

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

MARIA CRISTINA SANTOS HAANWINCKEL

**Avaliação da atividade de macrófagos e produção de anticorpos
em camundongos geneticamente selecionados e infectados com a
*Leptospira sorovar pomona***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Doenças Tropicais da Faculdade de
Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual
Paulista - UNESP para obtenção do título de
Doutor em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Luis de Oliveira

Botucatu

2007

Esse trabalho foi realizado nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências e no Laboratório de Zoonoses do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia do Campus da UNESP de Botucatu, com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq –Processo n.140026/02-9.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Elysio,

Por valiosos anos de ensinamentos de vida, de conceitos baseados na mais pura retidão de comportamento, de atitudes de força, mas, sobretudo de solidariedade com o próximo.

À minha mãe Ruth (In memoriam)

A mais forte de todas as mulheres que conheci, pois nunca permitiu que as adversidades fossem barreiras para suas conquistas, exemplo de honestidade, perseverança e vontade de crescer sempre, sem nunca deixar de amparar àqueles que dela dependiam.

Aos meus irmãos Fátima, Auxiliadora, Paulo, Eduardo e Carolina, e a todos os meus sobrinhos por todos os momentos que possibilitaram a certeza de que podemos contar uns com outros.

A Jorge que embora esteja à distância de um oceano, está a um passo, em sentimento e apoio.

*Nos caminhos que ninguém percorreu arrisca
teu passo. Nos pensamentos que ninguém
cogitou, arrisca tua cabeça.*

Anônimo

AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao Prof^o Dr Sílvio Luis de Oliveira, que com sua orientação colaborou de forma fundamental para que fosse possível a realização desse trabalho.
- ✓ Ao Prof^o Dr Hélio Langoni por ceder as instalações de seus laboratórios para que fosse possível realizar parte desse trabalho, e a seus residentes Rodrigo, André, Juliana e Mônica pelo valioso auxílio.
- ✓ A Prof^a. Dr^a Jane Megid por todos os anos de auxílio durante o meu percurso como residente e pós-graduanda.
- ✓ Ao Prof^o Dr Silvio Arruda Vasconcellos e a Bióloga Zenaíde Maria de Moraes por cederem as cepas de leptospiros utilizadas nesse trabalho.
- ✓ Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela atenção despendida e disponibilidade para ensinar.
- ✓ A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial a Maria de Lourdes Alves e Luís Alquati., Sônia Faraldo e Leonice Garcia, por toda ajuda prestada, e por todas as vezes que necessitei de conselhos.
- ✓ Ao residente da patologia humana Marcelo Padovani de Toledo Moraes pelo auxílio na leitura das lamínas de hematoxilina-eosina.
- ✓ Aos meus colegas pós-graduandos, Fabiane, Juliana, João Gustavo, Ricardo, Gladston, por todas as vezes que precisei de auxílio ou nos momentos de descontração.

- ✓ Aos meus amigos Carla, André, Bianca, Fábio, Wellington, Cristina Crespo, Gustavo, Déborah, Érica, Guilherme e Linda por todas as inúmeras vezes que precisei e estavam presentes, mesmo que apenas em pensamento.
- ✓ Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, sobretudo pela confiança a mim depositada em momentos que foram decisivos para que meu trabalho se concretizasse.

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG-	Bacilo Calmette Guérin
ConA -	Concavalina A
ELISA-	ensaio imuno-enzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
GM-CSF-	fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HE-	eritrócitos humanos
H_{IV-A} -	camundongos bons (H=High) produtores de anticorpo-Seleção IV-A
Ig-	imunoglobulina
L_{IV-A}	camundongos maus (L=low) produtores de anticorpos-Seleção IV-A
LPS-	lipopolissacaride
H₂O₂ -	peróxido de hidrogênio
IFN-γ	interferon-gama
IL	-interleucina
MCCC	-meio completo para cultura de células
MHC	-complexo principal de histocompatibilidade
NK	-células natural Killer
NO	-óxido nítrico
O₂⁻	-ânion superóxido
OONO⁻	-peroxinitrito
PBS	-solução salina tamponada com fosfatos (Phosphate Buffer Saline)
PMA	-Phorbol myristate acetate
SE	-eritrócito de carneiro
TNF-α	-fator de necrose tumoral alfa
Th1	-linfócito T auxiliar tipo 1

LISTA DE FIGURAS

Figuras 1A e 1B. Recuperação de leptospiras em rins (A) e fígado (B) de camundongos das linhagens High (H) e Low (L), submetidos à inoculação de 2×10^7 <i>Leptospira interrogans</i> sorovar pomona em períodos de tempo determinados.....	37
Figura 2. Títulos de anticorpos detectados pelo teste de aglutinação microscópica frente ao antígeno de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar pomona, em camundongos High e Low, inoculados com 2×10^7 leptospiras/ml.....	39
Figuras 3A, 3B, 3C, 3D. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos H e L da seleção IV-A infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar pomona e animais controle não infectados.....	42
Figuras 4A, 4B, 4C, 4D. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos esplênicos de camundongos H e L da seleção IV-A infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar pomona e animais controle não infectados.....	44
Figuras 5A, 5B, 5C, 5D. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos pulmonares de camundongos H e L da seleção IV-A infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar pomona e animais controle não infectados.....	47
Figuras 6A, 6B. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos H e L da seleção IV-A infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar pomona e animais controle não infectados.....	49
Figuras 7A, 7B. Produção de óxido nítrico por macrófagos esplênicos de camundongos H e L da seleção IV-A infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar pomona e animais controle não infectados.....	51
Figuras 8A, 8B. Produção de óxido nítrico por macrófagos pulmonares de camundongos H e L da seleção IV-A infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar pomona e animais controle não infectados.....	53
Figura 9A, 9B, 9C, 9D. Níveis de TNF- α detectados em soros (A) e homogenato de baço (B), fígado (C) e pulmão (D) de camundongos High e Low inoculados com <i>Leptospira</i> sorovar pomona, e grupo controle não infectado.....	56
Figura 10. Valores séricos de uréia (mg/dl) em média $\pm$ desvio padrão em cinco animais por grupo.....	58
Figura 11. Valores séricos de creatinina (mg/dl) em média $\pm$ desvio padrão em cinco animais por grupo.....	58

Figura 12. Fotomicrografia de rins de camundongo infectado com <i>L.interrogans</i> sorovar pomona. Coloração pela imunoperoxidase indireta.....	61
Figura 13. Fotomicrografia de rins de camundongo controle negativo. Coloração pela imunoperoxidase indireta.....	61
Figura 14. Fotomicrografia de tecido renal de camundongo L _{IV-A} infectado. Técnica de Hematoxilina Eosina.....	64
Figura 15. Fotomicrografia de tecido renal de camundongo linhagem H _{IV-A} sadio. Técnica de Hematoxilina Eosina.....	64

SUMÁRIO

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 ANIMAIS.....	24
3.1.1 Camundongos.....	24
3.1.2 Hamsters.....	24
3.2 INÓCULO.....	24
3.3. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS.....	25
3.4 MEIOS DE CULTURA.....	26
3.4.1 Meio Semi-Sólido de Fletcher.....	26
3.4.2 Meio líquido de EMJH.....	26
3.5. RECUPERAÇÃO DE LEPTOSPIRAS EM MEIO DE CULTIVO.....	27
3.6. TÉCNICA DE SOROAGLUTINAÇÃO.....	27
3.7. ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS.....	27
3.7.1 Determinação de intermediários reativos do oxigênio (H ₂ O ₂).....	28
3.7.2 Determinação de intermediários reativos do nitrogênio (NO).....	29
3.8 ENSAIO BIOLÓGICO PARA DETERMINAÇÃO DE TNF- α	29
3.9 DOSAGEM DE URÉIA E CREATININA.....	31
3.10. TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA (IMUNOPEROXIDASE) PARA DETERMINAÇÃO DE ANTÍGENOS DE LEPTOSPIRA.....	31
3.10.1- Obtenção do anticorpo primário.....	31
3.10.2 Controle de Especificidade.....	32
3.11 TÉCNICA HISTOLÓGICA DE HEMATOXILINA-EOSINA.....	33
3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34

4. RESULTADOS.....	36
4.1 RECUPERAÇÃO DE LEPTOSPIRAS VIÁVEIS.....	36
4.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-LEPTOSPIRA INTERROGANS SOROVAR POMONA.....	38
4.3 ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS.....	40
4.3.1 Determinação de Intermediários Reativos do Oxigênio (H ₂ O ₂).....	40
4.3.2 Determinação da produção de intermediários reativos do nitrogênio (NO).....	48
4.4 PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL- α (TNF- α).....	54
4.5 VALORES SÉRICOS DE URÉIA E CREATININA EM CAMUNDONGOS HIGH E LOW.....	57
4.6 IDENTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS LEPTOSPIRICOS EM TECIDO RENAL DE CAMUNDONGOS INFECTADOS PELA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA.....	59
4.7 HISTOPATOLOGIA (HEMATOXILINA-EOSINA).....	63
5. DISCUSSÃO.....	66
6. CONCLUSÕES.....	85
7. REFERÊNCIAS.....	87

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo principal avaliar a atividade de macrófagos e produção de anticorpos frente à infecção experimental pela *Leptospira pomona* em camundongos selecionados geneticamente para boa (H) ou má (L) resposta imune humoral. Para avaliar a atividade macrofágica foram utilizados ensaios para determinação de produtos intermediários do oxigênio e nitrogênio. Também foram investigados a produção de fator de necrose tumoral (TNF- α), anticorpos específicos, recuperação da leptospira nos rins e fígado, lesões histológicas através da técnica de hematoxilina-eosina e determinação de antígenos leptospiricos nos tecidos através da técnica de imunoistoquímica. Os resultados mostram que a linhagem L_{IV-A} apresentou menor recuperação do microrganismo nos compartimentos analisados. Entretanto, a linhagem H_{IV-A} a partir do 14º dia de infecção apresentou total contenção, embora a L_{IV-A} ainda tenha recuperado bactérias no fígado no 21º dia. A resposta imune contra o sorovar pomona nessas linhagens se caracterizou com produção elevada de anticorpos principalmente em períodos mais tardios do processo infeccioso. A produção de intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio também auxiliou na eliminação da *L. pomona* nas duas linhagens, sendo a produção de H₂O₂ importante fator nas linhagens H_{IV-A} e NO nas linhagens L_{IV-A}, principalmente nos períodos mais tardios pós-inoculação, o mesmo ocorrendo em relação ao TNF- α . Lesões renais mais intensas ocorreram em períodos em que houve maior número de leptospiros isoladas em meio de cultivo. Entretanto, na linhagem L_{IV-A} houve persistência de alterações teciduais mesmo em períodos em que não houve recuperação de leptospiros. A técnica de imunoistoquímica apresentou-se um pouco mais sensível em relação ao cultivo na detecção das leptospiros. Entretanto, ambas foram bons parâmetros de identificação do agente nessas linhagens. Os resultados sugerem que essas linhagens podem representar modelo importante para investigação da patogenia e resposta imune de animais contra os variados sorovares da leptospira.

Palavras-chave: Aspectos imunológicos; Camundongos Biozzi; Infecção experimental; *Leptospira* sorovar pomona; Macrófagos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the role of the macrophage activity and antibody production on experimental infection of *Leptospira pomona* in mice, selected genetically for high (H) or low (L) humoral immune response. To evaluate the macrophage activity, assays were used to determine oxygen and nitrogen intermediate reactives. Also was investigated the production of tumor necrosis factor (TNF- α), specific antibodies, recovery of leptospires in the kidneys and liver, histological lesions by hematoxylin-eosin technique and determination of leptospires antigens in tissues by immunohistochemistry. The results showed a smaller recovery of microorganism from the analyzed compartments to the L_{IV-A} lineage. However, the H_{IV-A} lineage showed total contention from the 14th day post-infection, although L_{IV-A} had still bacteria in the liver at 21th day post-infection. The immune response against pomona serovar in those lineages, was characterized as high production of antibodies, mainly in later periods of infectious process. The production of oxygen and nitrogen intermediate reactives, also contributed to *L. pomona* elimination for two lineages, being the H₂O₂ production an important factor in the H_{IV-A} lineage and NO in the L_{IV-A} lineage, mainly at the latest post-inoculation periods, the same occurring in relation to TNF- α . Intense renal lesions occurred at periods that were larger number of isolated leptospires by culture technique. Meantime, it had persistence of tissue alterations in the L_{IV-A} lineage, even at no leptospires recovery periods. The immunohistochemistry technique showed more sensitive in relation to the cultivation technique. However, both were good techniques to agent identification on those lineages. The results suggest those lineages could represent an important model to investigation of animal pathogenesis and immune response against the varied serovares of leptospires.

Index terms: Immunological aspects; Biozzi mice; Experimental infection; *Leptospira* serovar pomona; Macrophages.

*Para escrever só existem duas regras. Ter algo
a dizer e a coragem de dizê-lo.*

Oscar Wilde

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica, que acomete animais e o homem, causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*. A doença foi descrita pela primeira vez em 1880 no Cairo por Larrey, contudo foi Weil em 1886 que descreveu minuciosamente a doença, sendo denominada posteriormente de “Doença de Weil”.

A partir de 1950 se intensificaram os trabalhos sobre esta importante zoonose, como trabalhos de Santa Rosa principalmente em medicina veterinária¹.

O Gênero *Leptospira* compreendem atualmente treze espécies representadas pela *Leptospira interrogans*, *L. inadai*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. parva*, *L. weilii*, *L. fainei*, *L. alexanderi*, *L. meyeri*, *L. wolbachii* e *L. biflexa*. Contudo ainda não foram totalmente reconhecidas pelos subcomitês de classificação taxonômica para *Leptospira*^{2,3,4}.

Através de suas características aglutinogênicas já foram identificados mais de 200 sorovares distribuídos em 11 espécies e 23 sorogrupos⁵. Padrões biomoleculares relacionados a testes de DNA, RNA ribossômico e a reação em cadeia da polimerase (PCR) têm confirmado a diversidade genômica dos sorogrupos^{6,7}.

As leptospirosas são microrganismos helicoidais, aeróbios obrigatórios, flexíveis e móveis, medindo usualmente de 6-20µm de comprimento e cerca de 1µm de diâmetro e visíveis em microscopia óptica quando coradas, como também em microscópio de campo escuro ou de contraste de fase. Utilizam ácidos graxos, vitaminas B1 e B12 e álcoois como fonte de energia. As bactérias crescem bem em condições ótimas de pH entre 7,2 a 7,6, temperaturas entre 28 a 30°, com crescimento médio em sete dias, embora não seja indicado descarte do material com menos de oito semanas⁸.

A sobrevivência das leptospirosas depende de condições de temperatura, umidade e pH. Estes agentes são sensíveis a desinfetantes comuns, permanecem apenas por 30 minutos em solo seco. Entretanto, podem permanecer 180 dias em solo úmido, sobrevivem em água estagnada por longos períodos de tempo, sendo esta, fonte constante de transmissão⁸.

Os principais reservatórios são roedores, que podem eliminar e disseminar o agente por vários anos. Outros reservatórios importantes incluem caninos, bovinos, caprinos, ovinos, suínos e animais silvestres⁸.

A transmissão pode ocorrer de forma direta através do sangue, urina, tecidos e órgãos de animais infectados, ou por via indireta, através do contato com solo, alimentos e água contaminados com a urina dos animais portadores, constituindo a principal fonte de contaminação⁸. A penetração do agente ocorre na pele lesada ou íntegra. Após um período de incubação que varia entre quatro a dez dias, o agente é encontrado no sangue. Nesse período denominado leptospiremia, ocorre febre, depressão, dores articulares e posteriormente icterícia, hemoglobinúria e falha renal⁸.

A leptospirose é importante causa de abortos, natimortos e falhas reprodutivas principalmente em bovinos e suínos, sendo que o aumento da prevalência em seres humanos resulta de sua proximidade com animais infectados ou fontes de infecção⁹. A letalidade da leptospirose varia de acordo com a região geográfica, sorovar predominante, presença concomitante de outras enfermidades, estado imunológico do hospedeiro e quantidade de leptospirosas circulantes¹⁰, sendo o diagnóstico baseado na investigação clínica, epidemiológica e provas laboratoriais^{11, 12}.

Santa Rosa et al¹³ examinaram 808 amostras de soros humanos em sete regiões do estado do Amazonas com o objetivo de avaliar a prevalência da leptospirose sendo os títulos acima de 1:100 considerados positivos. Do total de soros examinados, cerca de 135 (16,7%) foram

reagentes, com a seguinte distribuição dos sorotipos: 45 (33,3%) *panama*, 23 (17%) para *grippotyphosa*, 19 (14%) *bataviae* e 12 (8,8%) *wolffi*, sendo as amostras restantes constituídas de outras cepas. Em relação à profissão dos indivíduos, a maioria era constituída por militares e indivíduos do sexo masculino. Tal fato se explica por estes indivíduos estarem mais expostos a condições ambientais que propiciam a permanência do agente. Os jovens entre 15 e 30 anos foram os mais acometidos, o que de acordo com outros autores comprova que a leptospirose é doença de adultos jovens. As populações das sete regiões amazônicas analisadas estão sujeitas a infecções diversas inclusive leptospirose devido às condições sanitárias precárias e presença de água em condições propícias (temperatura e estagnação) para o desenvolvimento do agente.

A leptospirose apresenta certa adaptação a hospedeiros, sendo considerada em muitos casos espécie específica. Sorovares como *pomona* são adaptados a suínos e bovinos, enquanto *hardjo* ocorre mais freqüentemente em bovinos. Em cães o principal agente é a *L. canicola*, entretanto, ocasionalmente infecta bovinos, lobos e cervos. Em bovinos as epizootias se difundem rapidamente caracterizando-se por alta taxa de morbidade. Em epizootias de curso lento a taxa de infecção inaparente varia de um rebanho a outro. Em eqüinos, a ocorrência também está relacionada com incidência do sorovar predominante bem como adaptabilidade ao hospedeiro. Nos EUA são comuns infecções por *L. pomona* e na Europa pelos sorovares *hardjo*, *pomona* e *icterohaemorrhagiae*¹⁴.

Os mecanismos de patogenicidade, defesa do hospedeiro e imunidade protetora da *Leptospira* ainda permanece pouco conhecido, casos de doença fatal podem alcançar valores de até 25% e o conhecimento a cerca dos mecanismos de defesa do hospedeiro pode auxiliar no tratamento mais efetivo e prevenção da doença¹⁵.

A patogenicidade dos sorotipos da *Leptospira* estão relacionados à adaptabilidade do agente ao hospedeiro, envolvendo mecanismos intrínsecos que permitem sua penetração,

multiplicação e permanência nos tecidos. Toxinas como a esfigomielinase produzida pelo sorovar pomona, exibem fatores de patogenicidade que acarretam alterações histopatológicas e estimulam a presença de infiltrados inflamatórios⁴. Alterações celulares decorrentes da presença da *Leptospira* em tecidos de eleição do agente como rins e fígado, podem ser visualizadas através da prova de Hematoxilina-Eosina. Nos rins, os túbulos distais e proximais podem se apresentar dilatados em presença de edema intersticial proeminente, sobretudo na junção córtex-medula. Presença de nefrite geralmente está associada a infiltrados inflamatórios que incluem linfócitos, histiócitos, células plasmáticas, células mononucleares e neutrófilos¹⁶.

Soros provenientes de pacientes humanos apresentando falha renal demonstraram variados graus de supressão na resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico em resposta a variados sorovares^{17,18}.

Os hamsters e as cobaias são os animais de laboratório mais indicados para o isolamento e estudos a cerca de infecções por leptospiros^{19, 20,21,22,23}. Entretanto, outros modelos experimentais vêm sendo investigados quanto ao comportamento dessa enfermidade, entre eles o camundongo. Estes animais geralmente manifestam sinais clínicos e apresentam leptospiremia por um período de dois a três dias pós-infecção, e em alguns casos insuficiência renal no sétimo dia de inoculação. Entretanto, tais alterações são dependentes do sorovar infectante²⁴.

Em hamsters as lesões geralmente se apresentam nos rins como degeneração hialina, marcada hiperemia e nefrite intersticial aguda^{25,19}

Modelos murinos têm sido utilizados para avaliar e definir perfis de função renal em presença de lesões teciduais, sendo a análise de creatinina considerada o método mais utilizado para este propósito, embora os valores possam variar conforme a metodologia empregada²⁶. Em camundongos apresentando quadro caracterizado por falha renal, proveniente de processos vasculares isquêmicos, podem ser detectados níveis elevados de creatinina (1.52 ± 0.30 mg/dl),

retornando a índices considerados basais (0.55 ± 0.03) após término do processo isquêmico²⁷. Níveis de uréia também podem se encontrar elevados em processos que envolvam déficit de excreção de metabólitos por mecanismos de excreção renal ineficiente. Entretanto níveis séricos de uréia elevados (102.4 ± 13) podem não ser indicativo de falha renal aguda, visto que outros processos podem estar envolvidos no aumento sangüíneo desses metabólitos do nitrogênio²⁸.

Quadros de insuficiência renal aguda ou crônica em camundongos, devido à formação de cistos renais²⁹, nefropatias decorrentes da presença de citocina IL-4 associada à Ig-A nefropática³⁰ e devido à intoxicação experimental por veneno de cobra³¹ podem resultar em níveis elevados de uréia e creatinina, cujos valores podem estar quatro vezes acima de parâmetros considerados normais. Em animais que apresentaram falha renal com níveis de uréia em torno de 40-80mg/dL, a filtração glomerular foi reduzida em 46%. Entretanto, este percentual não interferiu na recuperação da função renal após a retirada do estímulo. Apesar de alterações teciduais e funcionais, os níveis de creatinina se encontravam normais³².

O diagnóstico da leptospirose animal deve estar relacionado com os aspectos clínicos e epidemiológicos, juntamente com os resultados de provas laboratoriais. Enquanto as provas laboratoriais podem auxiliar o clínico a avaliar o quadro, emitir prognóstico sobre a evolução da doença, e analisar a eficiência da terapia instituída, a confirmação da doença baseia-se na detecção do agente ou de anticorpos específicos produzidos pelo hospedeiro contra o microrganismo invasor^{11,12}. A aglutinação microscópica com antígenos vivos é o procedimento mais utilizado na rotina diagnóstica, para detecção de anticorpos em animais e no homem. Alguns autores^{33, 34} avaliaram testes como a hibridização do ácido nucléico, imunofluorescência e cultivo na identificação de *L. hardjo* em urina de bovinos, e observaram que o cultivo apresentou resultados inferiores quando comparado às outras técnicas, este fato pode estar relacionado à

necessidade de agentes viáveis na amostra analisada em quantidades suficientes para se obter material para o isolamento mesmo após diluições, que são necessárias para diminuir a ocorrência de microrganismos oportunistas.

Técnica que alia a anatomia, imunologia e bioquímica, a imunohistoquímica tornou-se recurso diagnóstico para a identificação de antígenos. Empregando anticorpos específicos e marcadores enzimáticos ou substâncias fluorescentes³⁵, apresenta-se como uma técnica essencialmente qualitativa, pois seu objetivo é o encontro do antígeno nos tecidos e células³⁶. Métodos imunoistoquímicos empregando conjugados com peroxidase com objetivo de localizar topograficamente leptospiros em impressões de tecidos ou cortes histológicos bem como em esfregaços provenientes de cultivos, têm sido bastante utilizados tanto em pesquisas a campo como em estudos experimentais, demonstrando resultados bastante satisfatórios^{37,38,39}. Dentre as diversas enzimas que podem ser utilizadas nos conjugados, a peroxidase parece ser a mais eficiente, devido ao seu baixo peso molecular, que permite sua penetração na célula sem maiores danos como também a estabilidade dos complexos imune formados. Essas preparações podem ser armazenadas por diversos meses a uma temperatura de 4°C ou por tempo indefinido quando em congelamento sem perda de sua atividade. Não há necessidade de microscópio de luz ultravioleta para o exame e as estruturas podem ser facilmente identificadas e fotografadas, em microscopia comum ou eletrônica^{40,41,42}.

Ellis et al⁴³ trabalhando com amostras de tecidos renais suínos, verificaram que das 18 amostras renais positivas para o cultivo, 17 (94,4%) foram positivas também para a imunoperoxidase em cortes e 4 (22,2%) nas impressões. A baixa positividade nesta última foi justificada pela distribuição ao acaso das leptospiros nos túbulos, o que dificulta em alguns casos a visualização em tecidos fixados que concentram poucas leptospiros. Além disso, os tecidos

tendem a se apresentar de forma íntegra quando processados em cortes. Todas as amostras provenientes de animais controle negativos não infectados, bem como amostras pré-absorvidas com leptospiros não reagiram à prova imunohistoquímica. Alves et al¹ detectaram através da peroxidase, leptospiros em cortes de tecidos renais com 100% de positividade em animais experimentalmente infectados. Em algumas espécies animais e no ser humano, a aplicação desta técnica em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina, pode ser um importante instrumento para o diagnóstico da leptospirose, em biópsias ou materiais de necropsia submetidos rotineiramente à histopatologia ^{43,44}.

Scanziani et al ⁴⁵, comparando a imunoperoxidase e o cultivo na detecção de leptospiros em rins de suínos na fase crônica da enfermidade verificaram que a sensibilidade e especificidade na imunohistoquímica foi de 78% e 100% respectivamente, sendo tais resultados superiores ao cultivo. Os autores relacionaram maior eliminação das leptospiros à presença de reação inflamatória nos tecidos que possibilitou a ocorrência de resultados falso negativos.

