivo.

A análise dos dados de mortalidade e sobrevivência em camundongos C3H/HeJ infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni mostra que nas condições do experimento, 47,4% dos camundongos desenvolveram infecção letal e

que a morte ocorreu entre 7 a 10 dias após o inóculo. Do total de animais infectados, 52,6% sobreviveram por um período de observação de 21 dias. Esse intervalo de tempo foi escolhido por ser o tempo necessário para a evolução do processo infeccioso, com o desenvolvimento de resposta imune e o estabelecimento do estado de portador renal. Os animais cuja infecção não evoluiu para o óbito, no período de 7-10 dias após a inoculação, sobreviveram até o 21^o dia. Tanto a infecção letal, quanto o processo infeccioso com o desenvolvimento de imunidade protetora corresponderam aos intervalos de tempo esperados conforme os dados da literatura. Estudos anteriores com primatas não-humanos evidenciaram que duas a três semanas (14-21 dias) após a inoculação, havia sinais evidentes de recuperação das lesões teciduais (PEREIRA *et al.*, 2005).

As cepas patogênicas recém isoladas de casos humanos ou animais apresentam propriedades de virulência que permitem a reprodução das principais alterações patológicas em *hamsters* e cobaios. Com passagens sucessivas *in vitro*, as cepas podem ser atenuadas ou perderem completamente as propriedades de virulência (PEREIRA & AVELAR, 2004; PEREIRA, 2005). Os principais fatores de virulência envolvidos na infecção *in vivo* e as alterações nas cepas cultivadas *in vitro* não são bem conhecidos. Devido a essas observações, recomenda-se que sejam utilizadas culturas com poucas passagens *in vitro* (até duas) nos estudos ligados a patogenicidade de leptospiras.

Todavia, na prática há dificuldades técnicas que dificultam substancialmente a utilização de cultivos que tenham sido submetidos a duas passagens *in vitro* no máximo (*low passage*). As principais dificuldades envolvem os riscos encontrados na manipulação do patógeno e a necessidade de obtenção de inóculos que possam ser quantificados com certo grau de precisão e livres de contaminantes. Foram utilizadas culturas com até 5 passagens *in vitro*, mas os experimentos foram acompanhados de controles de *hamsters* que permitiram a constatação de que a cepa manteve as propriedades de virulência (PEREIRA *et al.*, 1997; PEREIRA *et al.* 1998; KOIZUMI & WATANABE, 2003; NALLY *et al.*, 2005b).

A utilização de camundongos ao invés de *hamsters* e cobaios pode apresentar vantagens em diversas etapas do desenvolvimento e produção de vacinas para leptospirose. Esses modelos ainda não haviam sido utilizados uma vez que a literatura mostra que diversas linhagens não são suscetíveis à infecção letal (ADLER & FAINE, 1977; FAINE *et al.*, 1999). A linhagem C3H/HeJ é a única

linhagem suscetível que apresenta uma mutação associada ao receptor TLR4 que torna macrófagos, células dendríticas e neutrófilos hiporresponsivos ao LPS (SHIZUO & HIROAKI, 2003). Esta peculiaridade pode estar relacionada à suscetibilidade e representar ou não uma limitação no estudo de potenciais candidatos ao desenvolvimento de vacinas. Assim sendo, as primeiras perguntas a serem respondidas seriam se essa linhagem de camundongos responderia ao LPS de *Leptospira* e se haveria resposta imune a antígenos protéicos localizados na superfície da bactéria.

A opção por avaliar inicialmente essas respostas do hospedeiro através da infecção experimental e não através de processo de imunização com frações antigênicas específicas deve-se a algumas considerações e ponderações. As principais delas são: as vacinas atualmente disponíveis para uso humano e animal são preparações de um ou mais sorovares de *Leptospira*, utilizando bactérias íntegras inativadas e a avaliação da resposta ao LPS e a proteínas de membrana externa de leptospiros é crucial na patogênese da infecção, e conseqüentemente de grande importância na utilização do modelo experimental em desafios pós-imunização.