A presença de anticorpos aglutinantes em animais infectados, nem sempre está associada ao isolamento do agente em meios de cultivo, o que pode estar relacionado à não sensibilidade do meio de cultivo ou quantidade insuficiente de microrganismos para o isolamento ⁴⁶.

A proteção contra infecção leptospírica envolve diferentes fatores, como anticorpos específicos e sistema complemento. Os anticorpos parecem ser os responsáveis pela eliminação do agente nos primeiros momentos pós-infecção, quando a doença progride da fase septicêmica para a fase tóxica tecidual ⁴⁷. As imunoglobulinas do tipo IgM são inicialmente sintetizadas entre 24 à 72hs pós-infecção, sendo produzida a seguir IgG que possibilita a remoção das leptospiros circulantes através da opsonização, no entanto o agente pode persistir nos rins e trato reprodutivo ^{48,49}.

Mecanismos de resistência ao hospedeiro e capacidade de sobrevivência da *Leptospira* são ainda pouco conhecidos⁵. A presença de lesões teciduais e gravidade do quadro clínico têm sido relacionados à formação de complexos imunes estimulando a via clássica do complemento⁵⁰. Adler & Faine⁵¹ infectaram experimentalmente camundongos Balb/c com leptospiros do sorovar pomona avaliando resistência ou suscetibilidade em presença de ciclofosfamida, um potente imunossupressor. Todos os camundongos tratados apresentaram manifestações clínicas e lesões compatíveis com o quadro infeccioso, sendo que as leptospiros foram isoladas dos animais em todos os períodos analisados. Em animais infectados que não receberam droga imunossupressora, foram encontradas leptospiros até o terceiro dia pós-inoculação. Os autores sugerem que células formadoras de anticorpos estejam presentes na circulação, 24 a 48 horas após infecção. Mesmo com altas doses de inóculo contendo leptospiros patogênicas a opsonização das bactérias circulantes, evita que haja tempo suficiente para que ocorram maiores danos aos tecidos, impedindo desta forma, a adaptação do agente em órgãos de eleição como rins e fígado. Animais que obtiveram resposta imune prévia, por imunidade pós-infecção natural ou experimental, apresentam maior capacidade de recuperação que animais com primo infecção⁵².

Animais que sobrevivem a infecção natural apresentam fagócitos que retiram gradualmente as leptospiros dos tecidos e fluídos como em áreas hemorrágicas e áreas onde há reação inflamatória ou recuperação. Entretanto, algumas leptospiros patogênicas podem escapar da fagocitose, mesmo em presença de resposta imune específica²⁴.

Antígenos do envelope bacteriano parecem ser o principal alvo do sistema anticorpo-complemento. O anticorpo associado ao complemento resultou na presença de infiltrados inflamatórios, linfocitose e degranulação de neutrófilos em tecidos de hamsters infectados^{51, 53}. O sistema complemento foi ineficiente em estimular células fagocitárias, quando esse não se

encontrava associado ao soro imune-específico frente a alguns tipos de sorovares patogênicos de leptospiros^{54,55}.

Diversos trabalhos priorizam a participação da resposta humoral na leptospirose. Entretanto, é necessário avaliar a presença do sistema imune celular e fagocitário, com ênfase na participação de macrófagos, células T e citocinas na eliminação do agente em tecidos e fluidos. A atividade macrofágica parece ser eficiente contra vários antígenos leptospíricos, demonstrando alta capacidade de fagocitose em diferentes tecidos de camundongos imunizados e não imunizados. Em relação à resposta imune inata é importante destacar trabalhos que demonstraram que ativação de macrófagos por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) foi dependente da presença dos receptores TolL-like 2 e linfócitos CD4⁵⁶

Em células hepáticas de camundongos inoculados com LPS da *Leptospira hebdomalis* e *copenhageni*, foram observadas necrose do tipo multifocal, congestão e trombose presente em sinusóides, sendo estas alterações associadas à presença de macrófagos e complexos imune formados durante a infecção. O fenômeno de lesão celular aparece em outros órgãos como pele, pulmão e trato digestivo. A miocardite tem relação direta com o processo inflamatório em presença de histiócitos, linfócitos e plasmócitos^{57,58}. O agravamento das lesões também pode estar associado à presença de metabólitos reativos do nitrogênio como óxido nítrico (NO)⁵⁹.

Banfi et al⁴⁷, avaliando o comportamento de cepas virulentas PB-3 (*copenhageni*) e saprófita *Isola sacra* I, observaram que houve inibição do agente em meios de cultivo e fagocitose com formação de vacúolos quando anticorpos homólogos (IgG) estavam associados à presença de macrófagos após 60 minutos de incubação. Antígenos lipopolissacarídeos parecem estar associados à ativação de macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares em presença de anticorpos específicos^{60,61,62}.

A presença de peptidoglicano (PG) da leptospira parece exercer importante efeito biológico na ativação do complemento, ativação de células mononucleares, e adesão de células endoteliais, essas últimas envolvidas em alterações vasculares que ocorrem no início da infecção⁶³. Estudos de Cinco et al,⁶⁴ avaliando a atividade bactericida e fagocitária de macrófagos em cobaias experimentalmente infectadas, observaram que essa atividade parece ser ineficiente nas primeiras horas pós-infecção. Os autores observaram em microscopia eletrônica que 30% da *Leptospira Isola sacra* I e PB-3 (sorovar copenhageni), se localizavam no interior de macrófagos, sem alteração estrutural do microrganismo. Os autores sugerem que mecanismos de controle mediados por células mononucleares podem ser ineficientes em infecções por leptospiros, principalmente no início da infecção, fato pode estar associado à capacidade de escape do metabolismo oxidativo de macrófagos.

Trabalhos de Cheville et al⁶⁵, utilizando suínos experimentalmente infectados com o sorovar pomona, bem com em trabalhos referindo-se a modelos murinos e ao homem⁵⁸, sugerem que as leptospiros podem sofrer alteração estrutural quando no interior de macrófagos. Alguns autores^{57,66} estudando a resposta de macrófagos a antígenos de parede da *Leptospira hebdomadis* e *copenhageni* em camundongos Balb/C infectados experimentalmente, observaram que em concentrações variadas do antígeno, macrófagos ativados se apresentavam em grande número no fígado, baço e linfonodos. Essa atividade pode estar presente, mesmo na ausência do soro imune e complemento, embora seja menos efetiva. Trabalhos de Tu et al⁶⁷, referem que nas primeiras 24 horas pós-exposição de macrófagos às leptospiros patogênicas não ocorre fagocitose eficiente. Entretanto, aproximadamente 95% de macrófagos continham leptospiros quando soro hiperimune estava presente. Desta forma, a resistência de camundongos às leptospiros não se deve apenas a fagocitose, visto que esta só é eficiente na presença de anticorpos opsonizantes.

Células fagocitárias como macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, respondem com “burst oxidativo” a patógenos como *Toxoplasma gondii*, *Trypanossoma cruzi*, *Leishmania spp*, *Candida spp* e Micobactérias. O burst é caracterizado por aumento no oxigênio, sendo este reduzido a anion superóxido (O_2^-) utilizando nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) ou Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P (NADPH) como doadores de elétrons. O ânion superóxido (O_2^-) é convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sob ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Segundo Los et al⁶⁸ produtos resultantes do “burst oxidativo” podem destruir células fagocitadas em meio intra e extracelular, induzir a expressão de citocinas e moléculas de adesão, entre outras funções. Os autores sugerem que a atividade microbicida esta associada à presença e liberação de peróxido de hidrogênio. Entretanto, outros metabólitos podem estar associados aos mecanismos de controle oxidativos como oxigênio, ânion superóxido e radicais hidroxila.

A atividade dependente de oxidação realizada por macrófagos pode ser estimulada em presença de estímulos como PMA, Zymosan, ConA, ésteres de ácidos graxos e citocinas como IFN- γ , TNF- α e GM-CSF e assim, determinadas por ensaios in vitro. Métodos colorimétricos para detecção de reativos do oxigênio e nitrogênio são de menor custo quando comparados às técnicas que utilizam fluorescência sendo que grandes números de amostras podem ser avaliados simultaneamente⁶⁹.

Macrófagos peritoneais possuem alta capacidade de gerar o “burst oxidativo” mesmo na ausência de citocinas⁷⁰. Aumento nos níveis de H_2O_2 em presença de IFN- γ natural e recombinante resultou em elevada atividade bactericida por macrófagos peritoneais e alveolares de seres humanos e camundongos em presença de *Toxoplasma gondii*⁷¹, *Leishmania major*⁷², *Coccidioidis imminits*⁷³, *Trypanossoma cruzi*^{74,75} e *Salmonella typhimurium*⁷⁶ assim como em

presença de IFN- γ e TNF- α associados a PMA⁷⁷. Efeitos decorrentes da associação dessas citocinas parecem ser aditivos, pois não há interferência nem inibição quando ambas estão presentes na modulação da resposta imune, ocorrendo sinergismo de ação destas citocinas.

Formas amastigotas (intracelulares) e promastigotas (extracelulares) da *Leishmania donovani*, parecem ser susceptíveis a presença de intermediários do oxigênio. Entretanto, parece que a atividade microbicida desses metabólitos só permanece por períodos longos (dias) quando estimulados por citocinas. A presença de catalase, um inibidor do metabolismo do oxigênio, acarreta perda parcial da atividade microbicida de macrófagos⁷⁸.

Alguns autores referem que IFN- γ parece ser mais ativo que o IFN- β na ativação de células fagocitárias⁷⁹. Buchmüller-Rovillerr & Mauël⁸⁰, referem que macrófagos de camundongos suscetíveis a infecções por agentes como *Leishmania*, possuem baixa atividade microbicida apresentando déficit na oxidação de glicose resultando em níveis reduzidos de metabólitos reativos do oxigênio. Entretanto, presença de LPS e citocinas auxiliaram na atividade bactericida, sendo que o “burst oxidativo” sozinho é incapaz de eliminar ou controlar a difusão do agente. Macrófagos de camundongos previamente imunizados com *T. cruzi* parecem liberar maior quantidade de H₂O₂ em presença de PMA, quando em contato com tripanossomas inativados⁸¹. Os resultados são similares a outros estudos que avaliaram ativação fagocitária e fungicida de macrófagos alveolares frente ao *Paracoccidioides brasiliensis* sendo observada produção de reativos do oxigênio por até 16 semanas em linhagens de camundongos resistentes à infecção⁸².

Estudos relataram que macrófagos são capazes de produzir valores acima de 8 nM de H₂O₂ durante cinco minutos em meio extracelular, capacidade produtiva similar à produzida por

células polimorfonucleares. Alterações na produção de H_2O_2 em tecidos ou fluidos, podem ser resultantes de diferenças no catabolismo ou distribuição deste metabólito nos tecidos⁸³

Murgia et al⁸⁴ verificaram a sensibilidade “in vitro” de leptospiros patogênicas e saprófitas contra mecanismos bactericidas dependentes de oxigênio. Leptospiros saprófitas (*L. patoc* 1) e patogênicas (*L. hardjo*) foram sensíveis a 0,33 nM de H_2O_2 em presença ou ausência de mieloperoxidase (MPO). Outras leptospiros como *L. icterohaemorrhagiae*, *L. copenhageni* e *L. australis* também apresentaram sensibilidade em presença de produtos intermediários do oxigênio.

Intermediários do nitrogênio como óxido nítrico, nitrato e ácido nitroso produzidos por macrófagos sob variados estímulos possuem elevada atividade microbicida, auxiliando no controle de infecções por mecanismos oxidativos⁸⁵. O Óxido nítrico (NO) é um radical instável livre, possuindo atividade pleiotrópica intracelular, atuando no relaxamento do endotélio, como neuro modulador. Em mecanismos de defesa do sistema imune, são produzidos por células endoteliais, trombócitos, macrófagos, monócitos vasculares e cardíacos, hepatócitos etc⁸⁶.

Macrófagos metabolizam L-arginina para produção de NO, nitrato (NO_3) e L-citrulina. Altos níveis de NO estão relacionados à elevada atividade de macrófagos em meio de cultivo. Dosagens elevadas destes intermediários do nitrogênio podem inibir citocinas como IL-3, onde a relação inibição de IL-3 e produção de IFN- γ é importante na citotoxicidade de macrófagos contra parasitas intracelulares como *Leishmania*⁸⁷. Parasitas como *Mycobacterium bovis* e *Leishmania spp* são controlados por mecanismos dependentes de L-arginina, estimulando produção de intermediários do nitrogênio, cujos efeitos incluem perda intracelular de ferro afetando microrganismos que dependem deste metal para realizar sua multiplicação. Parasitas de multiplicação extracelular como *Schistosoma mansoni* também são controlados por mecanismos

dependentes de L-arginina, sendo que o NO possui meia vida curta sendo rapidamente oxidado a NO_2^- (nitrito) e NO_3^- (nitrato), permanecendo no sobrenadante de cultivos celulares⁸⁸.

O NO parece apresentar efeitos sinérgicos quando associado ao IFN- γ ou peróxido de hidrogênio, resultando em destruição da molécula de DNA do parasita. A molécula de NO, por ser de pequena dimensão e lipofílica possui boa capacidade de interagir com alguns microrganismos e provocar sua destruição⁵⁹.

Culturas de células renais de camundongos quando incubados com proteínas da membrana externa (LipL32) de leptospiros patogênicas, podem estimular até nove vezes mais intermediários do nitrogênio em relação às células normais. Esse extrato proteico parece estimular a produção de TNF- α por monócitos. Os túbulos proximais são um dos principais locais de produção de óxido nítrico, participando nos eventos pró-inflamatórios presentes nos tecidos renais⁸⁹.

A produção de macrófagos pode ser suprimida em presença de NO como mecanismo de controle dessas células, restringindo também a expressão de linfócitos T em presença de citocinas como IFN- γ , enquanto que, efeitos imunossupressores associados ao H_2O_2 são expressos durante proliferação de células B⁹⁰.

As citocinas são mediadores protéicos que participam de mecanismos de interação entre o sistema imune específico e inespecífico, ativação de outras citocinas, expressão de enzimas, efeitos citostáticos e citolíticos e remodelação da matriz extracelular entre outras funções^{91,92,93,94}. Estudos demonstram que bactérias patogênicas como a *Borrelia burgdorferi* podem estimular a produção de interleucina (IL-1). A presença desta citocina, entretanto, pode ser uma das causas de lesões artríticas em tecidos bovinos e no ser humano que apresentam artrite por

Doença de Lyme. Em ambos os casos, com o agente vivo ou inativado pelo calor, foi possível observar grande liberação de IL-1 por macrófagos⁹⁵.

Em hospedeiros imunossuprimidos e infectados pelo *Mycobacterium avium* a presença de TNF- α e IL-6 parece estar associada à inibição do crescimento intracelular e redução do parasitismo em macrófagos⁹⁶

Tabel et al⁹⁷ avaliando a presença de *Trypanosoma spp* em camundongos Balb/c e C57BL/6 observaram maior resistência dos camundongos C57BL/6 frente a antígenos, e relacionaram esse fato a níveis mais elevados de IL-4, IFN- γ e IL-10 em plasma e sobrenadante de células esplênicas, embora o grau de parasitemia fosse o mesmo nas duas linhagens.

Isogai et al,⁹⁸ utilizando camundongos experimentalmente inoculados com lipopolissacarídeo (LPS) da *Leptospira* sorovar hebdomadis, verificaram que o estímulo antigênico aumentou a produção e expressão de marcadores específicos de superfície CD5, CD8, além de elevadas concentrações séricas de IL-1- α , IL-6 e TNF- α . Níveis séricos de TNF- α permaneceram elevados (14336 ± 6133 pg/mL) nas primeiras horas pós-infecção. O LPS foi capaz de induzir principalmente, a apoptose de células linfóides esplênicas.

Estudos sobre a infecção por *Leptospira* em seres humanos, indicam que células mononucleares do sangue periférico parecem exibir perfil de citocinas do tipo Th1, com maior produção de citocinas IL-2, IL-6 e TNF- α , além de níveis elevados de IFN- γ ⁹⁹

Algumas citocinas da classe TNF são sintetizadas por linhagens de células como macrófagos, astrócitos, células da microglia, células de Kupffer e linfócitos. Sua síntese é induzida por produtos bacterianos como endotoxinas, além de antígenos virais e fúngicos. O TNF pode atuar em conjunto ao IFN- γ na atividade citolítica e citotóxica, sendo que sua identificação pode ser realizada através de ensaios biológicos. Os ensaios biológicos são testes baseados na

proliferação de células em presença de citocinas como TNF- α , provenientes de soros ou suspensões celulares e incluem metodologias como a contagem direta ou métodos indiretos como os radioativos ou coloração através do vermelho neutro¹⁰⁰. Embora esses testes não sejam efetivamente específicos, pois outras citocinas podem reagir de forma cruzada, em geral são muito sensíveis, sendo técnicas de fácil manipulação e baixo custo⁹¹. Alguns trabalhos avaliando a presença de citocinas como TNF- α e IL-6 através de bioensaios observaram a ausência do TNF- α em cultivo celular, indicando que esse fato pode estar relacionado à produção de TNF inativo ou devido à rápida metabolização desse peptídeo pelas células¹⁰¹. Entretanto, em outros estudos na análise da liberação de TNF- α , em macrófagos hepáticos de cobaias infectados com a *Leptospira* sorovar icterohaemorrhagiae verificou-se que houve alta produção de desta citocina (>75 pg/ml) quando comparados aos controles¹⁰².

A integridade do hospedeiro quando exposto a determinados antígenos está relacionada à capacidade em estimular ou não o sistema imune de forma eficiente. Com o objetivo de avaliar experimentalmente tal comportamento, animais de laboratório geneticamente selecionados para a boa ou má resposta imune vêm sendo utilizados para o estudo de várias infecções por parasitas de multiplicação intra e extracelular.

Linhagens de camundongos geneticamente selecionadas foram inicialmente desenvolvidas por Biozzi et al¹⁰³, para o estudo da caracterização dos mecanismos reguladores dos fenômenos que participam da resposta imunológica. Este modelo foi obtido através da seleção genética bidirecional de camundongos bons (H) e maus respondedores (L) para produção de anticorpos contra antígenos naturais complexos por período de 15 a 20 gerações até que máxima divergência na resposta imune humoral fosse obtida. A seleção modificou a resposta não apenas do antígeno selecionador, mas sobretudo a outros não correlacionados¹⁰⁴. A alta ou a baixa capacidade de

resposta resulta do efeito aditivo de alelos localizados em vários loci independentes (controle poligênico), acumulados progressivamente nos animais H e L durante o processo seletivo. Essas linhagens homozigotas representam fenótipos extremos encontrados em populações naturais heterogêneas. Estima-se que entre sete a 10 loci contribuem para as diferenças na resposta de anticorpos entre as linhagens H e L. Essas linhagens sob o ponto de vista genético são mais complexas imunologicamente que linhagens isogênicas, que diferem apenas em um alelo.

A partir de colônias de camundongos albinos outbreed, foram descritas cinco seleções. As seleções I e II foram desenvolvidas no laboratório de imunogenética do Instituto Curie de Paris em resposta a estímulos antigênicos provenientes de eritrócitos heterólogos (carneiro e pombo). As seleções III e IV foram desenvolvidas na Seção de Imunologia do Instituto Biológico de São Paulo de acordo com resposta secundária aos antígenos flagelar e somático, respectivamente, de duas espécies de *Salmonella* antigenicamente distintas, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella oranienburg*. A seleção V foi desenvolvida no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Escola Paulista de Medicina segundo resposta secundária às proteínas albumina bovina (BSA) e gamaglobulina de coelho (RGG). Os parâmetros imunogenéticos obtidos nas seleções de I a V foram muito semelhantes, apesar das diferentes populações iniciais, natureza dos antígenos e processos de imunização. As linhagens diferiram em características imunológicas importantes, e em seu efeito multiespecífico¹⁰⁵. Na análise deste efeito multiespecífico foram escolhidos grupos de imunógenos antigenicamente distintos, mas de natureza semelhante àqueles empregados nos vários processos seletivos, ou seja, eritrócitos heterólogos, bactérias, proteínas heterólogas e conjugados haptênicos. Este efeito foi mais amplo nas seleções I, II e III, ou seja, a diferença entre o comportamento das linhagens H e L foi semelhante à obtida com os antígenos de seleção. Entretanto foi restrito nas linhagens IV e V. Destacando-se os animais H_{IV} e L_{IV} que não diferiram na resposta a eritrócitos de carneiro (SE) e eritrócitos humanos (HE)¹⁰⁶.

Isso sugere que os acasalamentos seletivos baseados na resposta secundária ao antígeno somático de *Salmonella* não afetaram a resposta aos eritrócitos heterólogos e, portanto os alelos de efeito “bom” ou “mau” respondedor estão distribuídos aleatoriamente nas linhagens.

Para demonstrar essa hipótese, procedeu-se o acasalamento seletivo de bons e maus respondedores para SE e HE a partir de segregantes F2 da seleção IV por várias gerações. Esse processo seletivo deu origem à seleção IV-A e quando o limite de seleção para SE e HE foi atingido, as linhagens H_{IV-A} e L_{IV-A} não se diferenciaram mais quanto à resposta ao antígeno somático de *Salmonella*.¹⁰⁷.

Apesar das diferentes populações originais e pressões ambientais distintas a que foram submetidas às seleções I e IV-A, foi verificada notável semelhança entre os parâmetros genéticos das seleções, nas quais eritrócitos heterólogos foram os antígenos selecionadores. A seleção IV-A passou a apresentar um efeito multiespecífico muito superior aos da seleção IV, da qual se originou, e muito próximo ao da seleção I, excetuando-se a resposta a antígenos somáticos de *Salmonella*, em que as linhagens H_{IV-A} e L_{IV-A} apresentaram produção de anticorpos idêntica. Alguns estudos foram realizados para verificar se a expressão dos genes acumulados no processo seletivo induziu modificações na atividade de outras células além de linfócitos B.

Alguns trabalhos sugerem que não houve diferenças ao nível de resposta celular a enxertos de pele ¹⁰⁸, reação de enxerto versus hospedeiro ¹⁰⁹ e resposta proliferativa de linfócitos ativados *in vitro* por mitógenos ^{110,111}. Entretanto, quando a ativação de linfócitos T é dependente de apresentação de antígenos por macrófagos, a resposta da linhagem H tem se mostrado mais elevada, tanto na seleção I como na IV-A ^{112,113}. Na Seleção I, o *burst* respiratório, avaliado pela produção de ânion superóxido ou de peróxido de hidrogênio, mostrou-se mais elevado na linhagem H. Apenas a produção de IL-1 mostrou-se semelhante nas duas linhagens ¹⁰⁴. A atividade catabólica de macrófagos parece ser mais elevada em linhagens L das seleções I, II e

IV-A em relação às linhagens H^{114,115,116}, sugerindo que este rápido metabolismo possa impedir que macrófagos exibam determinantes antigênicos de forma adequada, resultando em resposta imune humoral menos eficiente¹¹⁷.

Algumas infecções têm sido estudadas utilizando modelos experimentais H e L, com ênfase na resistência das linhagens H em infecções extracelulares como, por exemplo, *Trypanosoma cruzi*^{118,104} e *Klebsiella pneumoniae*¹¹⁹, ou maior resistência das linhagens L contra patógenos intracelulares como *Yersinia pestis*, *Leishmania tropica*¹¹⁵. Alguns autores referem que a maior resistência de camundongos L a alguns tipos de infecções pode estar relacionado ao aumento na produção de TNF- α , nem sempre estando associada a aumento na atividade de macrófagos¹⁰⁴.

Diversos trabalhos priorizam a participação da resposta humoral na leptospirose. Contudo é necessário analisar a participação de células T e macrófagos, sobretudo na eliminação do agente em tecidos e fluidos bem como, na patogênese das lesões presentes em órgãos e tecidos. Alguns trabalhos referentes à análise de mecanismos envolvidos na patogênese e resposta imune a leptospirose, vêm sendo aplicados a diferentes modelos experimentais. No presente estudo foram utilizadas linhagens de camundongos geneticamente selecionados para a produção quantitativa de anticorpos, visto que estes apresentam diferentes fenótipos na expressão de células B, bem como modificações na atividade metabólica de macrófagos. Embora o mecanismo de defesa na leptospirose seja principalmente mediado por anticorpos, a participação de macrófagos é determinante no processo de resistência do hospedeiro, tornando-se interessante analisar seus mecanismos de ativação nas linhagens geneticamente selecionadas, as quais representam fenótipos extremos encontrados em uma população naturalmente heterogênea.

*O mais importante na vida não é a
situação onde estamos, mas a
direção para a qual nos movemos.*

O. W. Holmes

Objetivos

2. OBJETIVOS

Esse trabalho teve por objetivo principal, avaliar o estado de ativação de macrófagos, produção de anticorpos e o curso da infecção experimental com a *Leptospira* sorovar pomona em camundongos geneticamente selecionados para a boa e má resposta de anticorpos (seleção IV-A).