O LPS de *Leptospira* difere do LPS típico das bactérias Gram-negativas sob vários aspectos, mas representa um alvo primário na resposta imune inata dos hospedeiros (WERTS *et al.*, 2001; QUE-GEWIRTH *et al.*, 2004). Há evidências recentes de que o LPS de *L. interrogans* ativa predominantemente o receptor TLR2 em células humanas e que em células de camundongos pode ativar tanto TLR2 quanto TLR4 (NAHORI *et al.*, 2005).

Considerando as características genéticas da linhagem C3H/HeJ e particularmente a hiporresponsividade ao LPS - associada ao receptor TLR4, a principal questão a ser esclarecida é a resposta ao LPS de leptospiros. A essa questão central podem estar associados diversos mecanismos envolvidos nas alterações patológicas ou na resistência à infecção.

Os camundongos que sobreviveram à infecção experimental desenvolveram níveis de anticorpos elevados no teste de aglutinação microscópica. Os títulos observados (1:1600 a 1:6400) estão associados à resistência à infecção conforme demonstrado em estudos prévios, onde se verifica a concomitante resolução das lesões teciduais (PEREIRA *et al.* 1998) Os níveis de anticorpos aglutinantes são comparáveis aos títulos de anticorpos obtidos em processos de imunização, utilizando outras linhagens de camundongos (PEREIRA *et al.*, 1997).

É importante mencionar que a técnica de MAT detecta um somatório de imunoglobulinas presentes no soro, predominantemente IgM e IgG dirigidos a antígenos de superfície das leptospiros. Como descrito na metodologia, são utilizadas leptospiros vivos em cultura como antígeno. Camundongos não infectados não reagiram ao teste de MAT. Esses resultados mostram que a resposta é específica e que os camundongos respondem a antígenos localizados na superfície da bactéria, sendo alvos primários na resposta imunológica à infecção.

O LPS é um antígeno imunodominante na infecção por *Leptospira* (WERTS *et al.*, 2001; QUE-GEWIRTH *et al.*, 2004). Os soros humanos positivos no MAT eram reagentes com o sorovar Copenhageni e apresentavam títulos na faixa de 1:800 a 1:25.600. O *Western blotting* do extrato de LPS com os soros humanos revelou bandas de pesos moleculares estimados em 14,5kDa e uma faixa de 20kDa a 30kDa correspondentes ao LPS, de acordo com os achados de estudos similares previamente publicados (HAAKE *et al.*, 1991, NALLY *et al.*, 2005 a). Soros negativos não revelaram nenhuma banda.

Os testes com soros humanos foram realizados para obter um padrão positivo de resposta ao extrato de LPS por *Western blotting*. Dentre os 20 soros humanos testados, 7 revelaram reações positivas com os extratos de LPS. Esse resultado indica que há necessidade de ajustes para melhorar a sensibilidade do teste e evidenciar a resposta ao LPS na maioria dos soros humanos. É importante complementar os testes utilizando conjugados anti-Ig total e anti-IgM humanos.

O mesmo extrato foi utilizado para detectar a resposta imune dos camundongos C3H/HeJ ao LPS de *Leptospira*. Os 10 soros dos animais sobreviventes e positivos no teste de MAT não revelaram bandas no extrato de LPS. Contudo, ainda há necessidade de complementar os testes utilizando conjugados anti-imunoglobulina total e anti-IgM de camundongos, a fim avaliar o grau de deficiência na resposta desta linhagem ao LPS de *Leptospira*.

Além dos antígenos de natureza lipopolissacarídica, a membrana externa da bactéria exibe proteínas reconhecidas como imunógenos importantes, algumas das quais têm sido objeto de estudos ligados ao desenvolvimento de vacinas (BARNETT *et al.*, 1999; HAAKE *et al.*, 1999; HAAKE *et al.*, 2002; MATSUNAGA *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2002; CULLEN *et al.*, 2003; MATSUNAGA *et al.*, 2003).