2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Durante os procedimentos experimentais foram avaliados os seguintes parâmetros:

1. Recuperação do sorovar pomona, a partir de rins, fígado e pulmão das linhagens selecionadas.
2. Detecção de anticorpos específicos em camundongos da seleção IV-A após infecção por *Leptospira* sorovar pomona.
3. Determinação da atividade de macrófagos peritoneais, esplênicos e pulmonares, através da dosagem de intermediários reativos do oxigênio (H_2O_2) e nitrogênio (NO) em animais infectados e controles.
4. Pesquisa da citocina $TNF-\alpha$ em soros e homogenatos de células esplênicas, pulmonares e hepáticas em animais infectados e controles.
5. Avaliação da função renal através da análise dos níveis séricos de uréia e creatinina nas linhagens de camundongos infectados e controles.
6. Identificação de leptospiros em tecidos renais provenientes de camundongos da seleção IV-A infectados experimentalmente com o sorovar pomona pela técnica imunoistoquímica (imunoperoxidase).

Analise histopatológica de alterações celulares em tecidos renais de camundongos da seleção IV-A infectados com a *Leptospira* sorovar pomona.

*Nossas vidas são teidas pelo
mesmo fio de nossos
sonhos.*

Willian Shakespeare

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

3.1.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos machos das linhagens High e Low da seleção IV-A com quatro a oito semanas de idade (desenvolvidos no Departamento de Imunologia do Instituto Biológico de São Paulo) e mantidos no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências-IB- UNESP/Botucatu. Os animais foram distribuídos em grupos constituídos de 60 animais infectados com o sorovar pomona, sendo 30 animais pertencentes à linhagem IV-A para a boa resposta humoral (H_{IV-A}) e 30 animais pertencentes à linhagem IV-A para a má resposta humoral (L_{IV-A}). Controles negativos não infectados foram constituídos por 24 animais pertencentes às linhagens para boa (CH_{IV-A}) e má (CL_{IV-A}) resposta humoral.

3.1.2 Hamsters

Os hamsters de ambos os sexos (*Mesocricetus auratus*), obtidos do biotério central na UNESP de Botucatu foram utilizados com o objetivo de manter a virulência das cepas de leptospiros utilizadas como inócuo nos camundongos para a boa (High) ou má (Low) resposta humoral.

3.2 INÓCULO

Na infecção experimental em camundongos, foi utilizada cepa de *Leptospira interrogans* sorovar pomona identificada pela prova de absorção de aglutininas^{11,120}, e quantificada segundo técnica de Faine¹²¹ utilizando câmara hemocitométrica de Petroff-Hauser, estipulando valores em torno de 2×10^7 leptospiros /ml. Cada animal do grupo de animais infectados recebeu cerca de 1mL do inóculo por via intraperitoneal. As amostras foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos do laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

3.3. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Antes do sacrifício, os camundongos foram submetidos à anestesia por inalação leve de éter e em seguida, foi realizada sangria parcial com obtenção do sangue através de punção pelo plexo orbital. A utilização de barbitúricos como método anestésico não poderia ser utilizada nestes animais, devido à composição química do anestésico, que interferiria com os resultados obtidos nos testes para avaliar os níveis de uréia^{122,123}. Seis animais de cada grupo foram sacrificados de forma cronológica nos dias 4, 7, 14, 21, 28 e 35 pós-inoculação por deslocamento cervical. Após, foram realizadas lavagens peritoneais para obtenção de exsudato celular contendo macrófagos. Baço, rins, fígado e pulmões foram retirados e utilizados nos testes de recuperação de Leptospiros, atividade macrofágica, detecção de TNF- α por ensaio biológico e técnicas histológicas de Hematoxilina-Eosina e Imunoistoquímica.

Os hamsters foram inoculados com o sorovar pomona e após a fase agônica ou a aparecimento dos sintomas clínicos, os animais foram mortos através de dose excessiva de pentobarbital sódico a 27 mg/kg de peso. Após, os rins e fígado e foram cultivados através da técnica de pipeta Pasteur, sendo o meio de cultivo observado por um período de até oito semanas com o objetivo de monitorar o crescimento das leptospiros que seriam utilizadas como inóculo. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (Protocolo-383/2004).

3.4 MEIOS DE CULTURA

3.4.1 Meio Semi-Sólido de Fletcher

Utilizado no preparo de inóculos e recuperação bacteriana, o meio foi preparado de acordo com as normas do laboratório fabricante (DIFCO Laboratories) e submetido a testes de esterilidade e crescimento ¹¹.

3.4.2 Meio líquido de EMJH

Este meio foi utilizado para repique ou passagem de cultivos de *Leptospira* que se desenvolveram em meio de Fletcher, com a finalidade de obtenção de meio que possibilitasse a contagem de leptospiros para se obter a concentração necessária à inoculação dos camundongos.

Os meios foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Hélio Langoni do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP.

3.5. RECUPERAÇÃO DE LEPTOSPIRAS EM MEIO DE CULTIVO

Com o objetivo de avaliar o grau de infecção pela leptospira, fragmentos de rins, fígado e pulmões dos animais infectados foram submetidos ao cultivo e isolamento através de técnica de diluições seriadas, segundo trabalhos de Santa Rosa ¹¹ e Passos et al ¹²⁰, sendo os controles representados por animais sadios.

3.6. TÉCNICA DE SOROAGLUTINAÇÃO

A pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* sorovar pomona foi realizada através da técnica de aglutinação microscópica em lâmina segundo técnica de Faine (1982)¹²¹ em soros obtidos dos camundongos controle e infectados.

3.7. ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS

Após o sacrifício, os animais foram mantidos em câmara asséptica de fluxo laminar e fixados em decúbito dorsal em suporte de dissecação. A parede abdominal foi exposta, rebatendo-se a pele da região. A seguir 10 ml de PBS (solução tampão fosfato pH 7,2) gelado foram injetados com o auxílio de seringa na porção mediana superior do abdômen. Posteriormente, a cavidade abdominal foi massageada e retirado líquido peritoneal com a seringa. Este procedimento foi repetido três vezes. Após, amostras do baço e pulmões foram retirados e maceradas a seguir adicionando-se PBS para obtenção de suspensões.. A suspensão abdominal e dos órgãos foram armazenadas em tubos de plástico, mantidos em banho de gelo e centrifugados ao final da colheita por 10 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, a suspensão celular foi ressuspendida em meio completo para cultura de células (MCCC). De cada suspensão peritoneal foram retiradas alíquotas de 50 µl que

foram acrescidos de uma solução contendo 0,45 ml de vermelho neutro a 0,02% e incubadas a 37°C durante 10 minutos para posterior contagem. Os macrófagos foram identificados pela incorporação do corante, contados em câmara de Neubauer e a concentração celular ajustada para 2×10^6 macrófagos/ mL de MCCC. Volumes de 0,1 ml da suspensão foram distribuídos em microplacas de cultura de fundo chato (Corning) para cultivo celular. Após o período de incubação de 2 horas a 37°C em tensão de 5% de CO₂, as células não aderentes foram retiradas por lavagem da placa com meio de RPMI 1640.

3.7.1 Determinação de intermediários reativos do oxigênio (H₂O₂)

A produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinada pelo método descrito por Pick e Keisari (1980)⁶⁹ e adaptado por Pick e Misel (1981)¹²⁴. Os macrófagos obtidos conforme descrição no item 3.7 foram incubados por 24 horas a 37°C em tensão de 5% de CO₂, na presença ou ausência de 250UI/mL de INF- γ recombinante (Genzyme) Após este período, os sobrenadantes das culturas foram coletados para dosagem de óxido nítrico (NO) e as células aderentes foram ressuspensas ao volume original (0,1mL) em solução de vermelho fenol contendo: 140 nM NaCL; 10 nM de tampão fosfato, pH 7; 5,5 nM de dextrose; 0,56 nM de vermelho fenol; 0,01 mg/mL de peroxidase raiz forte tipo II, e na presença ou ausência de estímulo acrescentando-se 1 μ g de Phorbol myristate acetato PMA (Sigma Chemical Co. USA) e incubados por uma hora a 37°C em câmara úmida e escura. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 0,01mL de NaOH 1N. A absorbância foi determinada em microleitor automático de ELISA (ensaio imunoenzimático- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), com filtro de 620nm. Os resultados

foram expressos em nanomols (nmoles) de $\text{H}_2\text{O}_2/2,0 \times 10^5$ células, a partir de curva padrão estabelecida em cada ensaio. Sendo que os ensaios foram realizados em quadruplicata.

3.7.2 Determinação de intermediários reativos do nitrogênio (NO)

O óxido nítrico (NO) se decompõe em nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) em meio de cultura. A produção de NO_2^- pelo cultivo de macrófagos, foi avaliada pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess. Aos sobrenadantes, foram adicionados 100 μL do reagente de Griess, que contém n-(1-naftil – etil – enediamina) (NEED – Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) diluído 0,1% em água destilada, e sulfanilamida (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) diluída a 1% em ácido fosfórico (H_3PO_4) 5%. Os reagentes NEED e sulfanilamida foram misturados em volumes iguais no mesmo momento da reação. Os ensaios foram realizados em quadruplicata. Em seguida, as amostras foram lidas em microleitor de ELISA com comprimento de onda de 540nm contra um branco constituído por reagente de Griess, os resultados foram expressos em micromoles (umoles) de NO por 2×10^5 células, comparando-se a densidade óptica (DO) à curva padrão de concentração conhecida de NO_2^- variando de 200 a 0,39 nM. Sendo a produção de NO analisada pela adição ou não de estímulos ¹²⁵.

3.8 ENSAIO BIOLÓGICO PARA DETERMINAÇÃO DE $\text{TNF-}\alpha$

Linhagem tumoral de fibroblastos murinos denominada L929 que é sensível ao $\text{TNF-}\alpha$, foi utilizada no ensaio biológico para detecção dessa citocina. As células foram cultivadas em meio completo para cultura de células (MCCC) e mantidas por repiques semanais, em frascos de plástico, em estufa a 37°C com atmosfera constante de 5% de CO_2 .

O meio de cultura de manutenção das células foi desprezado e substituído por uma solução de ATV (tripsina 0,2% e verseno 0,02%) para promover o deslocamento das células da parede da garrafa. Em seguida, o ATV foi desprezado, e as células foram lavadas e ressuspensas em meio de RPMI completo. Após a contagem das células em câmara de Neubauer, a suspensão foi ajustada para a concentração de 5.0×10^5 células/ml. Volumes de 100 μ L dessa suspensão foram distribuídos em microplacas de 96 orifícios para cultura de células (Costar, Cambridge, Mass, USA). Após incubação de 24 horas a 37°C em atmosfera constante de 5% de CO_2 , o meio contido nos orifícios foi desprezado e substituído por 100 μ L de meio de RPMI completo contendo Actinomicina D na concentração de 1 μ g/mL.

Foram realizados ensaios de citotoxicidade, através de soro, e homogenatos de células esplênicas, hepáticas e pulmonares. Os sobrenadantes foram adicionados em volumes de 100 μ L de células L929 tratadas com Actinomicina D por 3 horas. As culturas foram feitas em triplicata. Em três orifícios foi adicionado apenas meio de RPMI completo (cultura controle). Após incubação a 37°C em atmosfera constante de CO_2 por 18 horas, os sobrenadantes foram desprezados, e 100 μ L de suspensão cristal violeta (0,2% em 20% de etanol) foram adicionados aos orifícios por 15 minutos para fixação e coloração das células. Em seguida, a placa foi lavada em água por imersão para remoção do excesso de corante, e 100 μ L de lourinil sulfato de sódio (SDS) a 1% de água destilada foram colocados em cada orifício, para solubilização das células. A leitura das densidades ópticas (DO) em cada orifício foi realizada a 490nm em espectrofotômetro automático de ELISA, modelo Multiskan (MD₅₀₀₀, Dynatec Laboratories Inc., Chantilly, Va). A quantidade de $\text{TNF-}\alpha$ nos sobrenadantes da cultura de macrófagos foi calculada sobre curva padrão realizada com

TNF- α recombinante murino (R & D Systems- Minneapolis, MN, USA) empregado nas concentrações de 40 a 4000 U/ml.

3.9. DOSAGEM DE URÉIA E CREATININA

Amostras de soro de camundongos infectados e controle foram utilizados para a pesquisa de níveis séricos de uréia e creatinina através de sistema automatizado VITROS 950 (Sigma), sendo os valores estabelecidos em mg/dl.

3.10. TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA (IMUNOPEROXIDASE) PARA DETERMINAÇÃO DE ANTÍGENOS DE LEPTOSPIRA

Os fragmentos de tecido renal dos camundongos foram colhidos e adicionados em solução de formalina tamponada a 10%, sendo a seguir incluídos em parafina e cortados em micrótomo a 6 μ de diâmetro, e mantidos em estufa a 30° C por 30 minutos para distensão dos cortes. Os materiais foram submetidos à reação de imunoperoxidase segundo técnica modificada de Ellis et al⁴³, para a pesquisa de antígenos leptospiricos do sorogrupo pomona. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Leika) com ocular de 10X e objetiva de 40X e 100X (imersão) e condensador de campo claro.

3.10.1- Obtenção do anticorpo primário

Os soros hiperimunes preparados com o objetivo de produzir o anticorpo primário a ser utilizado na técnica de imunoperoxidase foram preparados em coelhos jovens (*Oryctolagus cuniculus*) através de aplicações seriadas por via intravenosa, na veia marginal da orelha, de culturas vivas de *Leptospira pomona* puras. Este material foi gentilmente

cedido pela Dra. Jane Megid, do laboratório de Imunologia do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu., UNESP.

3.10.2 Controle de Especificidade

Na avaliação da especificidade, três áreas das lâminas destinadas aos cortes ou impressões foram demarcadas com extensão aproximada de 0,5 centímetro quadrado com o auxílio de caneta para marcação imunoistoquímica Dakopen (DAKO Laboratories). Na primeira área demarcada foi adicionado o anticorpo primário, na segunda o anticorpo pré-absorvido com as leptospiros formalizadas e na terceira área omitiu-se o anticorpo primário, conforme adaptado de Taylor³⁸ e Ellis et al⁴³.

Absorção em Tecido Renal

O anticorpo foi mantido pré-incubado em suspensão de tecido renal de hamsters sadios, para que as imunoglobulinas fossem conjugadas de forma inespecífica aos determinantes antigênicos presentes no tecido renal, permanecendo livre o anticorpo anti-leptospira sorovar pomona para a reação antígeno-anticorpo possibilitando a visualização da reação positiva.

Absorção com Leptospiras

Para o teste de absorção foram adicionados 0,5 ml de culturas vivas de leptospiras em meio estéril de EMJH, e observado quanto ao crescimento, viabilidade e mobilidade.

Quando o número de leptospiiras se encontrava em torno de 10^8 por mililitro, foram formalizadas a 0,2% sob agitação magnética e incubadas a 37°C por 20 minutos. Após, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos descartando-se o sobrenadante. Ao sedimento formado foi adicionado suspensão renal de hamsters em volume igual ao meio de cultivo original, sendo acondicionado sob refrigeração e utilizado até 15 dias após o preparo. No momento do uso, o material foi incubado a 37° por 60 minutos, com o anticorpo primário na diluição de 1:80 e a seguir centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi utilizado no teste de especificidade, caracterizando o controle negativo do teste^{43, 126}.

Omissão do anticorpo primário

Durante o processamento da técnica imunohistoquímica o anticorpo primário foi substituído por uma solução de TRIS-PBS, como parte do procedimento de controle da especificidade, conforme também utilizado por Taylor (1978)³⁸ e Ellis et al (1983)⁴³.

3.11 TÉCNICA HISTOLÓGICA DE HEMATOXILINA-EOSINA

Os fragmentos dos rins colhidos foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% , incluídos em blocos de parafina, cortados a 7 μ de espessura e a seguir corados pela técnica de hematoxilina e eosina, segundo Behmer et al¹²⁷. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico com ocular de 10X e objetiva de 40X e 100X (imersão) e condensador de campo claro

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação de títulos sorológicos obtidos pelos camundongos High e Low (bons e maus respondedores seleção IV-A), quando inoculados com amostra patogênica de *Leptospira interrogans* sorovar pomona, utilizou-se à análise de Variância-ANOVA, não paramétrica através do teste de Kruskal-Wallis, para amostras independentes. Para comparação de médias de variâncias da produção de H₂O₂, NO, citocinas e uréia e creatinina utilizou-se o teste de variância, com médias repetidas e teste T Student-Newman-Keuls de comparações múltiplas ¹²⁸. Para comparação das técnicas de cultivo e imunoistoquímica utilizou-se a análise de concordância Kappa e teste de proporções ¹²⁸. O nível de significância para todos os testes foi de 5%.

*Faça o necessário, depois o
possível e, de repente, você estará
fazendo o impossível.*

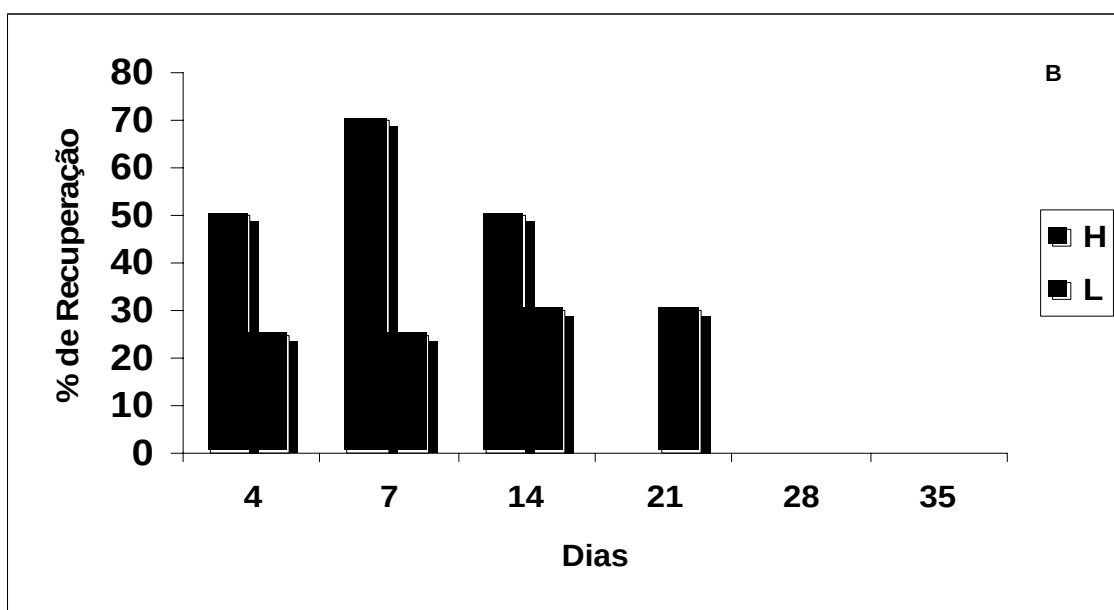
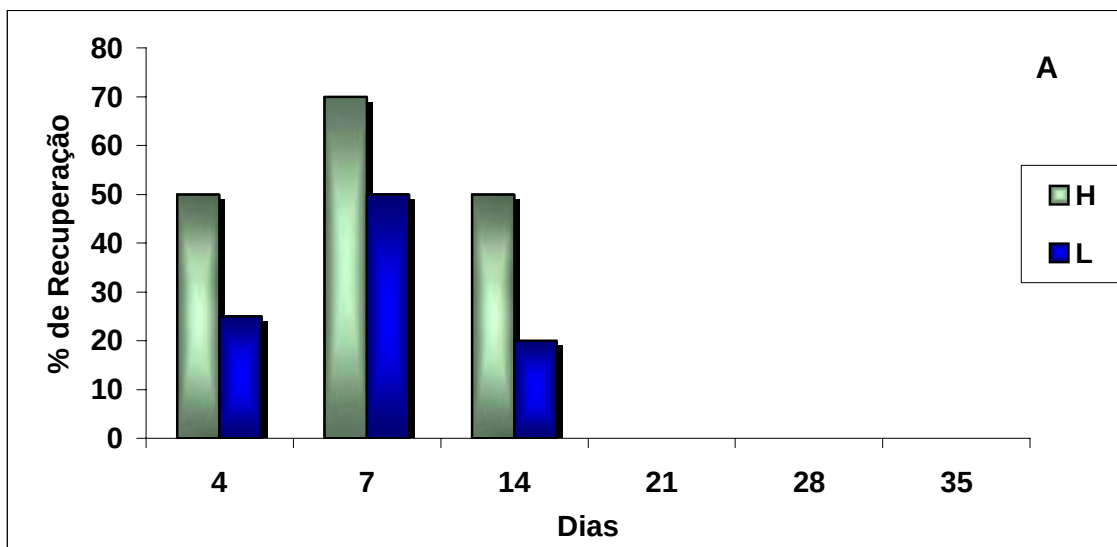
São Francisco de Assis

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 RECUPERAÇÃO DE LEPTOSPIRAS VIÁVEIS

Os resultados expressos na Figuras 1A e 1B indicam que a recuperação bacteriana no fígado e rins ocorreu a partir do quarto dia pós-inoculação nas duas linhagens, com picos no 7º dia pós-inoculação nos camundongos da linhagem H_{IV-A} e no 7º e 14º dias de infecção na linhagem L_{IV-A}. Após o 21º dia os valores apresentaram-se em declínio. Na linhagem Low foi possível isolar o agente por um período mais prolongado em relação as linhagem High, possibilitando o isolamento de leptospiros no fígado desses camundongos até o 21º dia pós-inoculação. Não houve identificação ou o isolamento de leptospiros nos pulmões em nenhuma das linhagens durante os períodos analisados. Os níveis de recuperação do fígado e rins dos camundongos da linhagem High foram superiores aos da linhagem Low até o 14º dia.



Figuras 1A e 1B. Recuperação de leptospirose em rins (A) e fígado (B) de camundongos das linhagens High (H) e Low (L), submetidos à inoculação de 2×10^7 *Leptospira interrogans* sorovar pomona em períodos de tempo determinados. Os resultados são expressos em percentagem de recuperação.

4.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*LEPTOSPIRA INTERROGANS* SOROVAR POMONA

Os grupos de camundongos geneticamente selecionados para a boa ou má resposta de produção de anticorpos, High e Low, foram inoculados com 1mL de amostra de cultivo em meio de EMJH contendo 2×10^7 leptospiras do sorovar pomona. Em seguida, os soros foram coletados no 4, 7, 14, 21, 28, 35 dias pós-inoculação, sendo que os mesmos foram testados pela prova de microaglutinação para a presença de anticorpos contra o sorovar pomona além de outros 24 sorovares descritos a seguir: australis, bratislava, autumnalis, butembo, castellonis, bataviae, canicola, whitcombi, cynopteri, grippotyphosa, hebdomadis, copenhageni, icterohaemorrhagiae, javanica, panama, from, pyrogenes, hardjo, wolffi, shermani, tarassovi, andamana, patoc e sentot. Este procedimento foi utilizado para evitar que camundongos previamente infectados ou portadores de outro sorovar que não o pomona fizessem parte do grupo. Os títulos de anticorpos produzidos pelos camundongos após inoculação com a amostra de *Leptospira interrogans* sorovar pomona foram expressos em títulos sorológicos que podem ser visualizados na figura 2.

A análise destes resultados revela que não houve diferença estatística significativa entre as linhagens geneticamente selecionadas High_{IV-A} e Low_{IV-A}, embora tenham sido detectados níveis de anticorpos mais elevados na linhagem H_{IV-A} quando comparada a linhagem L_{IV-A}, principalmente entre o sétimo e o vigésimo primeiro dias pós-inoculação. A partir do vigésimo oitavo dia houve uma acentuada elevação dos títulos, sendo que neste período, níveis séricos de anticorpos aglutinantes se comportaram de forma semelhante entre as duas linhagens.

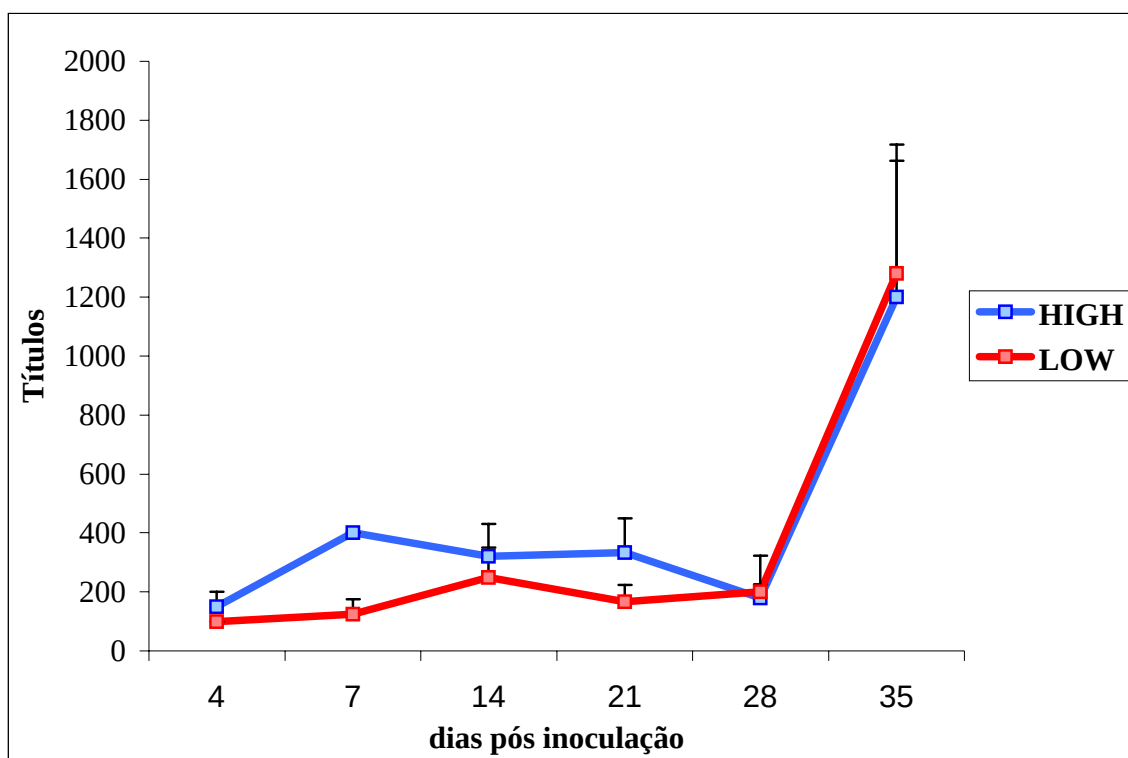


Figura 2. Títulos de anticorpos detectados pelo teste de aglutinação microscópica frente ao antígeno de *Leptospira interrogans* sorovar pomona, em camundongos High e Low, inoculados com 2×10^7 leptospiaras/ml.

4.3 ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS

4.3.1 Determinação de Intermediários Reativos do Oxigênio (H_2O_2)

a. Produção de H_2O_2 por macrófagos peritoneais

As células dos animais H_{IV-A} infectados quando cultivadas sem estímulo, apresentaram produção elevada de H_2O_2 no sétimo, décimo quarto, vigésimo primeiro e trigésimo quinto dia de infecção, sendo que apenas no 14º dia esta produção foi estatisticamente significativa em relação aos controles.

Quando comparamos esta linhagem com a L_{IV-A} também infectada sem estímulos, observamos que houve produção elevada nas linhagens H_{IV-A} aos sete, 14 e 21 dias, sendo que apenas no 14º dia foram observados valores significativos. A produção de H_2O_2 nas linhagens L_{IV-A} manteve-se em níveis basais durante o experimento (Figura 3A). Não houve diferença significativa entre os controles não infectados e sem estímulos nas linhagens H_{IV-A} e L_{IV-A} . Com o objetivo de verificar se macrófagos peritoneais apresentavam capacidade em produzir H_2O_2 , estes animais foram submetidos a estímulos com IFN- γ e/ou PMA.

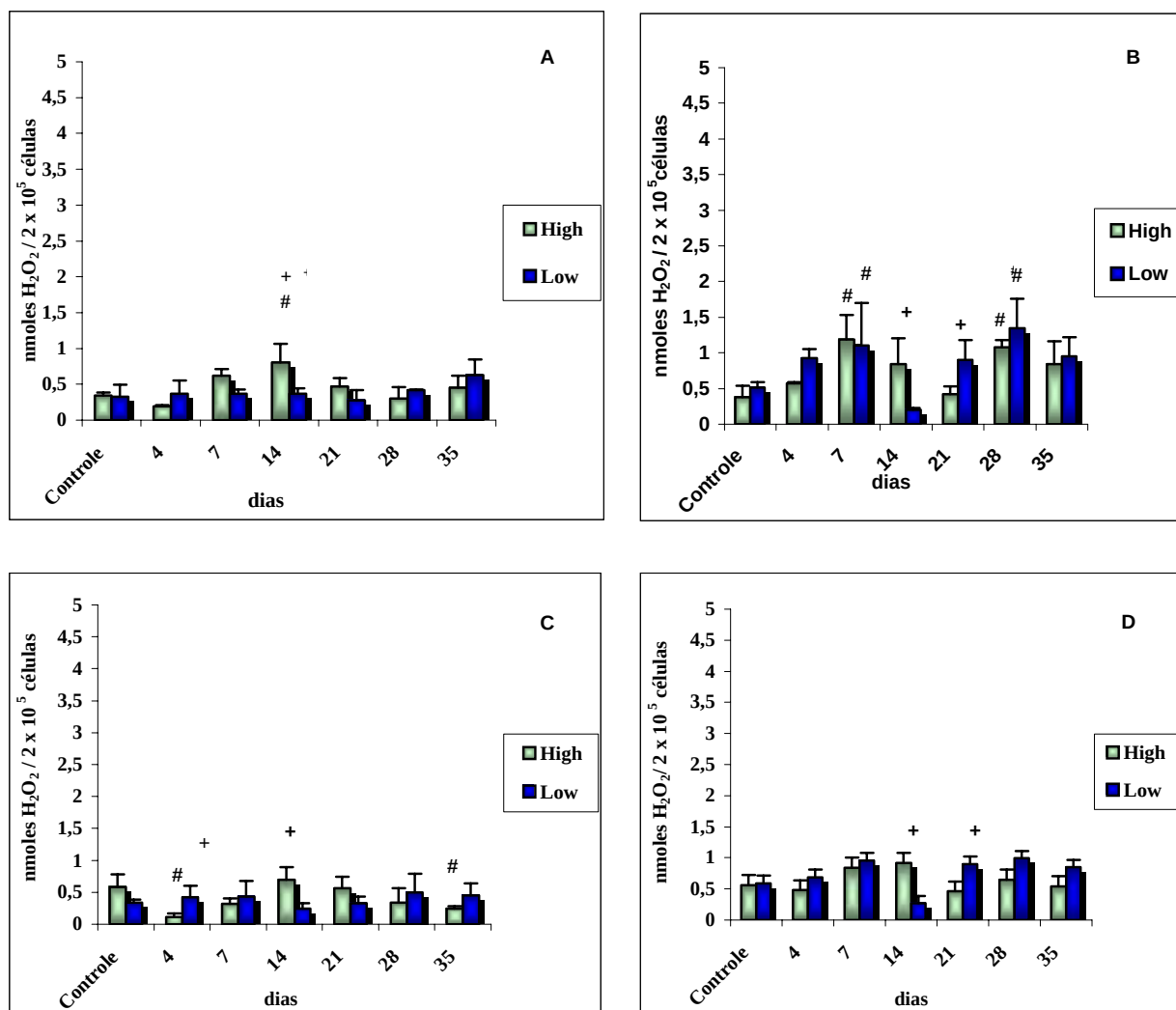
Na figura 3C observamos a produção de H_2O_2 por macrófagos das linhagens H_{IV-A} e L_{IV-A} estimulados com IFN- γ . Os animais H_{IV-A} controles, produziram maior concentração de H_2O_2 que os controles L_{IV-A} . Entretanto, este aparente aumento não foi significativo, provavelmente devido a grande variabilidade dos dados individuais.

A linhagem H_{IV-A} apresentou inibição na produção de H_2O_2 no 4º dia de infecção, sendo que foi estatisticamente significativa em relação à linhagem L_{IV-A} , entretanto, houve recuperação da produção durante o experimento, decrescendo novamente apenas no 35º

dia. No 14° dia a concentração de H_2O_2 foi estatisticamente significante em relação aos L_{IV-A} , que novamente apresentou produção basal deste metabólito.

Na figura 3B observa-se que o tratamento de macrófagos peritoneais com PMA, não afetou significativamente a produção de H_2O_2 nos animais controle, entretanto, ambas linhagens H_{IV-A} e L_{IV-A} infectadas, apresentaram grande produção deste metabólito no 7° e 28° dias de infecção em relação aos controles. Comparando a produção de H_2O_2 entre as linhagens, observamos diferenças significantes no 14° ($H > L$) e 21° ($L > H$) dias de infecção.

O estímulo em conjunto de $IFN-\gamma$ e PMA, elevou a produção de H_2O_2 dos animais controles e infectados em ambas as linhagens, entretanto diferenças significativas também foram observados no 14° ($H > L$) e 21° ($L > H$) dias de infecção (Figura 3D).



Figuras 3A, 3B, 3C, 3D. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos H e L da seleção IV-A infectados com *L. interrogans* sorovar pomona e animais controle não infectados. Macrófagos cultivados na ausência de interferon-gama sem estímulo (A) ou estimulados com PMA (B) ou cultivados na presença de IFN- γ , sem estímulo (C), ou estimulados com PMA (D). Os resultados representam média $\pm$ desvio padrão de seis animais por grupo.

Teste de Student-Newman-Keuls de comparações múltiplas ($p < 0.05$).

indica diferença significativa de animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

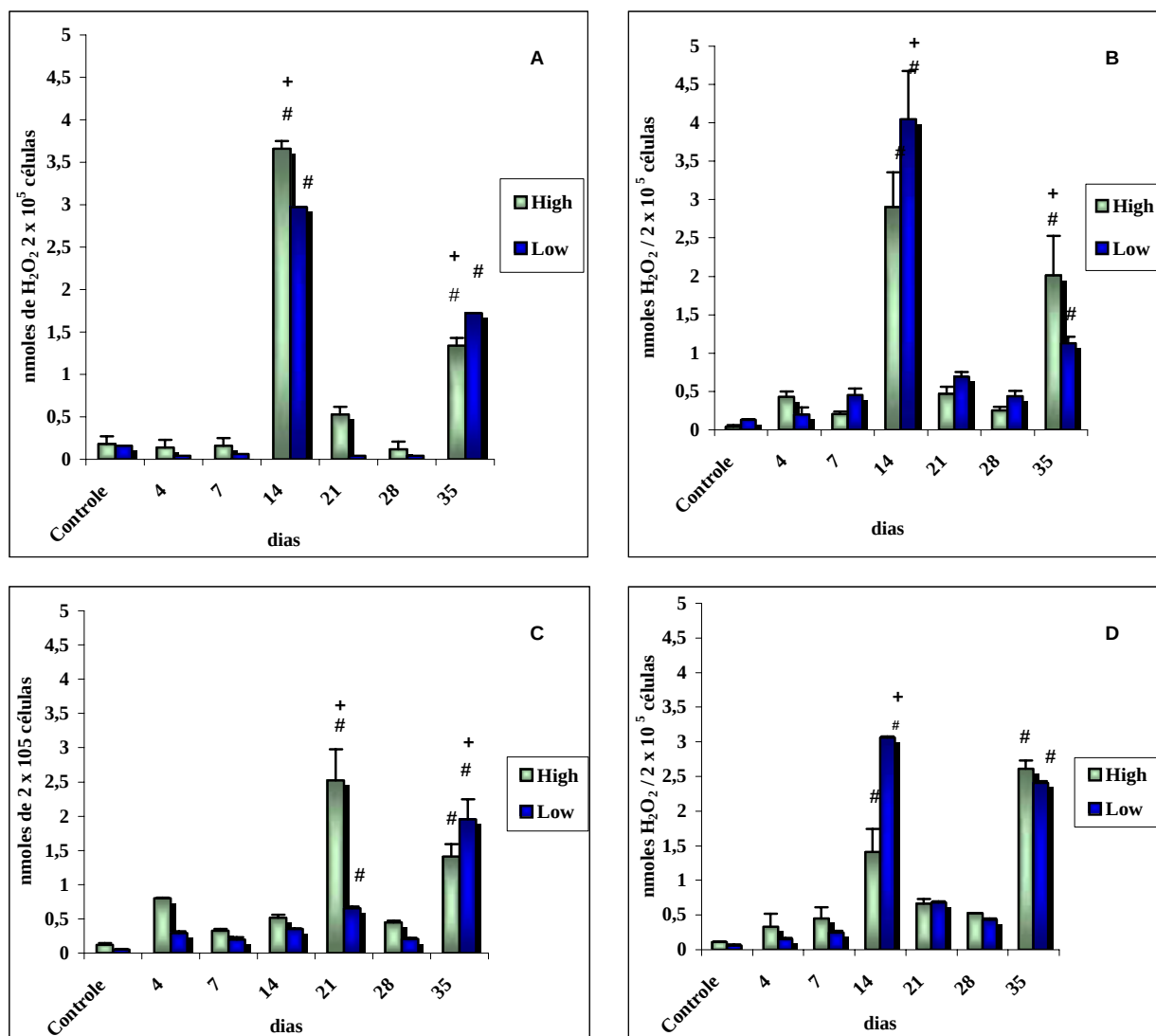
+ indica diferença estatística interlinhagens (H x L) em cada período.

b. Produção de H_2O_2 por macrófagos esplênicos

A produção de intermediários reativos do oxigênio por macrófagos esplênicos das linhagens H_{IV-A} e L_{IV-A} sem estímulos, manteve-se praticamente inalterada durante todo o experimento, sendo que apenas no 14° dia e 35° dia ambas as linhagens apresentaram maior produção de H_2O_2 em comparação com seus respectivos controles. A produção de H_2O_2 entre as linhagens também apresentou diferenças significativas nesses períodos, com a linhagem H_{IV-A} apresentando maior produção no 14 ° dia e na linhagem L_{IV-A} no 35° dias (Figura 4A).

O tratamento com $IFN-\gamma$ não afetou a produção dos animais controles, aumentando levemente a concentração dos infectados no início da infecção com picos de produção aos 21 dias na linhagem H_{IV-A} e no 35° dia na linhagem L_{IV-A} , que também apresentaram diferenças interlinhagens nesses períodos com $H > L$ no 21° dia e $L > H$ no 35° (Figura 4C).

A produção de H_2O_2 por macrófagos estimulados com PMA não sofreu grandes alterações. Produção significativa só foi observada no 14° e 35° dias entre as linhagens infectadas e respectivos controles. Sendo que as diferenças interlinhagens também foram observadas no mesmo período com a linhagem L_{IV-A} apresentando maior concentração no 14° dia e a H_{IV-A} no 35° dia (Figura 4B). Com o estímulo adicional de $IFN-\gamma$ e PMA houve diferença interlinhagens com $L > H$ no 14° dia (Figura 4D).



Figuras 4A, 4B, 4C, 4D. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos esplênicos de camundongos H e L da seleção IV-A infectados com *L. interrogans* sorovar pomona e animais controle não infectados. Macrófagos cultivados na ausência de interferon-gama sem estímulo (A) ou estimulados com PMA (B) ou cultivados na presença de IFN- γ , sem estímulo (C), ou estimulados com PMA (D). Os resultados representam média $\pm$ desvio padrão de seis animais por grupo.

Teste de Student-Newman-Keuls de comparações múltiplas ($p < 0.05$).

indica diferença significativa de animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

+ indica diferença estatística interlinhagens (H x L) em cada período.

c. Produção de H_2O_2 por macrófagos pulmonares

A produção de H_2O_2 por macrófagos pulmonares apresentou-se diminuída nos animais controles e infectados sem estímulo. Produção elevada e significativa só foi observada aos 14 dias nas linhagens L_{IV-A} e no 35º dia nas duas linhagens em relação aos seus respectivos controles. Diferença significativa interlinhagens só foi observada no 14º dia com a linhagem L_{IV-A} produzindo maior concentração que a linhagem H_{IV-A} , sendo que esta praticamente não produziu H_2O_2 neste e no 21º e 28º períodos analisados (Figura 5A).

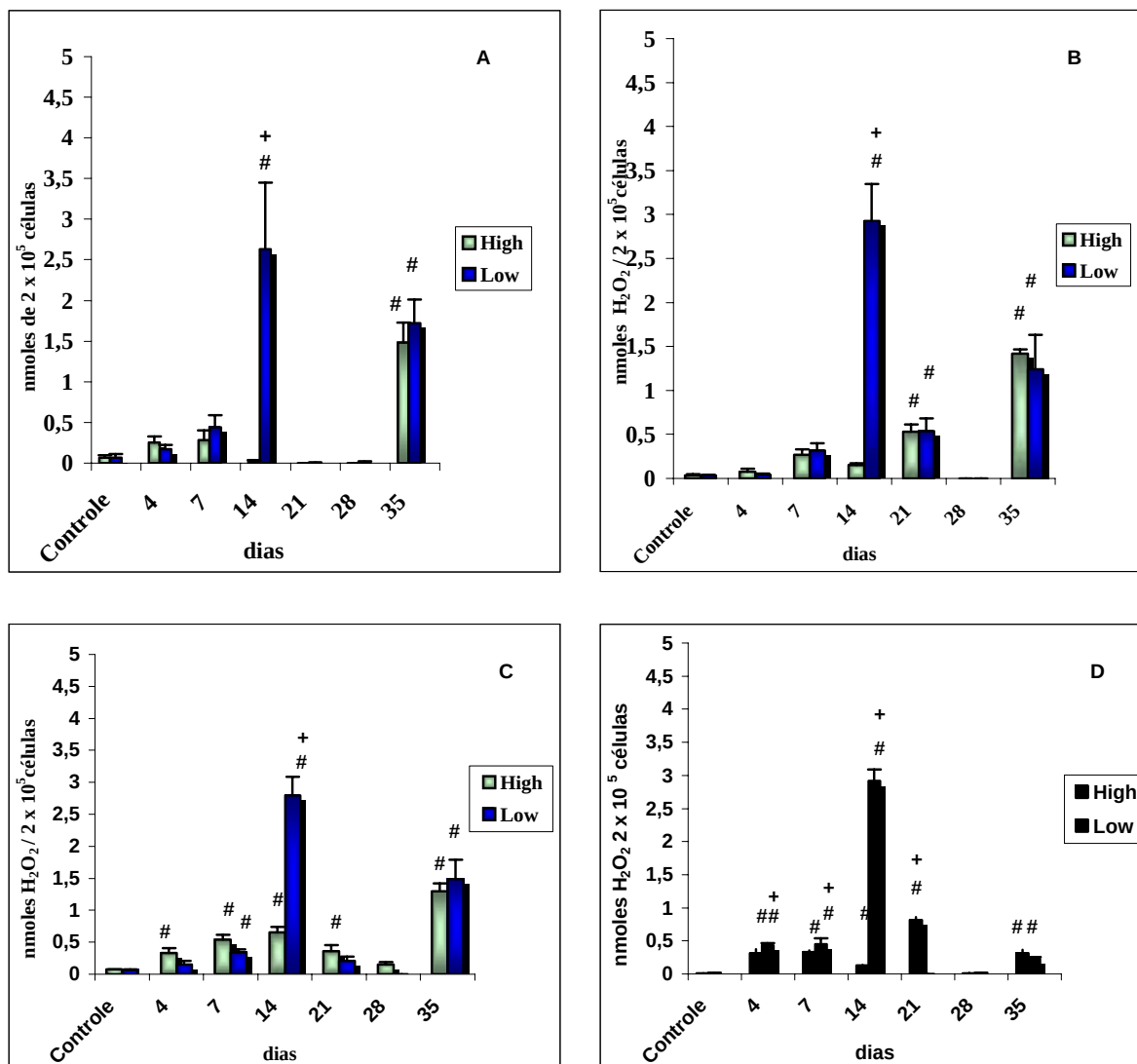
O tratamento das células com $IFN-\gamma$ não afetou a produção de H_2O_2 dos animais controles, entretanto aumentou a síntese desse metabólito na linhagem H_{IV-A} infectada no 4º, 7º, 14º, 21º e 35º dias, sendo que o mesmo foi observado nos animais da linhagem L_{IV-A} nos períodos de 7º, 14º e 35º de infecção. Diferenças significativas entre as linhagens foram observadas no 14º dia de infecção com as linhagens L_{IV-A} produzindo maior concentração de H_2O_2 que os animais da linhagem H_{IV-A} (Figura 5C).

O tratamento com PMA não elevou a produção de H_2O_2 dos animais H_{IV-A} infectados em relação aos controles nos períodos de 4, 7, 14 e 28 dias, não afetando também os animais L_{IV-A} no 4º, 7º e 28º dias de infecção. Entretanto aumento significativo dos infectados em relação aos controles foi observado no 14º, 21º e 35º dias na linhagem L_{IV-A} e aos 21 e 35 dias na linhagem H_{IV-A} . Diferença significativa foi observada apenas no 14º dia com a linhagem L_{IV-A} produzindo mais H_2O_2 que os animais H_{IV-A} (Figura 5B).

A produção de H_2O_2 por macrófagos pulmonares dos animais controles não foi afetada pelo tratamento conjunto com $IFN-\gamma$ e PMA. Entretanto os animais infectados H_{IV-A}

apresentaram maior produção que o grupo controle no 4º, 7º, 14º, 21º e 35º dias, e os animais L_{IV-A} no 4º, 7º, 14º e 35º dias de infecção.

Diferenças interlinhagens foram observadas no 4º, 7º e 14º dias, com a linhagem L_{IV-A} produzindo mais H₂O₂ que linhagens H_{IV-A}, sendo que esta produziu no 21º dia mais H₂O₂ que a linhagem L_{IV-A} que praticamente apresentou inibição na produção desse metabólito (Figura 5D).



Figuras 5A, 5B, 5C, 5D. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos pulmonares de camundongos H e L da seleção IV-A infectados com *L. interrogans* sorovar pomona e animais controle não infectados. Macrófagos cultivados na ausência de interferon-gama sem estímulo (A) ou estimulados com PMA (B) ou cultivados na presença de IFN-γ, sem estímulo (C), ou estimulados com PMA (D). Os resultados representam média ± desvio padrão de seis animais por grupo.

Teste de Student-Newman-Keuls de comparações múltiplas ($p < 0.05$).

indica diferença significativa de animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

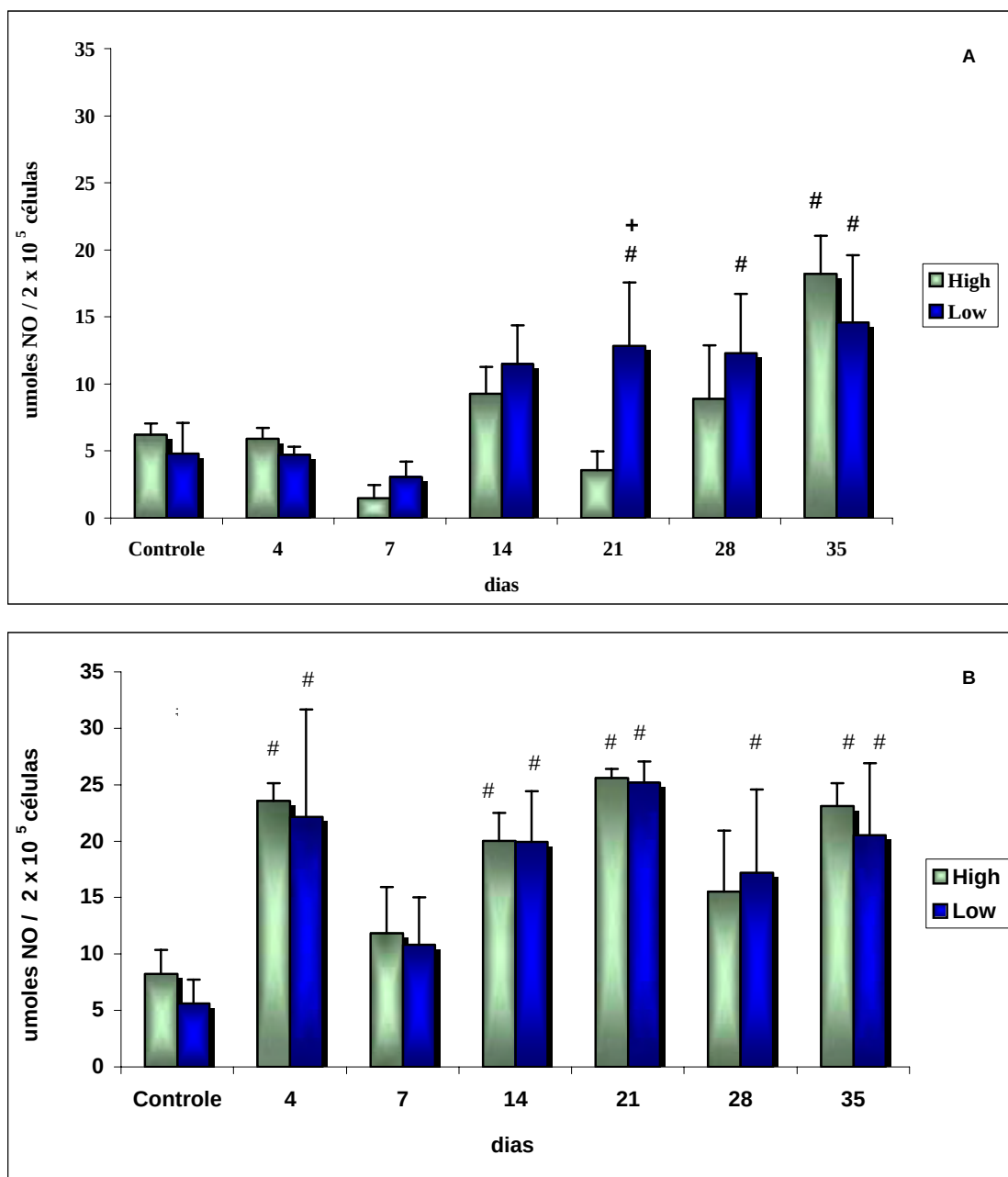
+ indica diferença estatística interlinhagens (H x L) em cada período.

4.3.2 Determinação da produção de intermediários reativos do nitrogênio (NO)

a. Produção de NO por macrófagos peritoneais

A produção de NO das linhagens H_{IV-A} e L_{IV-A} controles basicamente foi a mesma. Durante a infecção, o mesmo foi observado até o 14º dia na linhagem L_{IV-A} que apresentou aumento significativo em relação aos controles do 21º ao 35º dias. A linhagem H_{IV-A} apresentou valores significativos apenas no 35º em relação aos controles. Diferenças interlinhagens só foram obtidas no 21º dia com a linhagem L_{IV-A} produzindo mais NO que as linhagens H_{IV-A} (Figura 6A).

O tratamento de macrófagos peritoneais com IFN- γ não modificou o perfil de resposta das linhagens controles. Entretanto, a produção de NO nos grupos infectados apresentou-se elevado em ambas as linhagens no decorrer do experimento, apresentando valores significantes aos 4º, 14º, 21º, 28º e 35º dias em relação aos seus controles, exceto no 28º dia para os animais H_{IV-A}. Nenhuma diferença interlinhagens foi observada após o tratamento com IFN- γ (Figura 6B).