Os soros humanos positivos no MAT reconheceram proteínas com pesos moleculares estimados em 21kDa, 26kDa, 35kDa e 40kDa, mas apenas 3 dos 20 soros positivos reagiram positivamente no *Western blotting*. Além disso, algumas

proteínas freqüentes em cepas patogênicas de *Leptospira*, descritas em publicações anteriores não foram detectadas (HAAKE & MATSUNAGA 2002; MATSUNAGA *et al*, 2002; YANG *et al.*, 2002; CULLEN *et al*, 2003; MATSUNAGA *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2005). Tal resultado pode indicar uma baixa expressão no nível dessas proteínas, conforme relatos da literatura, ou até mesmo uma baixa sensibilidade no método de detecção utilizado. Análises posteriores para ratificação dessa hipótese deverão ser conduzidas com a utilização de conjugados anti- imunoglobulina total e anti-IgM humanos.

O soro de camundongo com título de 1:6400 no MAT reconheceu uma proteína com peso molecular estimado em 39kDa, a qual apresentou peso molecular muito próximo ao observado em uma das proteínas reveladas nos *Western blot* com soros humanos. Este resultado é de grande interesse, pois, somado aos resultados de sobrevivência dos animais (52,6%) e sorologia positiva por MAT (100% dos sobreviventes), sugere que o modelo experimental utilizado pode ser empregado no estudo da patogênese da leptospirose. Contudo, antes de avaliar os mecanismos envolvidos na resposta imune inata e adaptativa dessa linhagem, é importante identificar as classes de imunoglobulinas e a natureza dos antígenos envolvidos, sem que haja necessidade de alterações no delineamento do protocolo de infecção animal.

Um aspecto a ser ressaltado em relação ao modelo refere-se ao estabelecimento do estado de portador renal nos sobreviventes, que ao mesmo tempo obtiveram sorologia positiva pelo teste de MAT. O fato, cujos mecanismos ainda não são esclarecidos é comum entre portadores assintomáticos na natureza e é observado em infecções experimentais (PEREIRA *et al.* 1998; WHO 2003; PEREIRA *et al.* 2005).

O reisolamento de leptospiras caracteriza o estado de portador renal demonstrando a presença de leptospiras viáveis no macerado do órgão (FAINE 1982; WHO, 2003). Embora seja uma evidência direta da presença da bactéria, o procedimento é trabalhoso e os resultados são obtidos entre 7 e 14 dias no mínimo. As leptospiras têm crescimento fastidioso *in vitro* e dificuldades técnicas como contaminação dos tecidos nos procedimentos de autópsia e coleta, interfere substancialmente no êxito das tentativas de reisolamento.

Todavia, o procedimento convencional, com ajustes no tempo e agitação dos macerados de tecidos para recuperação de leptospiras contribuiu para obtenção de resultados muito próximos do ideal. Não foi obtido o isolamento a partir do rim de

apenas 2 animais entre os 10 infectados, ou seja, a recuperação do microorganismo a partir dos rins dos camundongos infectados com 21 dias de inoculação foi de 80%. Dois animais apresentaram cultura positiva a partir do fígado nesse momento. A observação é rara nessa fase da doença, quando a quantidade de leptospiras já seria bem menor do que na fase inicial da infecção (7-10 dias após a inoculação).

A técnica de PCR foi realizada com o objetivo de utilizar um método mais rápido para evidenciar a presença da bactéria através da amplificação de fragmentos de DNA presentes nos tecidos dos animais infectados. Como mencionado anteriormente, a técnica foi baseada na utilização de iniciadores previamente descritos e procedimentos de extração de DNA em tecidos. Pequenas modificações no método originalmente descrito por Kawabata e colaboradores (2001) foram realizadas em nosso laboratório, e esta técnica vem sendo utilizada com propósito de diagnóstico da infecção humana. As modificações permitiram essencialmente a melhoria na visualização dos fragmentos amplificados e a minimização de reações inespecíficas com DNA de outras origens (dados não publicados).