Figuras 6A, 6B. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos H e L da seleção IV-A infectados com *L. interrogans* sorovar pomona e animais controle não infectados. Os macrófagos foram cultivados sem estímulo (A) ou estimulados com interferon-gama (B). Os resultados representam média $\pm$ desvio padrão de seis animais por grupo.

Teste de Student-Newman-Keuls de comparações múltiplas ($p < 0.05$).

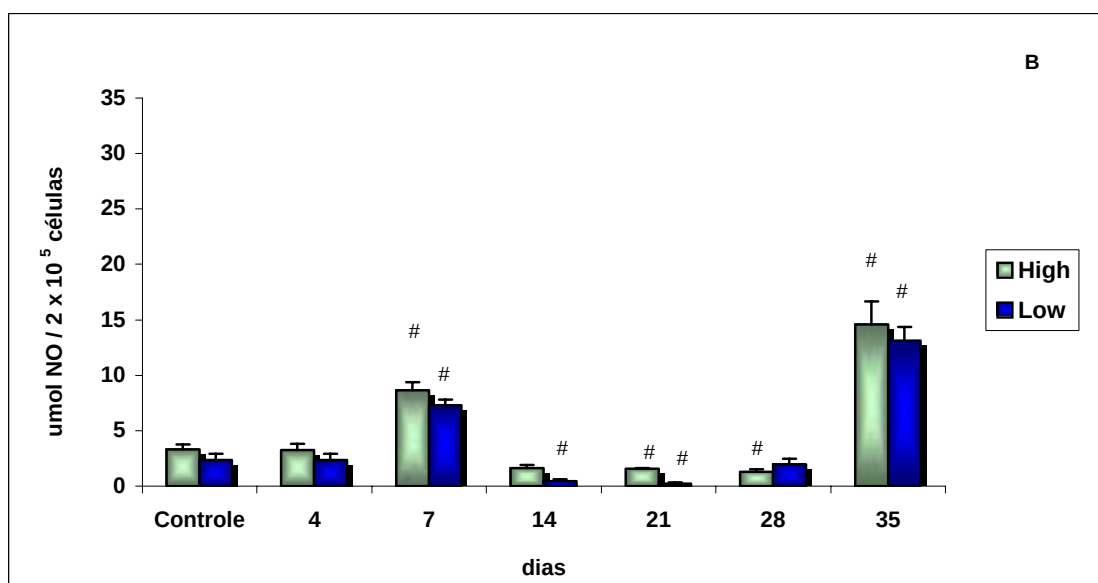
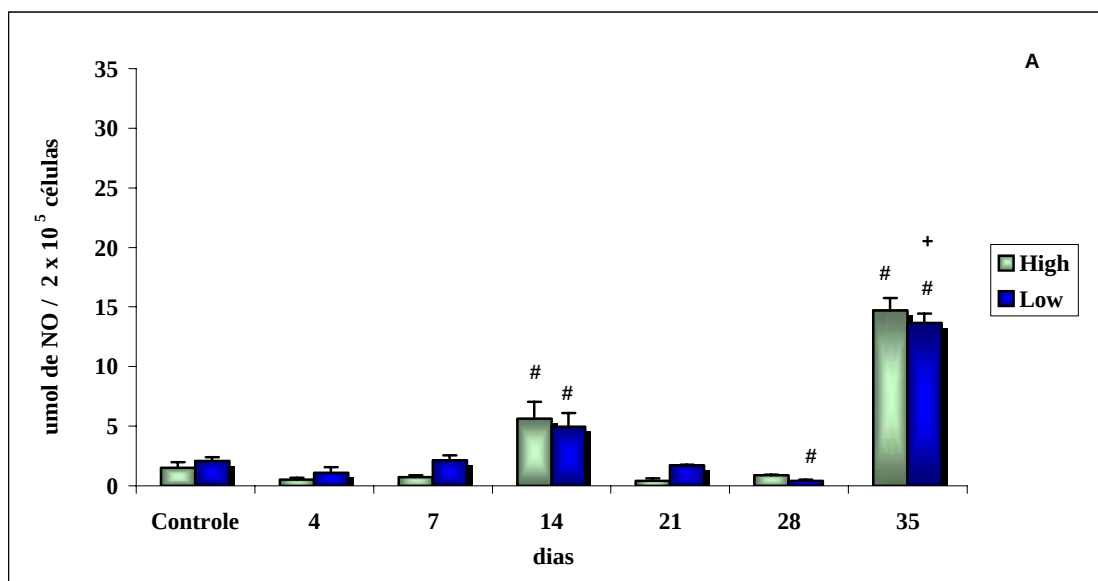
indica diferença significativa de animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

+ indica diferença estatística interlinhagens (H x L) em cada período.

b. Produção de NO por macrófagos esplênicos

A produção de NO por macrófagos esplênicos das linhagens controles H_{IV-A} e L_{IV-A} não apresentou diferenças significantes. Entre os grupos infectados observamos inibição de resposta nos L_{IV-A} em relação aos controles no 28º dia. Entretanto, no 14º e 35º dias a produção de NO foi significativamente maior. Diferença interlinhagens só foi obtida no 35º dia com a linhagem H_{IV-A} produzindo mais NO que a linhagem L_{IV-A} (Figura 7A).

O tratamento de macrófagos esplênicos com IFN- γ aumentou levemente a concentração de NO nos grupos controles, mas sem nenhuma diferença significante entre as linhagens. O mesmo perfil de resposta foi obtido entre os infectados no 4º dia com visível inibição aos 14, 21 e 28 dias de infecção. Aumento significativo foi observado no 7º e 35º dias nas linhagens H_{IV-A} e L_{IV-A} em relação aos seus respectivos controles (Figura 7B).



Figuras 7A, 7B. Produção de óxido nítrico por macrófagos esplênicos de camundongos H e L da seleção IV-A infectados com *L. interrogans* sorovar pomona e animais controle não infectados. Os macrófagos foram cultivados sem estímulo (A) ou estimulados com interferon-gama (B). Os resultados representam média $\pm$ desvio padrão de seis animais por grupo.

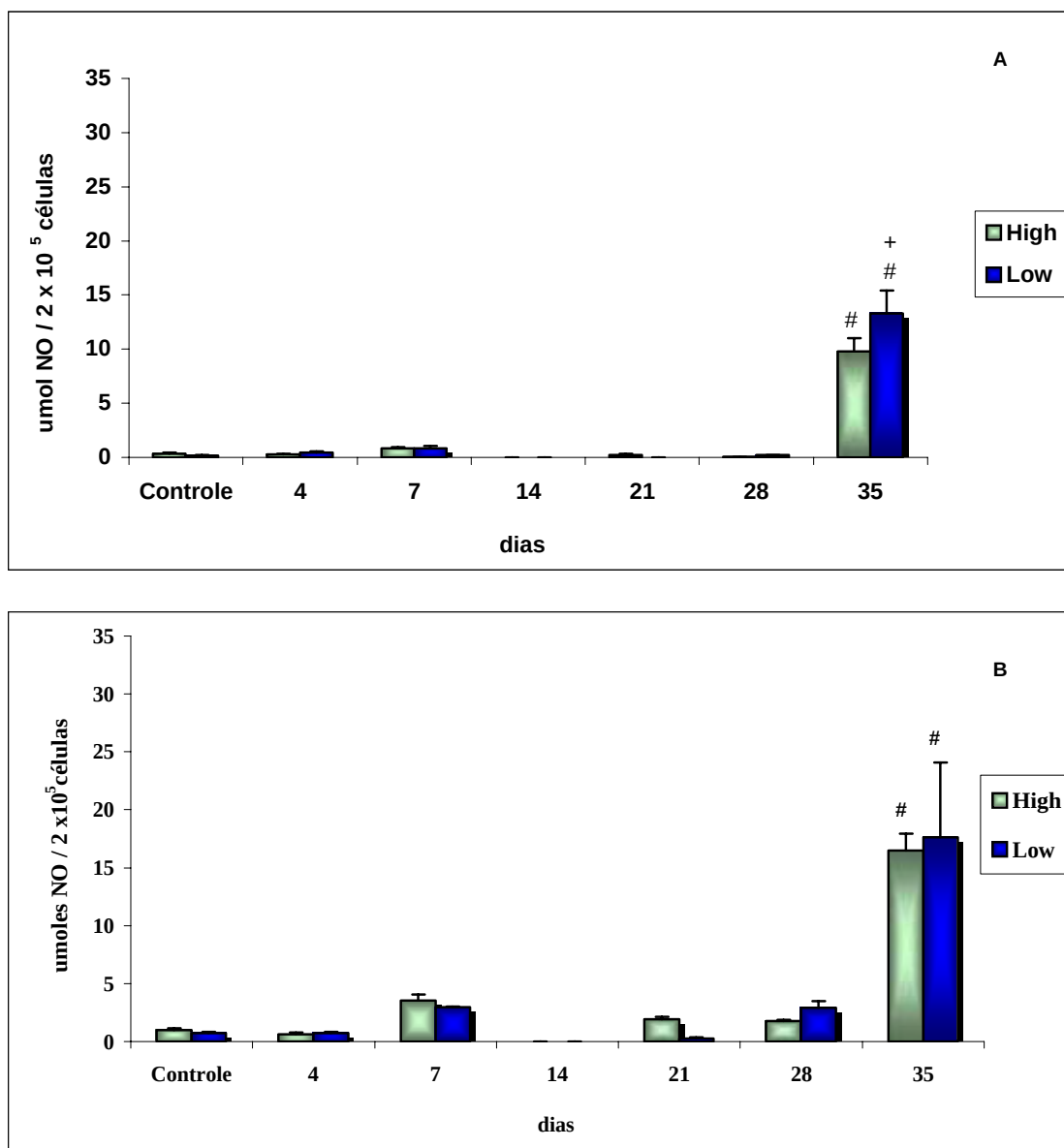
Teste de Student-Newman-Keuls de comparações múltiplas ($p < 0.05$).

indica diferença significativa de animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

+ indica diferença estatística interlinhagens (H x L) em cada período.

c. Produção de NO por macrófagos pulmonares

A produção de NO por macrófagos pulmonares foi muito baixa nos animais H_{IV-A} e L_{IV-A} controles. Durante a infecção o mesmo foi observado até o 35º dia, onde ambas as linhagens passaram a produzir NO em concentrações extremamente elevadas em relação aos seus respectivos controles. Nesse período, a linhagem L_{IV-A} produziu níveis significativamente maiores que a linhagem H_{IV-A} (Figura 8A). O tratamento com IFN- γ não modificou o perfil de resposta das linhagens e novamente apenas no 35º dia, ambas as linhagens H_{IV-A} e L_{IV-A} apresentaram produção significativa em relação a seus respectivos controles. Entretanto, após o tratamento com IFN- γ não observamos diferença interlinhagens nesse período (Figura 8B).



Figuras 8A, 8B. Produção de óxido nítrico por macrófagos pulmonares de camundongos H e L da seleção IV-A infectados com *L. interrogans* sorovar pomona e animais controle não infectados. Os macrófagos foram cultivados sem estímulo (A) ou estimulados com interferon-gama (B). Os resultados representam média $\pm$ desvio padrão de seis animais por grupo.

Teste de Student-Newman-Keuls de comparações múltiplas ($p < 0.05$).

indica diferença significativa de animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

+ indica diferença estatística interlinhagens (H x L) em cada período.

4.4 PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL- α (TNF- α).

a. Detecção de TNF- α obtida em soros de camundongos H_{IV-A} e L_{IV-A}

A produção de TNF- α por animais controle das linhagens H_{IV-A} e L_{IV-A} não apresentou diferenças significantes. O grupo de camundongos H_{IV-A} infectados não apresentou diferenças em relação ao grupo controle, sendo que no 14º houve presença de inibição na produção desse metabólito. A linhagem L_{IV-A} infectada apresentou maior produção de TNF- α aos 7, 21 e 35 dias de infecção, com diferenças inter-linhagens apenas no 21º dia com a linhagem L_{IV-A} produzindo mais TNF- α que a linhagem H_{IV-A} (Figura 9A).

b. Produção de TNF- α por células esplênicas, hepáticas e pulmonares de camundongos H_{IV-A} e L_{IV-A}

A produção de TNF- α por células esplênicas não apresentou diferença significativa entre animais controle das duas linhagens H_{IV-A} e L_{IV-A}. A linhagem H_{IV-A} produziu mais TNF- α em relação aos controles no 4º, 28º e 35º dias de infecção, enquanto as linhagens L_{IV-A} apenas no 28º dia. Diferenças significativas interlinhagens foram observadas no 4º e 35º dias de infecção com a linhagem H_{IV-A} produzindo mais TNF- α que a linhagem L_{IV-A} (Figura 9B).

A produção de TNF- α por células hepáticas foi mais elevada que a observada em outros órgãos analisados. Entretanto, nesse compartimento, não observamos diferenças na produção dessa citocina entre os animais controles H_{IV-A} e L_{IV-A}. Os animais H_{IV-A}

apresentaram inibição em relação aos controles no 7° e 14° dias, recuperando-se nos períodos subsequentes com produção elevada no 21°, 28° e 35° dias.

A linhagem L_{IV-A} infectada apresentou produção maior que o grupo controle no 7°, 21° e 28° dias, e diferença inter-linhagens ocorreu apenas no 35° com a linhagem H_{IV-A} produzindo mais TNF- α que a L_{IV-A} (Figura 9C).

A produção de TNF- α por células pulmonares obtidas do pulmão entre as linhagens H_{IV-A} e L_{IV-A} controles, não apresentou diferenças significativas.

A linhagem L_{IV-A} infectada apresentou níveis basais na produção dessa citocinas, enquanto a linhagem H_{IV-A} apresentou maior produção no 4° e 35° dias, sendo que no 4° dia esta produção foi estatisticamente significante quando comparada a produção da linhagem L_{IV-A} (Figura 9D).

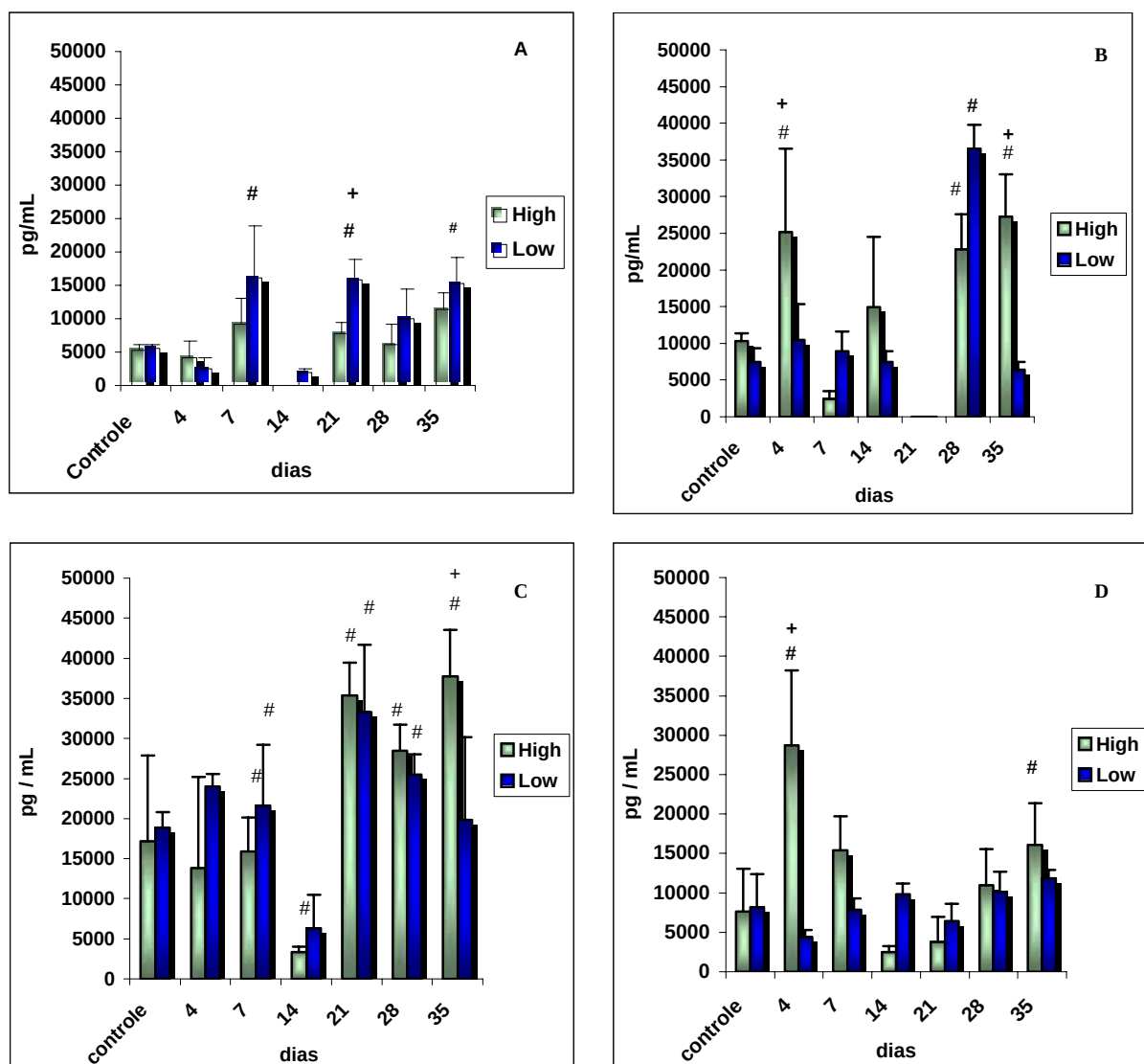


Figura 9A, 9B, 9C, 9D. Níveis de TNF- α detectados em soros (A) e homogenato de baço (B), fígado (C) e pulmão (D) de camundongos High e Low inoculados com *Leptospira* sorovar pomona, e grupo controle não infectado.

Teste de Student-Newman-Keuls de comparações múltiplas ($p < 0.05$).

indica diferença significativa de animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

+ indica diferença estatística interlinhagens (H x L) em cada período.

4.5 VALORES SÉRICOS DE URÉIA E CREATININA EM CAMUNDONGOS HIGH E LOW

Os resultados apresentados na figura 10 demonstram que houve discreta elevação nos níveis de uréia, principalmente após o 14º dia pós-inoculação nas linhagens H_{IV-A} e a partir do 21º dia nas linhagens L_{IV-A}, em seguida apresentando-se em discreto declínio. Os dados apresentados na figura 10 sugerem que houve diferença significativa entre os níveis de uréia apresentados intralinhagens (grupo infectado x controle), sendo tais resultados observados nas duas linhagens e em todos os períodos analisados. Em relação aos valores interlinhagens (H_{IV-A} x L_{IV-A}), foi observada variância significativa no sétimo e vigésimo primeiro dias pós-inoculação, no qual, foram encontrados níveis mais elevados de uréia nas linhagens L_{IV-A} em relação às linhagens H_{IV-A}. Houve um pequeno declínio nos níveis de uréia no vigésimo oitavo dia pós-inoculação que se manteve até o trigésimo quinto dia.

Em animais controles não infectados os valores de uréia permaneceram normais em todos os períodos analisados, com média de 26ug/dl $\pm$ 4.

Conforme observado na figura 11, valores séricos de creatinina apresentados pelos animais infectados bem como por animais controle negativos não infectados, apresentou-se em níveis de normalidade (0.18 a 0, 3mg/dl.) nas duas linhagens analisadas.

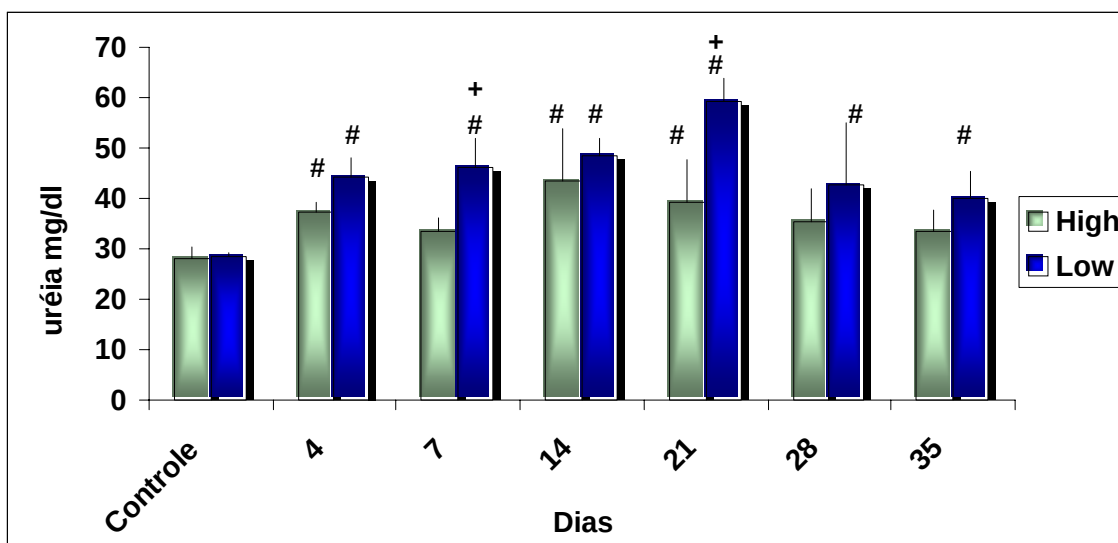


Figura 10. Valores séricos de uréia (mg/dl) em média $\pm$ desvio padrão em seis animais por grupo.

High Animais do grupo High infectados com 1ml de *Leptospira pomona*, **Low**, animais do grupo Low infectados com 1 ml de *Leptospira pomona*.

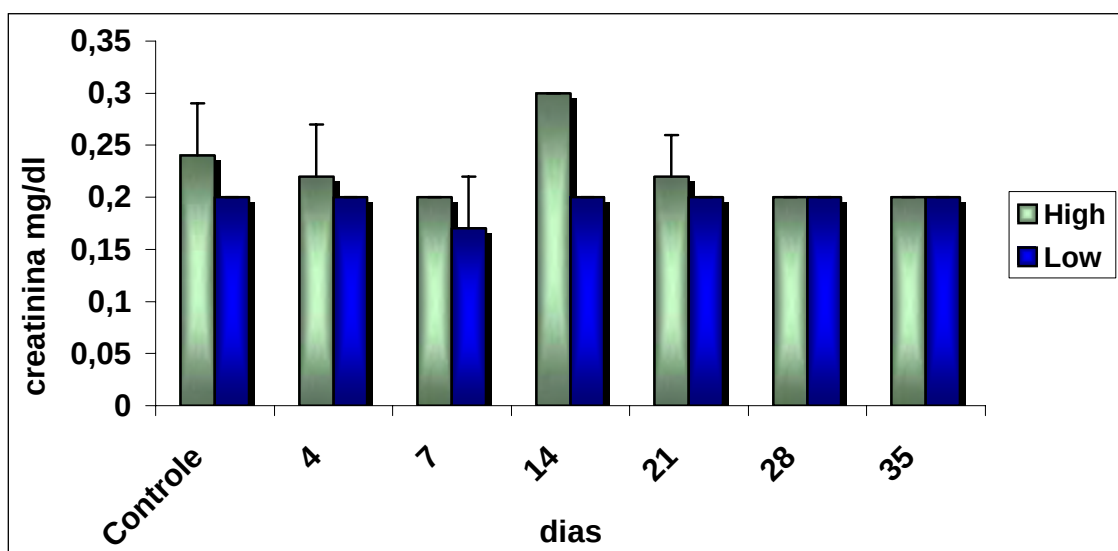


Figura 11. Valores séricos de creatinina (mg/dl) em média $\pm$ desvio padrão em seis animais por grupo.

High; animais do grupo High infectados com 1ml de *Leptospira pomona*, **Low**; animais do grupo Low infectados com 1 ml de *Leptospira pomona*.

Teste de Student-Newman-Keuls de comparações múltiplas ($p < 0.05$).

indica diferença significativa de animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

+ indica diferença estatística interlinhagens (H x L) em cada período.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS LEPTOSPIRICOS EM TECIDO RENAL DE CAMUNDONGOS INFECTADOS PELA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

Nos cortes histológicos a presença da leptospira foi detectada em todos os aumentos observados ao microscópio óptico, formando massas de aglomerados filiformes de coloração amarronzada, destacados do fundo azul, corado pela hematoxilina e visíveis principalmente no lúmen e em algumas áreas na periferia dos túbulos (Figura 12). As bactérias foram observadas também próximas a vasos sangüíneos e interstícios, sendo raramente encontrados dispersas nos tecidos. Em muitas áreas observadas o agente se encontrava fragmentado. Ocasionalmente foram vistos próximos a glomérulos, formando cadeias periféricas de coloração variando de marrom claro a escuro relacionada à maior concentração de leptospiras ou antígenos presentes. Tais granulações foram vistas em pelo menos quatro regiões por campo microscópico observado em aumentos de 40X e 100X.

Houve variação na intensidade de coloração principalmente a partir do 14º dia pós-inoculação, com menor intensidade de coloração em lâminas que apresentavam número reduzido de antígenos leptospiricos. Na maioria das lâminas o agente se apresentava comumente formando pequenos fragmentos de aspecto arredondado, corados em marrom claro e distribuídos pelos tecidos principalmente nos espaços intercelulares.