Aproveitando as modificações mencionadas, e acrescentando os procedimentos de extração a partir dos tecidos, 9 entre os 10 camundongos infectados apresentaram PCR positiva nos rins e todos os controles apresentaram PCR negativa. Em nossa análise a PCR mostrou-se mais sensível que a cultura, uma vez que foi possível obter resultado positivo de PCR em 9 dos 10 animais, enquanto que a cultura foi positiva em apenas 8. Tal resultado aponta a técnica de PCR como um método bastante promissor e a concordância entre o método de isolamento convencional e a PCR foi absolutamente satisfatória.

Com base nos resultados observados, recomenda-se a utilização da técnica de PCR em tecidos com os iniciadores e procedimentos descritos nesse trabalho. A mesma poderá ser empregada tanto na experimentação animal, quanto para o diagnóstico da infecção em animais e em casos humanos *post mortem*. Considerando que os genes que codificam proteínas do flagelo (*flaB*) estão presentes em diversos sorovares de leptospiras patogênicas, a técnica descrita poderá ser utilizada independentemente da origem das amostras (animal ou humana). A rapidez nos resultados é mais um elemento de grande importância para a utilização da técnica de PCR com o propósito de diagnóstico.

CONCLUSÕES

- 1- A cultura 25179 isolada de caso humano foi identificada como pertencente ao sorovar Copenhageni da espécie *L. interrogans*;
- 2- A infecção experimental de camundongos C3H/HeJ de 4-5 semanas de idade com quantidades de 10^5 a 10^6 leptospiras causou infecção letal e aproximadamente 50% de sobrevivência;
- 3- Os camundongos C3H/HeJ que sobreviveram à infecção letal, desenvolveram anticorpos aglutinantes e albergaram leptospiras nos túbulos renais 21 dias após o inóculo;
- 4- Os camundongos C3H/HeJ apresentaram deficiência na resposta de anticorpos da classe IgG dirigidos ao LPS de *Leptospira*. Porém, os dados ainda não são conclusivos. Outras análises são necessárias ratificar essa afirmação.
- 5- O soro de camundongo com título de 1:6400 no MAT reconheceu uma proteína com peso molecular muito próximo ao observado em uma das proteínas reveladas nos *Western blot* com soros humanos, o que é de grande interesse no estudo da patogênese da leptospirose.
- 6- A reação em cadeia da polimerase (PCR) em tecidos, utilizando o par de iniciadores para o gene *flaB* mostrou-se sensível e específica. A mesma pode ser utilizada como indicador da presença de leptospiras em estudos que envolvam experimentação animal ou no diagnóstico da infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunidade inata*. In *Imunologia Celular e Molecular*. Revinter, Rio de Janeiro, 2003, p 270-290.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Mecanismos efetores da imunidade mediada por células*. In *Imunologia Celular e Molecular*. Revinter, Rio de Janeiro, 2003, p 291-308.
- Adler B, Faine S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infection. *Infect Immun* 1977; **17**: 67-72.
- Amutha R, Chaudhuri P, Garg AP, Cheema PS, Srivastava SK. Immunoreactive outer membrane proteins of *Leptospira interrogans* serovar Canicola strain Hond Utrecht IV. *Indian J Med Res* 2006; **124**: 569-574.
- Aragão HB. Sobre a presença do *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* nos ratos do Rio de Janeiro. *Brasil Med* 1917; **31**: 329-330.
- Avelar KES & Pereira MM. Espiroquetídeos In: Trabulsi LR & Althertum F (eds). *Microbiologia* 4^a ed. São Paulo: Atheneu; 2004. p 399-407.
- Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, Summers TA, Wagar EA, Cheville NF et al. Expression and distribution of leptospiral outer membrane componentes during renal infection of hamsters. *Infect Immun* 1999; **67**:853-861.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003; **3**: 757-571.
- Boom WH. $\gamma\delta$ T cells and *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb Infect* 1999; **1**: 187-195.
- Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol* 1995; **43**: 110-114.
- Cullen PA, Haake DA, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun* 2003; **71**: 2414-2421.
- Da Silva JJ, Dalston MO, Carvalho JE, Setubal S, Oliveira JM & Pereira MM. Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; **35**: 395-399