Nos tecidos dos camundongos controle negativos não foi observada nenhuma alteração ou presença de antígeno (Figura 13).

Com relação às linhagens é preciso destacar que o antígeno foi identificado nos tecidos renais entre o 4º e o 21º dias pós-inoculação em ambas as linhagens analisadas.

Entre o 4º e o 14º dias pós-inoculação os tecidos se caracterizam por apresentar boa intensidade de coloração (++). Entre o 4º e 7º períodos pós-inoculação observou-se maior número de amostras positivas nos animais da linhagem H_{IV-A} em relação à linhagem L_{IV-A} havendo diferença estatística significativa ($p < 0.05$) apenas no 4º dia pós-inoculação (Tabela 1). A partir do 21º dia, as amostras analisadas apresentaram decréscimo no número de positividade e na intensidade de coloração (+), onde as leptospiras se encontravam em menor número e de forma dispersa em alguns tecidos analisados. Entretanto, animais da linhagem L_{IV-A} passaram a apresentar maior número de positivos em relação à linhagem H_{IV-A}. A partir do 28º dia pós-inoculação não foi possível observar antígenos nos tecidos renais de nenhuma das linhagens analisadas.

Conforme podemos analisar pelos resultados apresentados na tabela 1, o teste de imunoperoxidase foi mais sensível em detectar as leptospiras nos tecidos renais de ambas linhagens analisadas, quando comparado ao cultivo, onde só foi possível recuperar as leptospiras nos tecidos renais das linhagens até o 14º dias pós-inoculação.

Em relação à concordância de resultados entre as duas técnicas foi observado que na linhagem H_{IV-A} houve boa concordância entre as técnicas de identificação apenas no 14º dia pós-inoculação, o mesmo ocorrendo com os resultados comparativos obtidos com a linhagem L_{IV-A} no 7º dia pós-inoculação. Foram encontrados resultados idênticos para as linhagens H_{IV-A} no 4º e 7º períodos pós-inoculação. Em outros períodos as concordâncias entre resultados foram consideradas moderadas ou fracas sendo que foi utilizado método estatístico Kappa para analisar estes parâmetros.

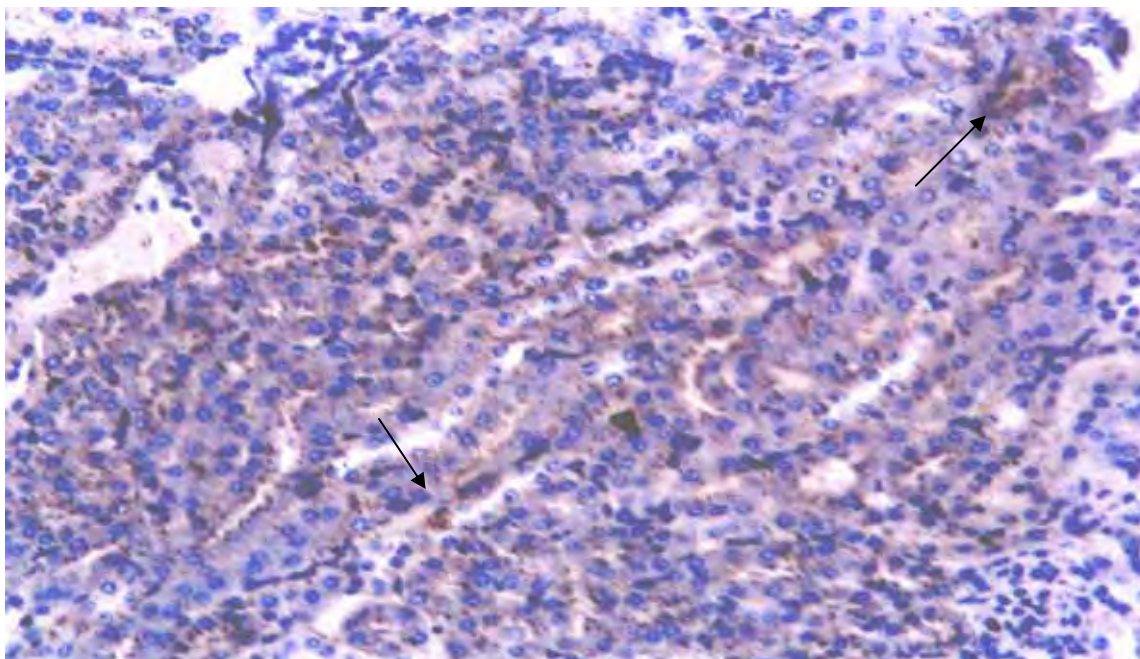


Figura 12. Fotomicrografia de rins de camundongo infectado com *L.interrogans* sorovar pomona. Observar a presença de antígenos de forma dispersas ou no lúmen dos túbulos (setas). Coloração pela imunoperoxidase indireta. Aumento 40x. Microscópio Leika.

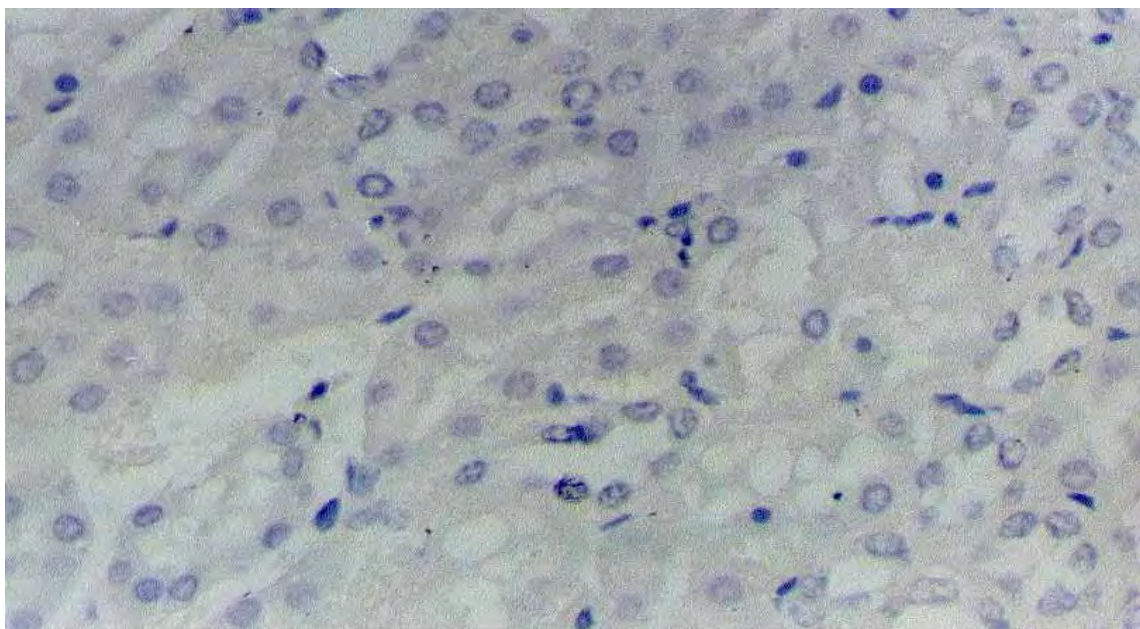


Figura 13. Fotomicrografia de rins de camundongo controle negativo. Coloração pela imunoperoxidase indireta. Aumento 100x. Microscópio Leika.

Tabela 1. Comparação de resultados entre as técnicas de visualização bacteriana e imunoperoxidase indireta em cortes frente ao cultivo bacteriano em Camundongos H_{IV-A} e L_{IV-A} infectados com o sorovar pomona.

Dias	Imunoperoxidase		Cultivo	
	High (18)	Low (18)	High (18)	Low (18)
4	12*	6*	9*	3*
7	12	9	9	6
14	9	9	6	3
21	3	6	-	-
28	-	-	-	-
35	-	-	-	-

Resultados expressos em numero de animais positivos por período. (18), total de animais por período com teste realizado em triplicata. Teste para proporções. (*) Diferenças significativas inter-linhagens (HxL) $p < 0,05$.

4.7 HISTOPATOLOGIA (HEMATOXILINA-EOSINA)

A intensidade e o grau de alterações celulares observadas nos tecidos dos camundongos infectados com o sorovar pomona através da coloração de Hematoxilina e Eosina, se caracterizaram por processo degenerativo a partir do quarto dia pós-inoculação, estendendo-se até o vigésimo oitavo dia de infecção, mesmo em presença de resultados negativos no isolamento em meio de cultivo, variando, entretanto, em diferenças de intensidade de lesões presentes. No quarto dia pós-inoculação foram observadas algumas áreas de degeneração hidrópica em presença de infiltrados inflamatórios, sobretudo polimorfonucleares principalmente próximos a vasos sanguíneos (figura 14). Alguns glomérulos apresentaram hiper celularidade e os túbulos encontravam-se edemaciados. Entre o quarto e o décimo quarto dia, foi observada com mais intensidade nefrite intersticial caracterizada por acúmulo de células mononucleares, presença de congestão com vasodilatação, acompanhada de hiperplasia de túbulos. A severidade das lesões foi progressiva até o décimo quarto dia, havendo a partir deste período declínio de alterações inflamatórias e do grau de degeneração celular.

Entre o quarto e o sétimo dia pós-inoculação as alterações inflamatórias aparentemente foram mais freqüentes nos animais das linhagens H_{IV-A} quando comparados aos animais L_{IV-A}. Entretanto, nos animais maus respondedores a presença de lesões se estendeu até o vigésimo oitavo dia comparados aos animais bons respondedores, onde as lesões foram observadas até o vigésimo primeiro dia pós-inoculação. Nenhum camundongo controle negativo apresentou quaisquer alterações histopatológicas (Figura 15).

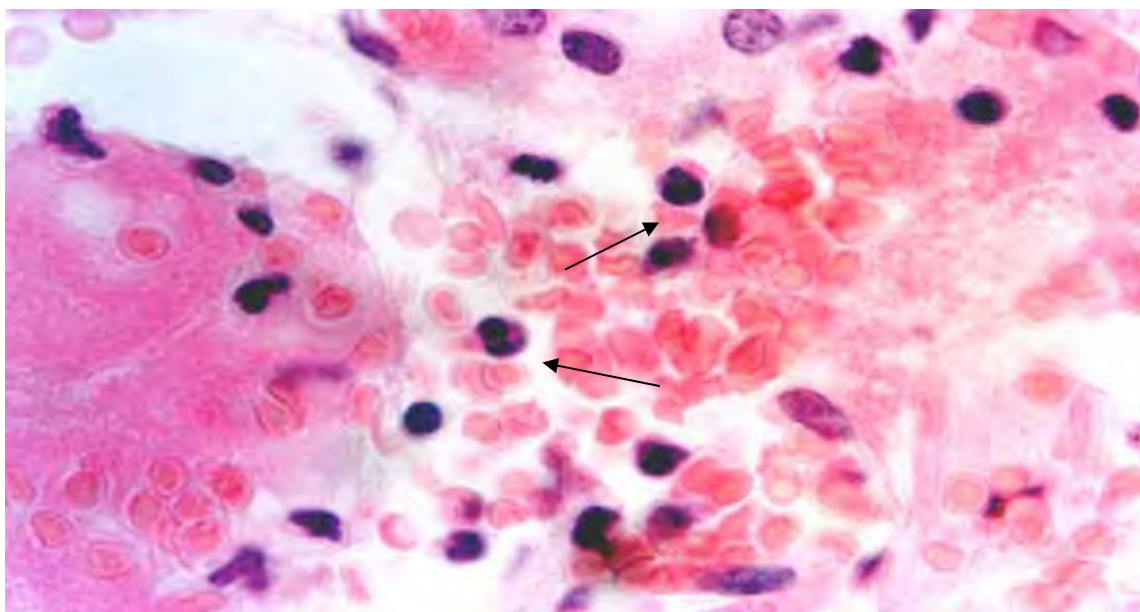


Figura 14. Fotomicrografia de tecido renal de camundongo L_{IV-A} infectado. Presença de congestão, edema e alguns infiltrados inflamatórios (setas). Técnica de Hematoxilina Eosina (H&E), aumento (100X).

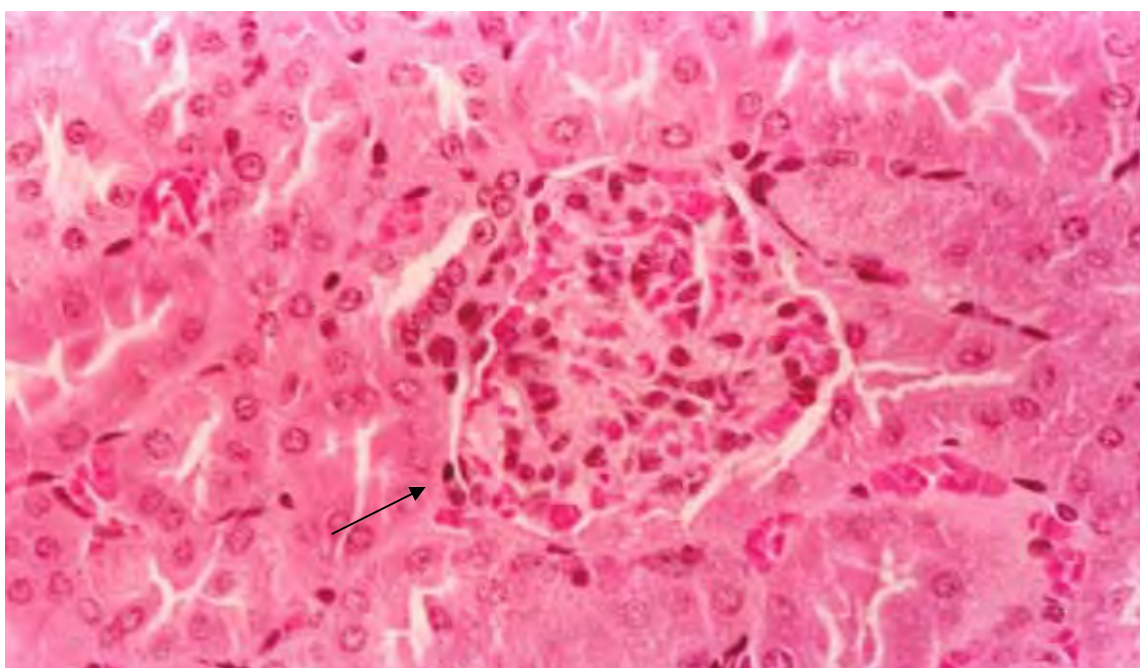


Figura 15. Fotomicrografia de tecido renal de camundongo linhagem H_{IV-A} sadio. Os túbulos e glomérulo (seta) se apresentam com sua morfologia normal. Técnica de Hematoxilina Eosina (H&E), aumento (40X).

*Começai por admirar o que Deus
nos mostra e não terás tempo de
procurar o que Ele nos oculta.*

Alexandre Dumas

Discussão

5. DISCUSSÃO

Nesse trabalho, avaliamos a resistência a infecção pela *Leptospira pomona*, em linhagens H_{IV-A} e L_{IV-A}, analisando o crescimento bacteriano em vários órgãos e a imunidade inata e adaptativa.

A leptospirose constitui-se em uma enfermidade bifásica, tendo início em uma fase aguda, após a penetração da leptospira pelas membranas mucosas ou pele íntegra e a seguir, multiplicando-se ativamente e resultando em leptospiremia, com posterior migração para órgãos de eleição, ocorrendo o desenvolvimento da fase imune, com presença de anticorpos circulantes e opsonizadores.

O modelo murino não é considerado padrão na infecção experimental com os variados sorovares da leptospira, pois geralmente não apresenta desenvolvimento clínico da enfermidade. Os quadros de resistência destes animais aos sorovares da *Leptospira* estão provavelmente relacionados a mecanismos de formação de resposta imune, sobretudo do tipo humoral com os mecanismos imuno-mediados desenvolvendo-se de forma precoce, impossibilitando que variados sorovares se adaptem aos tecidos, dificultando dessa forma sua permanência no hospedeiro^{24,51}. Entretanto, linhagens de camundongos selecionadas quanto à diferenciação na resposta humoral podem apresentar graus variados de resposta antigênica frente a antígenos de multiplicação intracelular e/ou extracelular, em decorrência de variações genéticas quanto à produção de imunoglobulinas e atividade macrofágica. Diferenças na resposta imune apresentada por estas linhagens pode auxiliar na avaliação quanto aos mecanismos de patogenicidade e posterior resistência do hospedeiro frente aos antígenos leptospíricos.

Em trabalho anteriormente realizado, Marinho ¹²⁹ analisou a resposta imune por *Leptospira* sorovar icterohaemorrhagiae nessas linhagens, quando foram analisados parâmetros como recuperação bacteriana, produção de anticorpos, atividade macrofágica, produção de citocinas e análise histopatológica. Os camundongos L_{IV-A} apresentaram-se mais resistentes à infecção com total eliminação do parasita a partir do 14º dia de infecção no fígado e rins, enquanto animais H_{IV-A} apresentaram recuperação nesses órgãos até o 35º dia.

No presente trabalho, a recuperação da *Leptospira interrogans* sorovar pomona, a partir de fragmentos de rins e fígado em camundongos das linhagens H_{IV-A} e L_{IV-A} inoculados com amostra patogênica de *L. pomona*, ocorreu de forma praticamente similar entre as duas linhagens selecionadas até o 14º dia pós-inoculação, quando a linhagem L_{IV-A} apresentou maior contenção do processo infeccioso que a H_{IV-A}. Entretanto, a linhagem H_{IV-A} apresentou total contenção do processo nos dois órgãos analisados após este período, sendo que ainda obtivemos animais L_{IV-A} com leptospiros no fígado até o 21º dia. Esses resultados podem estar relacionados ao metabolismo mais intenso presente nos macrófagos de animais maus respondedores em relação aos bons respondedores, dificultando a apresentação de determinantes antigênicos aos anticorpos específicos pelos macrófagos nos animais da linhagem L_{IV-A}.

Embora os camundongos L_{IV-A} tenham conseguido controlar a infecção de forma mais eficiente, a persistência de recuperação bacteriana no fígado pode ter sido ocasionada por incapacidade de algum isotipo de anticorpos circulantes em conter a adaptação da leptospira nesse órgão como referem alguns trabalhos²⁴, sugerindo que anticorpos são capazes de retirar as leptospiros circulantes, mas algumas bactérias podem permanecer

viáveis nos parênquimas hepático e renal mantendo a viabilidade do agente nestes e em outros tecidos.

A maior recuperação de leptospiros em tecidos da linhagem H_{IV-A} quando comparado a linhagem L_{IV-A} no início do processo infeccioso apresenta dados concordantes com trabalhos de Gheorghiu et al ¹³⁰, estudando a resistência ao *Mycobacterium bovis* (BCG) em camundongos L e H da seleção I. Os autores observaram que esse efeito ocorre de forma mais rápida na linhagem H em relação a L nas duas primeiras semanas pós-infecção. A partir desse momento, a contagem de unidades formadoras de colônias decresceu rapidamente e 12 semanas após, foi encontrado maior número de bactérias viáveis nos maus respondedores quando comparados aos bons respondedores. Esta cinética sugere que na fase inicial a multiplicação do BCG foi muito mais rápida na linhagem H. Os autores sugerem mecanismos associados à falhas no metabolismo de macrófagos dos animais bons respondedores para explicar esta alta recuperação inicial. Entretanto a eliminação posterior do agente denota alta capacidade opsonizante e formação de anticorpos específicos.

As diferenças nos índices de recuperação da *Leptospira* sorovar pomona na seleção IV-A em relação a outros sorovares observados em outros estudos, pode estar relacionado a mecanismos de controle na produção de anticorpos e reposta celular diferenciada, com déficits na produção de metabólitos oxidativos de macrófagos ⁶⁴, mas, sobretudo, associado a fatores de adaptabilidade do agente infeccioso, uma vez que os sorovares apresentam diferenças na sua virulência em relação a alguns hospedeiros, ou seja, são espécie adaptados^{4, 99, 131}.

Os valores decrescentes de recuperação coincidem com os períodos em que houve aumento da produção de imunoglobulinas detectáveis na prova de soroaglutinação

microscópica, demonstrando correlação positiva entre esses dois parâmetros, uma vez que os títulos de anticorpos elevaram-se ao mesmo tempo em que houve decréscimo no potencial de recuperação de leptospiros a partir de rins e fígado.

Alguns trabalhos referem que existem diferenças significativas quanto à infecção de camundongos por alguns sorovares como pomona, ballum, balcânica e hardjo. Altos níveis de anticorpos contra o sorovar pomona podem indicar adaptação do sorovar ao hospedeiro. Entretanto as leptospiros podem ser detectadas, de forma persistente, nos tecidos do hospedeiro mesmo que níveis altos de anticorpos sejam detectados como observado no presente estudo, e em outros trabalhos¹³¹.

Quanto à produção de anticorpos contra *L. pomona* nas linhagens H_{IV-A} e L_{IV-A}, não houve diferenças significativas, apesar dos animais H_{IV-A} produzirem mais anticorpos entre os períodos de 7 a 21 dias. No 35º dia ambas linhagens produziram altos títulos de anticorpos.

Durante o presente estudo, o agente infeccioso foi recuperado nos primeiros dias pós-inoculação. Embora essa recuperação tenha sido observada no início do processo infeccioso, a formação de anticorpos circulantes provavelmente reduziu drasticamente a possibilidade de difusão do agente nos tecidos, auxiliando na eliminação do agente após o 21º dia nas duas linhagens, como resultado, dificultando o isolamento da leptospira em períodos mais tardios pós-inoculação, fato também observado por Adler & Faine,^{51,52}

Esses resultados são parcialmente discordantes de Marinho et al¹³² que analisara a produção de anticorpos das linhagens da seleção IV-A contra *L. icterohaemorrhagiae*. A linhagem H_{IV-A} produziu resposta estatisticamente significativa em relação à linhagem L_{IV-A}, mantendo o efeito multiespecífico normalmente observado nessas linhagens. Quando os

títulos de anticorpos contra *L. icterohamorrhagiae* apresentavam-se baixos, observou-se maior recuperação no meio da infecção. Porém, quando houve um aumento da produção de anticorpos observou-se queda da recuperação das leptospiros, demonstrando que o nível de anticorpos produzidos colaborou em parte como fator limitante da infecção.

Mouton et al¹¹⁹ investigando a resistência inata a *Klebsiella pneumoniae*, não observaram nenhuma diferença entre as linhagens da seleção I, quando quantidades crescentes dessa bactéria, inativadas pelo calor, foram administradas aos animais H e L dez dias antes da inoculação intravenosa letal. Os resultados demonstraram que a dose de vacinação requerida para a proteção é 1000 vezes menor nos camundongos H em relação aos L. O nível de anticorpos produzidos também foi fator limitante para a resistência, pois a transferência passiva do soro imune induziu proteção completa.

Durante o processo infeccioso a formação de células fagocitárias e anticorpos opsonizantes são importantes no controle da enfermidade, dificultando a permanência e adaptação das leptospiros no hospedeiro. No presente estudo foi observado que a formação de anticorpos aglutinantes ocorreu de forma aparentemente semelhante entre as duas linhagens, embora tenham sido observados valores discretamente mais elevados entre os animais da linhagem High em relação a Low, determinando resposta imune multiespecífica, característica observada nas linhagens para boa resposta imune humoral. Aumento em níveis de anticorpos aglutinantes juntamente com a diminuição do percentual de recuperação das leptospiros em órgãos podem ser fatores correlatos, pois a presença de imunoglobulinas reduz a capacidade das leptospiros em permanecer de forma viável em tecidos e órgãos. Em alguns trabalhos não foi possível fazer esta associação⁴⁶, por dificuldades encontradas na tentativa de isolamento em meio de cultivo. Entretanto são

concordantes com trabalhos⁴⁷ que observaram que em presença de anticorpos IgG contra *L. copenhageni* e saprófita isola sacra I associados à presença de macrófagos, houve redução no potencial de recuperação das leptospiros. Resultados semelhantes foram observados por Costa et al⁴⁸ e Sitprija et al⁵⁰ no controle da infecção por leptospiros em tecidos renais e hepáticos.

Embora a resposta imune humoral seja o mecanismo mais importante contra infecções por leptospiros, o sistema imune celular e fagocitário, ainda é pouco conhecido. Portanto, parece ser importante avaliar suas implicações no controle da infecção, visto que uma resposta imune inata, parece ser fator primordial para o início de uma resposta imune adaptativa. Macrófagos conseguem fagocitar leptospiros apatogênicas sem presença de anticorpos específicos, enquanto as amostras patogênicas necessitam de opsonização para que ocorra fagocitose por essas células. Entretanto, outros estudos sugerem que atividade opsonizante não aumenta a fagocitose das leptospiros por macrófagos, pois mesmo sem a presença de anticorpos opsonizantes foi possível observar leptospiros dentro de vacúolos¹³³.

As leptospiros patogênicas podem permanecer no interior de macrófagos sem alteração de sua morfologia. As bactérias saprófitas por sua vez não possuem capacidade de permanecerem viáveis no interior de macrófagos. As leptospiros virulentas também apresentam adaptação diferenciada aos tecidos e células de órgãos de eleição como rins, fígado e pulmão.¹³⁴

Estas células são reconhecidas como essenciais no sistema imune, podendo aumentar ou suprimir reações imunológicas. Várias mudanças na estrutura e função, envolvendo eventos endógenos e secretórios têm sido observados durante a ativação dessas células. Os dois principais mecanismos pelos quais os macrófagos podem ser ativados são:

em consequência de sua interação com o microrganismo e seus produtos, como endotoxinas e componentes da parede celular ¹³⁵ ou por citocinas produzidas por linfócitos CD4⁺ como IFN- γ e TNF- α ^{71,77}.

Uma das alterações metabólicas que ocorrem quando o macrófago é ativado, é o aumento da atividade microbicida, fagocítica e citotóxica ¹³⁶. Macrófagos ativados possuem propriedades microbidas por ação de enzimas lisossômicas, liberação de citocinas como TNF- α e produtos reativos do nitrogênio e oxigênio ⁸⁶

A produção de intermediários do oxigênio e nitrogênio por macrófagos ocorre durante a fagocitose de bactérias, fungos e protozoários sendo que neste estudo a atividade macrofágica nas linhagens L_{IV-A} e H_{IV-A} inoculadas com amostras patogênicas de *Leptospira interrogans* sorovar pomona, foi analisada através da dosagem de produtos reativos do oxigênio (H₂O₂) e nitrogênio (NO).

A produção de H₂O₂ por macrófagos dessas duas linhagens foi avaliada em compartimentos como peritônio, baço e pulmão. Animais controles, não infectados e não submetidos a estímulos não apresentaram diferenças na produção desse metabólito. Linhagens infectadas sem estímulo demonstraram produção endógena de H₂O₂, sendo o padrão de resposta diferente nos compartimentos analisados. A linhagem L_{IV-A} apresentou durante todo o experimento níveis basais de H₂O₂ em células peritoneais e esplênicas, enquanto, no pulmão foi observada inibição em ambas linhagens, com apenas a linhagem L_{IV-A} apresentando-se significativa no 14º dia em relação a H_{IV-A}. Sob estímulo adicional de IFN- γ e PMA, as linhagens apresentaram aumento significativo, que se modificou em relação ao órgão e períodos analisados. O estímulo com IFN- γ e PMA teve por objetivo

verificar o comportamento das células quanto à produção de H_2O_2 , sendo a produção endógena mais abordada.

Nesse estudo pudemos observar que a produção endógena de H_2O_2 na linhagem H_{IV-A} em células peritoneais e esplênicas pode ter auxiliado na contenção do processo infeccioso, visto que, maior produção desse metabólito foi observado em concentrações estatisticamente significantes em relação a L_{IV-A} nesses compartimentos no 14º dia com total recuperação após esse período. Apesar da linhagem L_{IV-A} apresentar produção basal desse metabólito na maioria dos períodos analisados, esses, apresentaram-se aumentados em relação aos controles no 14º e 35º dias no baço e no 28º e 35º dias no peritônio, quando esta linhagem também apresentou total resistência ao processo infeccioso.

Mecanismos microbicidas ativados por macrófagos em presença de citocinas também incluem a presença de óxido nítrico (NO). Macrófagos, monócitos, e linfócitos produzem grande quantidade de NO durante reações imunológicas e choque séptico. As células fagocitárias podem produzir quantidades suficientes de NO para destruir ou inibir o crescimento de inúmeros patógenos de multiplicação intra ou extracelulares.

Macrófagos peritoneais, esplênicos e pulmonares de animais controles não infectados e sem estímulo por $IFN-\gamma$ produziram concentrações idênticas desse metabólito. Em relação aos controles observamos a linhagem H_{IV-A} infectada sem estímulo produzindo mais NO que seus respectivos controles no 35º dia no peritônio e pulmão, e no 14º dia e 35º dia no baço, com as linhagens L_{IV-A} infectadas apresentando produção endógena em relação aos controles no 21º, 28º e 35º dias no peritônio, 14º e 35º dias no baço e 35º dia no pulmão.

Diferenças interlinhagens entre os animais apenas infectados foram observadas em L_{IV-A}, produzindo mais NO que H_{IV-A} no peritônio no 14º dia, 21º e 28º dias e no pulmão no 35º dia, sendo que na linhagem H_{IV-A} esta diferença só foi observada no 35º dia (H_{IV-A} > L_{IV-A}) em macrófagos esplênicos.

Relacionando esses resultados com os obtidos com a recuperação bacteriana, a produção de NO colaborou na contenção do processo infeccioso em períodos mais tardios da infecção (a partir do 14º dia) sendo que na linhagem L_{IV-A} a produção desse metabólito por células esplênicas apresentou maior contribuição. Marangoni et al ¹³³ refere que a produção de NO também parece ser importante na contenção do processo infeccioso gerado em presença da leptospira, sendo que níveis aumentados deste metabólico podem permanecer de horas a dias pós-infecção.

Marinho¹²⁹ analisou a produção de NO nas linhagens da seleção IV-A contra a infecção por *Leptospira icterohaemorrhagiae*, observando aumento significativo na produção desse metabólito em relação aos controles no 2º dia apenas na linhagem L_{IV-A}. Entretanto, células que receberam tratamento com IFN- γ apresentaram níveis elevados de produção em todos os períodos analisados e em ambas linhagens. Esse efeito também foi observado no presente estudo com a infecção por *L. pomona*. O tratamento com IFN- γ e /ou PMA sobre a produção de H₂O₂ e IFN- γ na produção de NO demonstrou que em alguns compartimentos e períodos analisados a *L. pomona* funcionou como “sinalizador” para que esta célula produzisse esse metabólito.

Alguns trabalhos¹³⁷, utilizando camundongos Knockout para avaliar a produção de H₂O₂ e NO em infecções por *Rhodococcus equi*, demonstraram em experimento “in vitro” que camundongos deficientes em quaisquer das duas vias de ativação macrofágica foram

susceptíveis à infecção, sendo que, nem o superóxido, nem o NO sozinhos foram suficientes para eliminar o agente. A combinação de ambos os radicais para formar peroxinitrito resultou em efeito sinérgico, com rápida e eficiente morte do patógeno por macrófagos ativados, principalmente sob estímulo de IFN- γ .

O peroxinitrito tem demonstrado possuir maior toxicidade que o NO para *Escherichia coli*¹³⁸, *Salmonella* entérica sorovar typhimurium¹³⁹, *Mycoplasma pulmonis*¹⁴⁰ e *Candida albicans*¹⁴¹. Nesses modelos experimentais ambos os radicais de oxigênio e nitrogênio são necessários para mediar o efeito microbicida máximo. Em outros sistemas experimentais, entretanto, o NO parece ser mais tóxico que o peroxinitrito, como observado na *Leishmania major*¹⁴², *Giardia lamblia*¹⁴³ e *Cryptococcus neoformans*¹⁴⁴.

A produção de NO necessita da presença de IFN- γ , o qual apresenta papel importante como fator de ativação de macrófagos e como sinal primário para a transcrição da enzima iNOS. Na imunidade inata, os sinais para a ativação dos macrófagos podem ser proveniente do patógeno e das células NK, que são fonte de IFN- γ , ou a ativação pode ser conferida por linfócitos T na imunidade mediada por células¹⁴⁵.

Produção de fator de necrose tumoral (TNF- α), como parâmetro da atividade macrofágica, também foi avaliada no presente experimento.

Os níveis de TNF- α no soro da linhagem L_{IV-A} infectada foram mais elevados aos sete, 21 e 35 dias, com diferenças significativas inter-linhagens apenas no 21º dia. A produção de TNF- α obtida por células esplênicas apresentou diferenças significativas entre as duas linhagens e seus respectivos controles, sendo que a linhagem H_{IV-A} produziu mais TNF- α que a linhagem L_{IV-A} no 4º e 35º dias pós-inoculação, o mesmo foi observado na análise da produção dessa citocina em células do pulmão.

Em células hepáticas a produção de TNF- α na linhagem H_{IV-A} apresentou inibição no início da infecção, elevando a produção nos períodos subseqüentes. Já a linhagem L_{IV-A} apresentou maior produção em relação aos controles no 7º, 21º e 28º dias, sendo que diferenças interlinhagens ocorreram apenas no 35º dia (H_{IV-A} > L_{IV-A}).

Esses resultados demonstram que o TNF- α foi coadjuvante na contenção do processo infeccioso em ambas linhagens, sendo que a análise na produção dessa citocina na linhagem H_{IV-A} em células hepáticas evidencia a importância dessa citocina na contenção do processo infeccioso. Estes dados são concordantes com Marangoni et al,¹⁰² que analisou a produção desta citocina por macrófagos hepáticos relacionando esta produção com a presença do LPS da *Leptospira interrogans* sorovar icterohaemorrhagiae.

Marinho¹²⁹ analisando a produção de TNF- α das linhagens H_{IV-A} e L_{IV-A} contra *Leptospira icterohaemorrhagiae*, observou a produção elevada na linhagem L_{IV-A} no início da infecção e até o 14º dia este nível apesar de não significativo manteve-se estável. Após esse período, ocorreu inibição da produção de TNF- α , justamente no momento em que não se recuperou mais leptospiros. O mesmo foi observado para a linhagem H_{IV-A}. Cinco et al¹⁴⁶ observaram níveis elevados de TNF- α em pacientes com leptospirose e correlacionaram a sua produção ao estímulo produzido em decorrência da presença de peptidoglicano da leptospira.

Em outro estudo a expressão do mRNA para TNF- α foi analisada em soros de hamsters infectados com cepas patogênicas de *Leptospira interrogans* sorovar icterohaemorrhagiae, através do PCR, sendo esta citocina observada já nas primeiras 24 horas pós-inoculação e conjuntamente com o aparecimento posterior de IFN- γ parece exercer efeitos sobre o controle da infecção bem como sobre o agravamento das lesões¹⁴⁷.

Substancias tóxicas, patógenos ou produtos de seu catabolismo podem ocasionar alterações em tecidos renais, resultando em perda de função renal permanente ou temporária. Dentre os parâmetros para avaliar a filtração glomerular podemos analisar níveis séricos de uréia e creatinina que podem se encontrar aumentados em alguns tipos de disfunção renal.

Aumento em valores séricos de uréia estavam presentes nas duas linhagens analisadas, sendo ligeiramente mais elevado na linhagem má respondedora (Low) em relação à linhagem para a boa resposta (High), esse fato pode estar relacionado a menor capacidade de produção de anticorpos específicos desta linhagem nos primeiros períodos pós-infecção. Falhas na capacidade de opsonização no início da infecção, podem ter favorecido adaptação inicial dos antígenos nos tecidos comprometendo a função renal.

Apesar de níveis aumentados de uréia durante os períodos em que os animais foram analisados, nenhuma alteração clínica como irritabilidade, tremores, lordoses e flexões anormais de cabeça ou lesões teciduais irreversíveis foi observada. Alterações neurológicas em decorrência de níveis elevados de uréia, podem ocorrer por incapacidade dos rins em excretar esses metabólitos ⁴⁵. Entretanto, nesse trabalho alterações teciduais provenientes da presença do antígeno e células inflamatórias se encontravam de forma moderada em quase todos os períodos analisados, o que justifica os níveis considerados leves de uréia encontrados nas duas linhagens.

Alguns autores ³² descrevem que em animais apresentando insuficiência renal, níveis de uréia séricos foram considerados leves (40 a 80mg/dl), com perda de função renal em torno de 46%. Entretanto, essa disfunção não interferiu com a filtração glomerular mesmo em presença de estímulo irritante. Este fato que também pôde ser observado no

presente trabalho visto que os animais não apresentavam alterações clínicas e, sobretudo pelos níveis moderados de uréia encontrados, que podem ser indicativos de prognóstico positivo em relação à reestruturação tecidual.

Embora camundongos da linhagem Low tenham conseguido controlar o agente infeccioso sobretudo no início da infecção, os níveis de uréia que podem ser considerados parâmetros de avaliação da função renal, se encontraram mais elevados nessa linhagem em alguns períodos analisados. Esses fatos podem indicar que mecanismos independentes da presença do antígeno tecidual podem influenciar na persistência de lesões teciduais, como a presença de citocinas ou outros mediadores imunológicos e inflamatórios³⁰. Outros trabalhos^{57,58} também associaram a histopatologia da leptospirose com a presença de agregação de infiltrados inflamatórios, sobretudo no córtex tubular renal.

Níveis normais de creatinina encontrados nas linhagens analisadas como também descrito por alguns autores³², parece indicar que efeitos da bactéria e suas toxinas associadas à reação inflamatória local, não afetaram a função renal de forma irreversível, determinando essas linhagens como animais potencialmente resistentes aos mecanismos de patogenicidade da *Leptospira pomona*, uma vez que a permanência do agente infeccioso nos tecidos renais provavelmente foi controlada inicialmente por mecanismos dependentes de macrófagos e seus produtos metabólicos.

Ausência de níveis séricos detectáveis de creatinina, não exclui a possibilidade de lesões renais provenientes de fatores irritantes como toxinas bacterianas, agentes químicos e imunes complexos formados em decorrência de processo inflamatório²⁶, uma vez que no presente estudo foram encontradas alterações celulares nos tecidos renais mesmo na ausência de creatinina sérica.

Como em outros estudos ¹⁴⁸ os valores de uréia e creatinina encontrados indicam que houve azotemia do tipo pré-renal, por fatores sistêmicos em presença do agente, revelando que os animais foram capazes de controlar o processo infeccioso, pois os tecidos renais demonstraram boa recuperação nos períodos finais da infecção.

A utilização dos níveis séricos de uréia e creatinina podem ser bons parâmetros para avaliação da função renal e, sobretudo em relação ao prognóstico das lesões presentes.

A avaliação da presença de antígenos teciduais através de provas que utilizam enzimas como marcadores pode ser útil na investigação de mecanismos de patogenicidade presentes em alguns microrganismos.

Nos cortes histológicos avaliados pela técnica de imunoperoxidase, a forma de apresentação das leptospiros, a coloração e sua disposição nos tecidos, foram semelhantes às encontradas por Alves et al¹ e Scanziani et al⁴⁵. A menor intensidade de coloração apresentada em algumas amostras analisadas pode estar relacionada à distribuição ao acaso das leptospiros nos tecidos fixados como também observada por Taylor³⁸ e Ellis et al⁴³ ou a mecanismos de resistência das linhagens que possibilitaram a redução dos antígenos nos tecidos renais, reduzindo dessa forma a intensidade de coloração principalmente a partir do 14º dia pós-inoculação.

A disposição das leptospiros de forma dispersa nos tecidos, formando fragmentos ou isoladas, foram também relatados por alguns autores^{38,43,1,45}, que consideraram amostras positivas mesmo quando o agente se encontrava fragmentado. Entretanto são discordantes de outros trabalhos ^{149,150,151,152} que referem a visualização do antígeno claramente nos tecidos, isoladamente com sua morfologia típica formando corpos alongados de coloração marrom, observados em microscopia de luz clara.

A visualização e disposição das leptospiiras observadas nos cortes renais, mesmo quando não foi possível caracterizar o antígeno na sua forma íntegra, denota positividade em virtude da presença de coloração dada pelo cromógeno diaminobenzidina, indicativo de reação antígeno-anticorpo marcado com a peroxidase conforme também relatado por outros autores^{38,43, 45}.

O anticorpo primário produzido contra os determinantes antigênicos do sorovar pomona identificou através da imunohistoquímica, o agente nos tecidos, demonstrando altos níveis de especificidade (100%) em cortes formalizados e emblocados em parafina, achados esses também observados em outros estudos^{153, 43, 1}. A especificidade da técnica imunoistoquímica utilizando a peroxidase foi confirmada através da não coloração dos cortes e impressões pelo DAB, em consequência da omissão do anticorpo primário, absorção do mesmo com leptospiiras formalizadas, como também pela ausência de reação nos controles negativos. Resultados também verificados por outros autores^{149,38,43,1}, utilizando pelo menos um dos métodos presentes nesse trabalho.

Quando comparamos resultados de recuperação com a identificação do antígeno em tecido através da imunoperoxidase, observamos que a sensibilidade do teste imunoistoquímico foi estatisticamente significativa apenas no 4º dia pós-inoculação em relação às duas linhagens. Entretanto houve boa concordância em alguns períodos analisados como os observados na linhagem H_{IV-A} no 14º período pós-inoculação e na linhagem L_{IV-A} no 7º período. Analisando-se os resultados obtidos parece ter havido maior eficiência da técnica imunoistoquímica em detectar as leptospiiras em tecidos renais, fato que pode estar relacionado a dificuldades inerentes ao isolamento, como sensibilidade das leptospiiras quando em meio de cultivo, ou quantidades ineficientes do agente que

impossibilitaram seu isolamento, fator que pôde ser observado em alguns estudos³⁴, analisando técnicas imunológicas e o cultivo na identificação da *L. hardjo*, e outros trabalhos⁴⁵ comparando a imunoistoquímica com o cultivo na identificação da leptospira em tecidos renais suínos.

Apesar de camundongos da linhagem H_{IV-A} terem apresentado maior número de amostras positivas nos tecidos renais até o 14º período pós-inoculação, essa linhagem conseguiu eliminar as leptospiros com maior eficiência e rapidez em relação as linhagem L_{IV-A}. Tal fato pode estar associado à presença de complexos imunes, e posterior formação de anticorpos circulantes que nas linhagem H_{IV-A} pode ter ocorrido de forma mais eficiente, como descrito em estudos⁵¹ utilizando camundongos imunossuprimidos.

Menor número de amostras positivas nos fragmentos de tecidos renais associado a níveis de recuperação também inferiores dos camundongos L_{IV-A} em relação à linhagem H_{IV-A} nos primeiros períodos pós-inoculação, sugere que mecanismos relacionados ao metabolismo acelerado de macrófagos nessa linhagem L_{IV-A} tenha favorecido a eliminação inicial mais eficiente da leptospira. Por outro lado pode também indicar que este rápido metabolismo possa impedir que macrófagos exibam determinantes antigênicos de forma adequada, resultando em resposta imune humoral menos eficiente, pelo menos no início do processo infeccioso e são concordantes com outros estudos^{114,115,116,117}. Entretanto, esses resultados parecem ser discordantes de trabalhos¹¹¹ que referem não haver similaridades entre a atividade de macrófagos e aumento da atividade imune humoral nas seleções III e IV.

Cerca de 5 a 10% das infecções causadas pela leptospira afeta diferentes órgãos como fígado, rins e lesões pulmonares. Nos casos em que se caracteriza a doença na sua

forma mais grave caracterizada como Doença de Weil, ocorre além de sinais como febre e icterícia, lesões severas em órgãos resultando em insuficiência renal e hepática, sendo a nefrite tubular e lesão mais comumente encontrada¹⁵⁴.

As alterações nos tecidos renais em decorrência da presença do antígeno leptospírico, associado a fatores inflamatórios com presença de linfócitos, macrófagos, monócitos, células plasmáticas, entre outros, auxilia no controle da infecção, mas também, favorece graus variáveis de lesão celular, que pode resultar em danos irreversíveis à função do órgão se o estímulo antigênico persistir por longos períodos^{18,22}.

A leptospira pode estar presente no sítio de infecção, independente da presença de resposta humoral ou celular. Constituintes da parede externa bacteriana como lipopolisacárides, glicolipídeos e lipoproteínas, são fatores determinantes da virulência, e estão associados à permanência do agente nos tecidos renais. Alguns estudos¹⁵⁵ sugerem que embora possam estar aparentemente saudáveis, os camundongos são susceptíveis a colonização de alguns tipos de leptospiras, sendo a capacidade de provocar lesões em tecidos dependente de fatores ligados a adaptação de microrganismos aos tecidos do hospedeiro.

As alterações degenerativas apresentadas pelos animais infectados foram concordantes com outros estudos,^{19,25} que referem proliferação de células inflamatórias principalmente nos períodos iniciais de infecção. Alterações em presença do sorovar podem estar associadas a mecanismos de toxicidade provenientes dos antígenos bacterianos como LPS, glicoliproteínas, que podem estimular células imunomediadas como leucócitos mononucleares no início da infecção, e sistema complemento e células responsáveis pelo resposta imune humoral nos períodos mais avançados da enfermidade.

A intensidade de lesões inflamatórias presentes nos animais H_{IV-A} coincide com a dificuldade inicial desses animais em processar e eliminar o agente infeccioso mais rapidamente em relação as linhagens L_{IV-A} como foi observado na recuperação, pois a presença da leptospira e infiltrados inflamatórios no tecidos pode contribuir para o agravamento das lesões, fato também observado por Chen³⁰.

De uma forma geral, o estudo da infecção pela *Leptospira pomona* nas linhagens demonstrou que a produção de anticorpos e a atividade macrofágica são importantes na contenção do processo infeccioso que variaram de acordo com o compartimento e os períodos analisados. Os resultados comparados a trabalhos com outros sorovares demonstraram modificações parciais de um caráter imunológico geneticamente selecionado, por um agente externo e não específico.

*A caridade é a capacidade de
defender o que sabemos ser
indispensável.*

Chesterton

Condições

6. CONCLUSÕES

1. Camundongos H e L da seleção IV-A foram eficientes em controlar o processo infeccioso.
2. Valores decrescentes nas taxas de recuperação coincidiram com níveis elevados de anticorpos apresentados entre as linhagens, demonstrando que houve associação entre a produção de anticorpos e a contenção do processo infeccioso.
3. A produção de H_2O_2 , NO e $TNF-\alpha$ por macrófagos de animais infectados demonstrou a ativação destas células durante a infecção e se associou com a contenção do processo infeccioso.
4. Níveis séricos de uréia embora tendo sido considerados próximos de valores normais, justifica as lesões apresentadas principalmente no início do processo infeccioso, sendo que a dosagem desse metabólito pode ser utilizada na avaliação de lesões em decorrência de processos tóxicos e/ou infecciosos.
5. Níveis mais elevados de uréia presentes na linhagem L_{IV-A} coincidiram com a persistência de lesões em relação à linhagem H_{IV-A} , indicando que mecanismos independentes da presença do antígeno podem favorecer a persistência de lesões.
6. A presença de leptospiros em cortes renais foi confirmada pela técnica imunoistoquímica, sendo que essa foi mais sensível que o cultivo principalmente no início do processo infeccioso.
7. Camundongos da linhagem para a boa (H_{IV-A}) ou má (L_{IV-A}) resposta a anticorpos, podem ser úteis na investigação de mecanismos relacionados à resistência do hospedeiro à leptospirose.

*Não poderá ser mestre na escrita e
leitura sem ter sido antes aluno.*

Marco Aurélio

Referências

7. REFERÊNCIAS ¹

1. Alves V A F, Yasuda P H, Yamashiro E H, Santos R T M, Yamamoto L V, Brito T. An immunohistochemical assay to localize *Leptospira* in tissue specimens. Rev Inst Med Trop São Paulo 1986; 28:170-173.
2. Lee S H K A, Kim Y G, Park I W, Seang M J, Lee I J. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. Gene 2000; 254: 19-28.
3. Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. Microbiol Infect 2000; 2: 1265-1276.
4. Levett P N. Leptospirosis. Clin Microbiol Vet 2001; 14: 296-326.
5. Bharti A R J E, Nally J N, Ricaldi M A, Matthias M M, Diaz M A Levett P N, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis 2003; 3: 757-771.
6. Souza D. Leptoseptose humana-Infeção em habitantes do vale do Rio Aricanduva, município de São Paulo, 1984-5. Rev Esc Enferm USP 1988; 22: 159-168.
7. Merien F, Baranton G, Perolat P. Invasion of vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. Infect Immun 1997; 65: 729-738.
8. Lomar A V. Leptospiroses. In: VERONESI R, editor. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu, 1996, p. 987-1003.

¹ International Committee of Medical Journal Editors. Requisitos uniformes para manuscritos apresentados a periódicos biomédicos. Rev Saúde Publica USP 1999; 33:6-15.

9. Nagy G. Comparative pathogenicity study of *Leptospira interrogans* serovar pomona strains. Acta Vet Hung 1993; 41:315-324.
10. Heath E S, Johnson R. Leptospirosis. J Am Vet Med Assoc. 1994; 205: 1518-1523.
11. Santa Rosa C A. Diagnóstico Laboratorial das Leptospiroses. Rev Microbiol 1970; 1: 97-109.
12. Michna S W, Campbell R S F. Leptospirosis in pigs: Epidemiology, Microbiology and Pathology. Vet Rec 1969; 84: 135-138.
13. Santa Rosa C A, Lacaz C S, Machado P A, Yanaguita R M, Castrillon A L, Ferraroni J J, Fonseca O J. Leptospire no Estado do Amazonas: Inquérito sorológico. Rev Inst Med Trop São Paulo 1980; 22: 265-268.
14. Acha P N, Szyfres B E. Bacteriosis. In: OPAS-OMS editors. Zoonosis y Enfermedades transmissibles communes al hombre y aos animals. Washington-DC. Pub. Cient. n. 503, 1993.
15. Smythe, L D. Leptospirosis workwise. Wkly Epidemiol Rec 1999; 76: 109-116.
16. Brito T. On the pathogenesis of the hepatic and renal lesions in leptospirosis. Rev Int Med Trop 1968; 10: 1001-1003.
17. Kunori T, Fehrman I, Ringdén O, Moller E.. In vitro characterization of immunological responsiveness of uremic patients. Nephron 1980; 26: 234-239.
18. Yamashiro-Kanashiro E H, Bernard G, Sato M N, Seguro A C, Duarte A J S. Cellular immune response analysis of patients with leptospirosis. Am J Trop Med Hyg. 1991; 45: 138-145.