Diament D, Brunialti MK, Romero EC, Kallas EG, Salomao R. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. *Infect Immun* 2002; **70**: 1677-1683.

Dursun B, Bostan F, Artac M, Varan HI, Suleymanlar G. Severe pulmonary haemorrhage accompanying hepatorenal failure in fulminant leptospirosis. *Int J Clin Pract* 2007; **61**: 162-167.

Ellinghausen HC, McCullough WG. Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: A serum-free medium employing oleic albumin complex. *Am J Vet Res* 1965^a; **26**: 39-44.

Ellinghausen HC, McCullough WG. Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: Fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am J Vet Res* 1965^b; **26**: 45-51.

Ellinghausen HC, McCullough WG. Albumin fatty acid broth for *Leptospira*, modified by Johnson and Harris. *J Bacteriol* 1967; **94**: 27-31.

Esen S, Sunbul M, Leblebicioglu H, Eroglu C, Turan D. Impacto of clinical and laboratory findings on prognosis in leptospirosis. *Swiss Med Wkly* 2004; **134**: 347-352.

Faine S. *Guidelines for the control of Leptospirosis*. Geneva: World Health Organization; 1982.

Faine S, Stallman ND. Amended descriptions of the genus *Leptospira* Noguchi 1917 and species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918. *Int J Syst Bacteriol* 1982; **32**: 461-463.

Faine S. *Leptospira and leptospirosis*. Boca Raton, Florida, CRC Press Inc.; 1994.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira and leptospirosis*. 2 ed. Austrália : MediSci, Melbourne; 1999.

Farias et al. *Manual de Leptospirose* 1997. 3ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 98p.

Fundação Nacional de Saúde. *Guia de vigilância Epidemiológica*, Ministério da Saúde, Brasília, 2002.

Gamberini M, Gómez RM, Atzingen MV, Martins EAL, Vasconcellos AS, Romero EC et al. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potencial vaccine candidates against leptospirosis. *FEMS Microbiol. Lett* 2005; **244**: 305-313.

Gonçalves AJR. Formas graves de leptospirose. Uma visão atual da clínica e da terapêutica com algumas anotações sobre os surtos epidêmicos no estado do Rio de Janeiro. *J Bras Med* 1988; **54**: 95-100.

Gonçalves AJR, de Carvalho JE, Guedes e Silva JB, Rozembaum R, Vieira AR. Hemoptysis and the adult respiratory distress syndrome as the cause of death in leptospirosis. Changes in the clinical and anatomicopathological patterns. *Rev Soc Bras Med Trop* 1992; **25**: 261-70.

Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJ et al. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol* 1993; **139**: 1691-1700.

Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvão Reis M et al. Leptospiral Proteins Recognized during the Humoral Immune Response to Leptospirosis in Humans. *Infect Immun* 2001; **69**: 4958-4968.

Haake DA, Walker EM, Blanco DR, Bolin CA, Miller JN, Lovett MA. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during *in vitro* cultivation. *Infect Immun* 1991; **59**: 1131-1140.

Haake DA, Champion CI, Martinich C, Shang ES, Blanco DR, Miller JN et al. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J Bacteriol* 1993; **175**: 4225-4234.

Haake DA, Martinich C, Summers TA, Shang ES, Pruetz JD, McCoy AM et al. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infect Immun* 1998; **66**: 1579-1587.