19. Alves J A, Vasconcellos S A, Camargo C R A, Macedo N A. de, Moraes Z M de, et al. Influência da estimulação inespecífica com o BCG sobre a susceptibilidade do hamster à infecção experimental por *Leptospira interrogans* sorovar pomona. Braz J Vet Res Anim Sci 1992; 29: 193-199.
20. Ferguson K L C, Ramge J C, Sanger V L. Experimental bovine leptospirosis. Am J Vet Res 1957; 18: 43-49.
21. Sanger V L, Hamdy A H, Fizette W H, Bohl E H, Ferguson L C. *Leptospira pomona* infection in hamsters. Cornell Vet 1961; 51: 489-498.
22. Abdu M T F, Sleight S D. Pathology of experimental *Leptospira pomona* infection in hamsters. Cornell Vet 1965; 55: 74-86.
23. Badiola J, Thierman A B, Cheville N F. Pathologic features of leptospirosis in hamsters caused by *Leptospira interrogans* serovar hardjo and szwajizak. Am J Vet Res 1983; 44: 91-99.
24. Faine S, Phil D. Reticuloendothelial phagocytosis of virulent leptospiras. Am J Vet Res 1964; 25: 830-835.
25. De B N, Chatterjee A, Bidyanta J, Deb S K, Sen G P. Studies on leptospiral abortion in cattle. Indian J Anim Health 1983; Dec: 143-145.
26. Dunn S R, Qi Z, Bottinger E P, Breyer M D, Sharma K. Utility of endogenous creatinine clearance as a measure of renal function in mice. Kidney Int 2004; 65: 1959-1967.
27. Burne-Tuney M J, Kofler J, Yokota N, Weisfeldt M, Traystman R J, Rabb H. Acute renal failure after whole body ischemia is characterized by inflammation and T cell-mediated injury. Am J Physiol Renal Physiol 2003; 285: f 87-f 94.

28. Melnikov V Y, Faubel S, Siegmund B, Lucia M S, Ljubanovic D, Edelstein C L. Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1-and IL-8- mediated ischemic acute tubular necrosis in mice. J Clin Invest 2002; 110: 1083-1091.
29. Masunaga T, Hirabayashi M, Takahira R, Imai E, Kawanishi G. Renal anemia in polycystic kidney disease mouse. J Vet Med Sci 1991; 53: 621-627.
30. Chen A. Interleukin-1 receptor antagonist modulates the progression of a spontaneously occurring IgA nephropathy in mice. Am J Kid Dis. 1997; 30: 693-702.
31. Ponraj D, Gopalakrishnakone P. Renal lesions in rhabdomyolysis caused by *Pseudechis australis* snake mytoxin. Kid Int 1969; 51: 1956-1969.
32. Ormrod D, Miller T. Experimental uremia. Nephron 1980; 26: 249-254.
33. Pinto A A, Santa Rosa C A, Sadatsune T, Fkeury G C. Comparative study between complement fixation and microscopic agglutination tests for leptospiral diagnosis. Rev Int Med Trop São Paulo 1974; 16: 28-31.
34. Bolin M, Zuerner R L, Trueba G. Comparison of three techiques to detect *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type Hardjo-bovis in bovine urine. Am J Vet Res 1989; 50: 1001-1003.
35. Maestrone G. The use in improved fluorescent antibody procedure in the demonstration of *Leptospira* in animal tissues. Can J Comp Med Vet Sci 1963; 27: 109-112.
36. Filho, G B, Barbosa. A J A, Miranda, D. Métodos de estudo em patologia. In: Bongliolo, L, editor. Patologia geral. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 1993: p.26.

37. Tripathy D N, Hanson L E. Immunoperoxidase staining of leptospires. *Appl Microbiol* 1974; 27: 268-269.
38. Taylor C R. Immunoperoxidase techniques: Practical and theoretical aspects. *Arch Pathol Lab Med* 1978; 102: 113-121.
39. Gangadhar N L, Rejasekhar M. A modified silver impregnation staining for leptospires. *Ind Vet J* 1998; 75: 349-351.
40. Avrameas S. Immunoenzyme techniques: enzymes markers for the localization of antigens and antibodies. *Int Vet Cytol* 1970; 2: 349-385.
41. Kurstak E. The immunoperoxidase technique localization of visual antigens in cells. *Methods Virol* 1971; 5: 423-444.
42. Petts V, Roitt J M. Peroxidase conjugates for demonstration of tissue antibodies: Evolution of the technique. *Clin Exp Immunol* 1971; 9: 407-418.
43. Ellis T M., Robertson G M., Huston L, Kirby M. Detection of leptospires in tissue using an immunoperoxidase staining procedure. *Aust Vet J* 1983; 68: 364-367.
44. Alves V A F, Vianna M R, Yasuda P H, Brito T. Detection of Leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. *J Pathol* 1987; 151: 123-131.
45. Scanziani E, Luini M, Fabbi M, Pizzocaro P. Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of renal leptospirosis of pigs. *Res Vet Sci* 1991; 50: 229-232.
46. Songer J G, Chilelli C J, Reed R E, Trautman R J. Leptospirosis in rodents from an arid enviroment. *Am J Vet Res* 1983; 44: 1973-1977.

47. Banfi E, Cinco M, Bellini M, Soranzo M S. The role antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospires. J. Gen Micro 1982; 128: 813-816.
48. Costa A V, Silva I V, Miranda Filho G, Silva V V, Caldas E M, Brito E, et al. Estudo imunológico da leptospirose. Rev Inst Adolfo Lutz 1981; 41: 93-100.
49. Alt D P, Bolin C. Preliminary evaluation of antimicrobial agents for treatment of *Leptospira interrogans* serovar pomona infection in hamsters and swine. Am J Vet Res 1996; 57: 59-62.
50. Sitprija V, Pipatanagul V, Mertowidjojo K, Boonpucknavig V, Boonpuknavig S. Pathogenesis of renal diseases in leptosirosis: Clinical and experimental studies. Kidney Inter 1980; 17: 827-836.
51. Adler B, Faine S. Susceptibility of mice treat with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* serovar pomona. Infect Immun 1976; 14: 703-708.
52. Adler B, Faine S. Serological and protective-antibody response of rabbits to leptospiral antigens. J Med Micro 1978; 11: .401-409.
53. Ingh T S G A M, Hartman E G. Pathology of acute *Leptospira interrogans* sorotype Icterohaemorrhagiae infection in the syrian hamsters. Vet Micro 1986; 12: 367-376.
54. Johnson R C, Haaris V G. Antileptosiral activity of serum. II. Leptospiral virulence factor. J Bact 1967; 93: 513-519.
55. Cinco M, Banfi E. Activation of complement by leptospires and its bactericidal activy. Zbl Bakt Hyg I Abt Orig A 1983; 254: 261-265.

56. Werth et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nature Immunol* 2001; 2:346-352.
57. Isogai E, Isogai H, Fujii N, Oguma K. Macrophage activation by leptospiral lipopolysaccharide. *Zbl Bakt* 1990; 273: 200-208.
58. Faine, S, editors. Pathogenesis, Virulence and Immunity, In: *Leptospira and Leptospirosis*. Boca-Raton/Florida : CRC-Press, 1994, 353 pgs.
59. MacMicking J, Xie Q, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev Immunol* 1997; 15: 323-350.
60. Macgrath H, et al. Phagocytosis of virulent and avirulent leptospires by guinea-pig and human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Pathol* 1984; 16: 243-249.
61. Farrelly H E, Adler B, Faine S. Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *J Med Microbiol* 1987;23: 1-7.
62. Takase H, Yanagawa R. Opsonic effect of monoclonal antibodies against *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. *Vet Microb* 1988; 16: 167-180.
63. Cinco M, Perticarai S, Presani G, Dobrina A, Liut F. Biological activity of a peptideoglycan extracted from *Leptospira interrogans*: in vitro studies *J Gen Microbiol* 1993; 139: 2959-2964.
64. Cinco M, Banfi E, Soranzo M R. Studies on the interaction between macrophages and leptospires. *J Gen Microbiol* 1981; 124: 409-413.

65. Cheville N F, Hurin R, Cutlip R. Ultrastructure of renal lesions in pigs with acute Leptospirosis caused by *Leptospira pomona*. Vet Pathol 1980; 17: 338-351.
66. Isogai E, Kitagawa H, Isogai H, Kurebayashi Y, Ito N. Phagocytosis as a defense mechanism against infection with leptospiras. Zlb Bakt Hyg A 1986; 261: 65-74.
67. Tu V, Adler B, Faine S. The role of macrophages in the protection of mice against leptospire: in vitro an in vivo studies. Pathology 1982; 14: 463-468.
68. Los M, Droge W, kirstin S, Baeuerle P A, Osthoff-Schulza K. Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. Eur J Immunol 1995; 25: 159-165.
69. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. J Immu Meth 1980; 38: 161-170.
70. Phillips W A & Hamilton J A. Phorbol eter-estimated superoxide production by murine bone marrow-derived macrophages requires preexposure to cytokines. J Immunol 1989; 142: 2445-2449.
71. Nathan C F, Michael M, Wiebe E, Rubin B Y. Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. J Exp Med 1983; 158: 670-689.
72. Nacy C A, Fortier A H, Meltzer M S, Buchmeier N A, Schreiber R D. Macrophage activation to kill *Leishmania major*: Activation of macrophages for intracellular destruction of amastigotes can be induced by both recombinant interferon- γ and non-interferon lymphokines. J Immunol 1985; 135: 3505-3511.
73. Beaman L. Fungal activation of murine macrophages by recombinant gamma interferon. Infect Immun 1987; 55: 2951-2955.

74. Reed S G, Nathan C F, Rodricks P, Shaorebeck K, Conlon P J, Grabstein, K H. Recombinant granulocyte macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. J Exp Med 1987; 166: 1734-1746.
75. Wirth J J, Kierszembaum F, Sonnenfeld G, Zlotnik A. Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cell association with and killing of *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun 1985; 49: 61-66.
76. Kagaya K, Watanabe K, Fukazawa Y. Capacity of recombinant gamma interferon to activate macrophages for *Salmonella*-killing activity. Infect Immun 1989; 57: 609-615.
77. Hoffman M, Weinberg J B. Tumor necrosis factor- α induces increased hydrogen peroxide production and Fc receptor expression, but not increased Ia antigen expression by peritoneal macrophages. J Leuk Biol 1987; 42: 704-707.
78. Haidaris C G, Bonventre P F A. A role for oxygen-dependent mechanisms in killing of *Leishmania donovani* tissue forms by activated macrophage. J Immunol 1982; 129: 850-855.
79. Pace J L, Russell S W, Schreiber R D, Altmann A, Katz D H.. Macrophage activation: Priming activity from a T-cell hybridoma is attributable to interferon- γ . Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 3782-3786.
80. Buchmuller-Rouiller Y, Mauel J. Correlation between enhanced oxidative metabolism and leishmanicidal activity in activated macrophages from healer and nonhealer mouse strains. J Immunol 1986; 136: 3884-3890.

81. Nathan C, Nogueira N, Juangbhanich C, Ellis J, Conh Z. Activation of macrophages in vivo and in vitro: Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. J Exp Med 1979; 149: 1056-1068.
82. Cano L E, Singer-Vermes L M, Vaz C A C, Russo M, Cáliz V L G. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: Relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response and specific isotype patterns. Infect Immun 1995; 63: 1777-1783.
83. Nathan C F, Root R K. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages. J Exp Med 1977; 146: 1648-1662.
84. Murgia R, Garcia R, Cinco M. Leptospirae are killed in vitro by both oxygen-dependent and - independent reactions. Infect Immun 2002; 70: 7172-7175.
85. Chan J, Xing Y, Magliozzo R S, Bloom B R. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. J Exp Med 1992; 175: 1111-1122.
86. Adams H R. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. J Am Vet Med Assoc 1996; 209: 1297-1302.
87. Marcinkiewicz J, Chain B M. Differential regulation of cytokine production by nitric oxide. Immunol. 1993; 80: 146-150.
88. Park J, Rikihisa Y. L-arginine-dependent killing of intracellular *Ehrlichia risticii* by macrophages treated with gamma interferon. Infect Immun 1992; 60: 3504-3508.
89. Yang C T, Wu M S, Pan M J, Hsieh W J, Vandewalle A, Huang C C. The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-

- mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2037-2045.
90. Albina J E, Abate J A, Henry Jr W L. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated t cell proliferation. *J Immunol* 1991; 147: 144-148.
 91. Whicher J T, Evans S W. Cytokines in tissues. *Clin Chem* 1990; 36-7: 1269-1281.
 92. Wagner R, Myres R R S. Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: Expression in injured and non-injured nerves. *NeuroSci* 1996; 73: 625-629.
 93. Bienvenu J A D, Monneret G, Gutowski M CL, Fabien N. Cytokine assay in human sera and tissues. *Toxic* 1998; 129: 55-61.
 94. Forséni M, Melhus A, Ryan A F, Bagger-Sjöbäck D, Hultcrantz M. Detection and localization of interleukin-6 in the rat middle ear during experimental acute otitis media, using mRNA in situ hybridization and immunohistochemistry. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2001; 57: 115-121.
 95. Kenefick K B, Lederer J A, Schell R F, Czuprynski C J. *Borrelia burgdorferi* stimulates release of Interleukin-1 activity from bovine peripheral monocytes. *Infect Immun* 1992; 6:3630-3634.
 96. Champs J, Young L S, Bermudez L E. Production of TNF- α and TNF- β , and expression of receptors for TNF- α and IL-6 murine *Mycobacterium avium* infection. *Immunol*. 1995; 84: 549-554.
 97. Tabel H, Kaushik R S, Uzonna J E. Susceptibility and resistance to *Trypanosoma congolensis* infections. *Microb Infect* 2000; 2: 1619-1629.

98. Isogai E, Isogai H, Kubota T, Fujii N, Hayashi S, Indoh T, et al. Apoptosis of lymphocytes in mice administer Lipopolyssacharide from *Leptospira interrogans*. J Vet Med B 1998; 45: 529-537.

99. Klimpel G R, Mathias M A, Vinetz J M. *Leptospira interrogans* activation of human peripheral blood mononuclear cells. Preferential Expansion of TCR $\gamma\delta^+$ T cells vs TCR $\alpha\beta^+$ T cells. J Immunol 2003; 171: 1447-1455.

100. Mosmann T R, Fong T A T. Specific assays for cytokines production by T cells. J Immunol Methods 1989; 116: 151-158.

101. Gogusev J, Augusti M, Chrétien Y, Droz D. Interleukin-6 TNF α production in human renal cell carcinoma. Kidney Int 1993; 44: 585-592.

102. Marangoni A, Aldini R, Sambri V, Giacani L, Di Leo K, Cevenini R. Production de tumor factor α by *Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi*, s.l, and *Leptospira interrogans* in islated rat Kupffer cells. FEMS Immunol Med Microbiol 2004; 40: 187-191.

103. Biozzi G., Stiffel C. Mouton D., Bouthillier Y., Decreusefond C.. Cytodynamics of the immune response in the two lines of mice genetically selected for “high” and “low” antibody synthesis. J Exp Med 1972; 135: 1071-1094.

104. Dockrell H M, Taverne J, Lelchuk R, Depledge P, Brown I N, Playfair J H. Macrophage functions in Biozzi mice. Immunol. 1985; 55: 501-519.

105. Biozzi G, Mouton G, Sant`Anna O A, Passos H C, Gennari M, Reis M H, et al. Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. Curr Trop Microbiol Immunol 1979; 85: 31-38.

106. Santa'anna O A, Ibañes O M, Ferreira V C A, Gennari M, Mouton D. Inverse modification of antibody responsiveness to RGG in lines of mice selected for high or low responses to somatic antigen of *Salmonella*. Immunogenetics 1983; 18: 359.
107. Cabrera W H, Ibanez O M, Iliveira, S L, Sant'Anna O A, Siqueira M, Mouton D, Biozzi G. Evidence for distinct polygenic regulation of antibody responses to some unrelated antigens in lines of mice selected for high or low antibody responses to somatic antigen of *Salmonella*. Immunogenetics 1982; 16: 583-592.
108. Liacopoulos-Briot M, Mouton D, Lambert F, Decreusefond C, Stiffel C, Biozzi G. Comparison of skin allograft rejection and cytotoxic antibody production in two lines of mice genetically selected for high and low antibody synthesis. Transplantation 1972; 14: 590-595.
109. Byfield P E, Howard J G. Equivalent graft-versus-host reactivity of spleen cells from two lines of mice genetically selected for high and low humoral antibody formation. Transplantation 1972; 14: 133-135.
110. Liacopoulos-Briot, Mouton M, Stiffel C, Lambert F, Decreusefond C, Bouthillier Y, Biozzi G. Réponse à la phytohémagglutinine des lymphocytes des deux lignées de souris génétiquement sélectionnées pour une forte et une faible synthèse d'anticorps. Ann Immunol 1974; 125c: 393-404.
111. Ferreira V, Gennari M, Reis M H, Siqueira M, Stiffel C, Mouton D, et al. Potentialities of immunocompetent cells in high and low antibody production lines of mice obtained by selective breedings for responsiveness to flagellar or somatic antigens of *Salmonella*. J Immunogenetics 1985; 12: 309-319.
112. Courdec J, Bouthillier Y, Mevel J C, Mouton. Evaluation of T helper function in lines of mice selected for high or low antibody production: Quantitative inhibition

- of immune response by anti-L₃T₄ monoclonal antibody. *Immun Lett* 1989-90; 23: 21-26.
113. Cabrera, W. H. Mecanismos regulatórios de resposta humoral de camundongos bons e maus respondedores obtidos por seleção genética bidirecional. (tese) São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1993
 114. Adorini L, Doria G. Defective antigen presentation by macrophages from mice genetically selected for low antibody response. *Eur J Immunol* 1981; 11: 984-989.
 115. Biozzi G, Mouton D, Stiffel C, Bouthillier Y. A major role of the macrophage in quantitative genetic regulation of immunoresponsiveness and antiinfectious immunity. *Adv Immunol* 1984; 36: 189-233.
 116. Gennari M, Boutothillier Y, Ibanez O M, Ferreira V C, Mevel J C, Reis M H, et al. Effect of silica on the genetic regulation of antibody responsiveness. *Ann Inst Pasteur Immunol* 1987; 138: 359-370.
 117. Ibanez O M, Mouton D, Oliveira S L, Ribeiro Filho O G, Piatti R M, Sant'Anna O A, et al. Polygenic control of quantitative antibody responsiveness: restrictions of the multispecific effect related to the selection antigen. *Immunogenetics* 1988; 28: 6-12.
 118. Kierszembbaum F, Howard J G. Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: The importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *J Immunol* 1976; 116: 1208-1211.
 119. Mouton D, Parant M, Meyel J C, Parant F. Dose-dependent efficacy of vaccination against *K pneumoniae* in high and low antibody responder lines of mice. *Immunol Lett* 1987; 14: 335-339.

120. Passos E C, Vasconcellos S A; Ito F O, Yasuda P H, Nürnbergger Jr R. Isolamento de *Leptospiras* a partir do tecido renal de hamsters experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo *pomona*: Emprego das técnicas de Pipeta Pasteur e das diluições seriadas em meio de cultura de Fletcher tratado com 5-fluor-uracil ou sulfato de neomicina. Rev Fac Med Vet Zootec Univ São Paulo 1988; 25: 221-235.
121. Faine, S. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: WHO, 1982, p.82-83.
122. Collins, V J. Princípios de Anestesiologia. Rio de Janeiro 2º Ed, Guanabara Coogan, 1978, 1194 pg.
123. Thurmon W J, Tranquilli J B, Benson G J. Veterinary Anesthesia. Third Edition: Maryland, USA: Lippincott-Williams & Wilkins editors, 1996, 928 pgs.
124. Pick A, Misel A. A rapid microassay of the measurements of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using automatic enzyme immunoassay reader. J Immunol 1981; 46: 2111-2126.
125. Green L C, Tannenbaun S R. Nitrate syntesis in the germ free and convectional rat. Science 1981; 212: 56-58.
126. Schalm O W, Jain, N C, Carrol, E J. Hematologic techinics. In: Veterinary Hematology. Philadelphia: Lea Febiger 1986. p.21-86.
127. Behmer O A, Tolosa, E M C, Neto, A G F. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: EDART, 1976. 158p.
128. Zar J H. Bioestatistical analysis. 3. Ed. Upper Saddle River. Prentice Hall, 1996, 718p.

129. Marinho M. Resposta imune à infecção por *Leptospira interrogans* sorovar icterohaemorrhagiae em linhagens de camundongos geneticamente selecionados. (tese) Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2000.
130. Gheorghiu M, Mouton D, Lecoeur H, Lagranderie M, Mevel J C, Biozzi G. Resistance of high and low antibody responder lines of mice to the growth of a virulent (BCG) and virulent (H37Rv) strains of mycobacteria. Clin Exp Immunol 1985; 59: 177-184.
131. Hathaway, S. C, Blackmore, R. B, Marshall, R. B. Leptospirosis and the maintenance host: a laboratory mouse model. Res Vet Sci 1983; 24: 82-89.
132. Marinho M, Langoni H, Oliveira S L, Carreira R, Perri S H V, Luvizoto M C. Resposta humoral, recuperação bacteriana e lesões histológicas em camundongos em geneticamente selecionados para bons e maus respondedores de anticorpos e balb/c, frente à infecção por *Leptospira interrogans* sorovar icterohaemorrhagiae. Pesq Vet Bras 2003; 23: 5-12.
133. Marangoni A, Accardo S, Aldini, R, Guardigli M, Cavrini F, Sambri V, Montagnani M, Roda A, Cavenini R. Production of reactive oxygen species and expression of inducible nitric oxide synthase in rat isolated Kupffer cells stimulated by *Leptospira interrogans* and *Borrelia burgdorferi*. World J Gastroenterol 2006; 12: 3077-3081.
134. Liu Y, Zheng W, Mao L Li Y, Yan J. Pathogenesis of leptospirosis: interactions of *Leptospira interrogans* with in vitro cultured mammalian cells. Med Microbiol Immunol 2007; 196: 233-239.
135. Moonis M., Ahmad I., Bochhowot B.W. Macrophages in host defence: an overview. Int J Biochem Biophys 1992; 29: 89-98.

136. Rabinovitch, M. Macrophage spreading *in vitro*. In: Mononuclear phagocytes, characteristics, physiology & function. Oxford: FURTH, R.V editors 1975, p.161-170.
137. Darrah P A, Hondalus M K, Chen Q, Ischiropoulos H, Mosser D M. Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of *Rodococcus equi* by activated macrophages. Infect Immun 2000; 68: 3587-3593.
138. Brunelli L, Crow J P, Beckman, J S. The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to *Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys 1995; 316: 724-730.
139. De Groote M A, Fang F C. Noinhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. Clin Infect Dis 1995; 21, suppl.2: 5162-5165.
140. Hickman-Davis J, Gibbs-Erwin J, Lindsey J R, Matalon S. Surfactant protein A mediates mycoplasmacidal activity of alveolar macrophages by production of peroxynitrite. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 4953-4958.
141. Vasquez-Torres A, Jones-Carson J, Balish E. Peroxynitrite contributes to the candidacidal activity of nitric oxide producing macrophages. Infect Immun 1996; 21: 11-17.
142. Assreuy J F, Cunha F Q, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'donnell, C A, Liew Y. Production of nitric oxide and superoxid by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. Eur J Immunol 1994; 24: 672-676.
143. Fernandes P D, Assreuy J. Role of nitric and superoxide in *Giardia lamblia* killing. Braz J Med Biol Res 1997; 30: 93-99.

144. Tohyama M, Kanakami K, Futenma M, Saito A. Enhancing effect of oxygen radical scavengers on murine macrophage anticryptococcal activity through production of nitric oxide. Clin Exp Immunol 1996; 103: 436-441.
145. Abbas A K, Lichtman A H, Pober J S. Citocinas. In: Immunologia celular e molecular. Philadelphia: Saunders; 2002: 11: 235-269
146. Cinco M, Vecile E, Murgia R, Dobrina P, Dobrina A. A *Leptospira interrogans* and *Leptospira* peptidoglycans induce the release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes. FEMS (Fed. Europ Microbiol Soc) Microbiol Lett. 1996; 138: 211-214.
147. Vernel-Pauillac F, Merien F. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with avirulent variant of *Leptospira interrogans*. Infect Immun 2006; 74: 4172-4179.
148. Nally J E, 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.
149. Sternberger L A, Hardy P H Jr., Circulis J J, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. J. Histochem Cytochem 1970; 18: 315-333.
150. Scanziani E, Sironi G, Mandeli G. Immunoperoxidase studies on Leptospiral nephritis of swine. Vet Pathol 1989; 26: 442-444.
151. Zamora J, Riedemann S, Cabezas X, Vega S. Comparación de cuatro técnicas microscópicas para el diagnóstico de leptospirosis en roedores silvestres en el area rural de Valdivia, Chile. Rev Latinoam Microbiol 1995; 37: 267-272.

152. Zamora J, Riedemann S, Cabezas X, Lovera P. Leptospirosis de roedores silvestres en el área rural de Valdivia. Pesquisa de *Leptospira interrogans* mediante inmunofluorencencia e inmunoperoxidase. Arch Med Vet 1995; 24:115-118.
153. Wachstein M, Meisel E. Demonstration of peroxidase activity in tissue sections. J Histochem Cytochem 1964; 12: 538-544.
154. Chih-Wei Y, Mai-Szu W, Mig-Jeng P. Leptospirosis renal diseases. Nephrol Dial Transplant 2001; 16: 73-77.
155. Kemers F, Szeky A. *Leptospira sejro* infection of albino mice in Hungary (Erradication of Leptospire from the infected mouse stocks). Zlb Med Reike B Bd 1966; 13: 591-600.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.