Haake DA, Mazel MK, McCoy AD, Chão FMG, Matsunaga J, Wagar EA. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun* 1999; **67**: 6572-6582.

Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology Rev* 2000; **146**: 1491-1504.

Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 2000; **68**: 2276-2285.

Haake DA, Matsunaga J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect Immun* 2002; **70**: 4936-4945.

Hitchcock PJ, Brown TM. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J Bacteriol* 1983; **154**: 269-277.

Inada R, Ido Y, Hoki R, Kanedo R, Ito H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (Spirochaetosis icterohaemorrhagica). *J Exp Med* 1916; **23**: 377-402.

Kawabata H, Dancel LA, Villanueva SY, Yanagihara Y, Koizumi N, Watanabe H. fln-polymerase chain reaction (fln-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection and identification of *Leptospira* spp. *Microbiol Immunol* 2001; **45**: 491-496.

Klimpel GR, Matthias MA, Vinetz JM. *Leptospira interrogans* activation of human peripheral blood mononuclear cells: preferential expansion of TCR gamma delta + T cells X TCR alpha beta + T cells. *J Immunol* 2003; **171**: 1447-1455.

Ko AI, Galvão Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD JR, Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brasil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 1999; **354**: 820-825.

Kobayashi Y. Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view. *J Infect Chemother Rev* 2001; **7**: 10-15

Koizumi N, Watanabe H. Identification of a novel antigen of pathogenic *Leptospira* spp. that reacted with convalescent mice sera. *J Med Microbiol* 2003; **52**: 585-589.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.

Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**: 296-326.

Lee SH, Kim S, Park SC, Kim MJ. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. *Infect Immun* 2002; **70**: 315-322.

Ludwig W, Strunk O, Klugbauer S, Klugbauer N, Weizenegger M, Neumaier J et al. bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis Rev* 1998; **19**: 554-568.

Matsunaga J, Young TA, Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, Haake DA. Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31-kilodalton growth-phase regulated peripheral membrane protein. *Infect Immun* 2002; **70**: 323-334.

Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol* 2003; **49**: 929-945.

Matsunaga J, Sanchez Y, Xu X, Haake DA. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. *Infect Immun* 2005; **73**: 70-78.

McBride AJA, Atthanazio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis Rev* 2005; **18**: 376-386.

Merien F, Baraton G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J Infect Dis* 1995; **172**: 281- 285.

Morey RE, Galloway RL, Bragg SL, Steigerwalt AG, Mayer LW, Levett PN. Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 3510-3516.

Nahori MA, Fournié-Amazouz E, Que-Gewirth NS, Balloy V, Chinard M, Raetz CR *et al*. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol* 2005; **175**: 6022-6031.

Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent TH1 immunity comprising responses by CD4 and $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Infect Immun* 2001; **69**: 7550-7558.

Nally JE, Timoney JF, Stevenson B. Temperature-regulated protein synthesis by *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 2001; **69**: 400-404.

Nally JE, Artiushin S, Timoney JF. Molecular characterization of thermoinduced immunogenic proteins Q1p42 and Hsp15 of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 2001; **69**: 7616-7624.

Nally JE, Chantranuwat C, Wu XY, Fishbein MC, Pereira MM, Silva JJ *et al*. Alveolar septal deposition of Immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary Leptospirosis. *Am J Pathol* 2004; **163**: 1115- 1127

Nally JE, Chow E, Fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. *Infect Immun* 2005^a ; **73**: 3251-3260.

Nally JE, Fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA. Lethal infection of C3H/HeJ and C3H/SCID mice with na isolate of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Infect Immun* 2005^b ; **73**: 7014-7017.

Nally JE, Whitelegge JP, Aguilera R, Pereira MM, Blanco DR, Lovett MA. Purification and proteomic analysis of outer membrane vesicles from a clinical isolate of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Proteomics* 2005^c ; **5**: 144-152.

Nascimento ALTO, Verjovski-Almeida S, Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LEA, Digiampietri LA *et al*. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz J Med Biol Res* 2004; **37**: 459-478.

O'Neill LAJ. Toll-like receptor signaling. *Nature Immunol Rev* 2004.

Organização Mundial de Saúde. *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. ISBN: WHO; 2003.

Pappas G, Cascio A. Optimal treatment of leptospirosis: queries and projections. *Int J Antimicrob Agents* 2006; **28**: 491-496.

Pereira MM, Andrade J. Epidemiological aspects of leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brasil. Search for leptospire and specific antibodies in rodents. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; **82**: 766-770.

Pereira MM, Andrade J. Human leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil—a serological and epidemiological study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990; **85**: 47-52.

Pereira MM, Andrade J, Lacerda DM, Batoréu NM, Marchevsky RS. Demonstration of leptospiral antigens on tissues using monoclonal antibodies and avidin-biotin peroxidase staining. *Exp Toxic Pathol* 1997; **49**: 505-511.

Pereira MM, Andrade J, Marchevsky RS, Ribeiro dos Santos R. Morphological characterization of lung and kidney lesions in C3H/HeJ mice infected with *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae: Defect of CD4+ and CD8+ T-cells are prognosticators of the disease progression. *Exp Toxic Pathol* 1998; **50**: 191-198.

Pereira MM, Matsuo MGS, Bauab AR, Vasconcelos AS, Moraes ZM, Baranton G et al. A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans* sensu stricto is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 450-452.

Pereira MM, Pereira da Silva JJ, Pinto MA, Machado MP, Lenzi HL, Marchevsky RS. Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): a new experimental model for studies of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 2005; **72**: 13-20.

Pereira MM. Leptospirose In: Coura JR (ed). *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005, **Vol II**, p. 1497-1508.

Que-Gewirth NLS, Ribeiro AA, Kalb SR, Cotter RJ, Bulach DM, Adler B et al. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* lipid A. *J Biol Chem* 2004; **279**: 25420-25429.

Rios Gonçalves AJ. Formas graves de leptospirose. *JMB* 1988; **6**: 95-100.

Romero EC, Yasuda PH. Molecular characterization of *Leptospira* sp strains isolated from human subjects in São Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: a public health tool. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; **101**: 373-378.

Shang ES, Exner MM, Summers TA, Martinich C, Champion CI, Hancock REW et al. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is heat-modifiable porin. *Infect Immun* 1995; **63**: 3174-3181.

Shang ES, Summers TA, Haake DA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun* 1996; **64**: 2322-2330.

Shizuo A, Hiroaki H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology Letters* 2003; p: 85-95.

Terpstra WJ, Korver H, Van Leeuwen J, Klatser PR, Kolk AH. The classification of Sejroe group serovars of *Leptospira interrogans* with monoclonal antibodies. *Zbl Bakt Hyg* 1985; **259**: 498-506.

Terpstra WJ, Hartskeerl RA, Smits HL, Korver H. International Course in laboratory techniques for the diagnosis of leptospirosis. *Royal Tropical Institute – KIT; WHO/FAO, Amsterdam; The Netherlands.*

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 vivo control of leptospiral burden. *Infect Immun* 2006; **74**: 887-895.

Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Girons IS et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nature Immunology* 2001; **2**: 346-352.

Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide – induced cellular signaling. *Nature* 1998; **395**: 284-288.

Yang C-W, Wu M-S, Pan M-J. Leptospirosis renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2001; **16**: 73-77.

Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hsieh WJ, Vandewalle A, Huang CC. The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 2037-45.

Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufman AF, Rogres F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *Int J Syst Bacteriol* 1987; **37**: 407-415.

Zhang XY, Yu Y, He P, Zhang YX, Hu BY, Yang Y et al. Expression and comparative analysis of genes encoding outer membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospires. *Acta Biochim Biophys Sin* 2005; **37**: 649-656.

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](#)