



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDO EXPERIMENTAL COMPARATIVO DA INFECÇÃO POR  
LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS NO HAMSTER E NO RATO**

**DANIEL ABENSUR ATHANAZIO**

**Salvador - Bahia - Brasil  
2005**

599.323



001660

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Estudo experimental comparativo da infecção por leptospiras patogênicas no hamster e no rato.**

DANIEL ABENSUR ATHANAZIO

Orientador: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia para a obtenção do grau de mestre em Patologia Humana.

Salvador - Bahia  
2005



Ficha Catalográfica elaborada pela  
Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

A865r Athanazio, Daniel Abensur  
Estudo experimental comparativo da infecção por leptospi-  
ras patogênicas no hamster e no rato [manuscrito] / por Daniel Abensur  
Athanazio. – 2005.  
87 f. : il. ; 29 cm

Datilografado (fotocópia)

Dissertação (mestrado)- Universidade Federal da Bahia, Faculdade  
de Medicina . Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2005.

Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, Laboratório de  
Patologia e Biologia Molecular.

1. Leptospirrose. 2. *Rattus norvegicus*. 3. Modelo de animal  
experimental. 4. Colonização. I. Título.

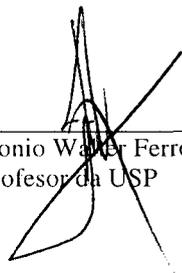
CDU 616.986.71:599.323

ESTUDO EXPERIMENTAL COMPARATIVO DA INFECÇÃO POR LEPTOSPIRAS  
PATOGENICAS NO HAMSTER E NO RATO.

**DANIEL ABENSUR ATHANAZIO**

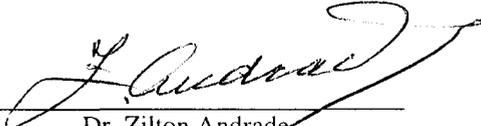
FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



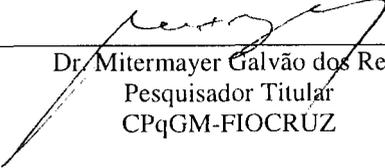
---

Dr. Antonio Walter Ferreira  
Professor da USP



---

Dr. Zilton Andrade  
Pesquisador Titular  
CPqGM-FIOCRUZ



---

Dr. Mitermayer Galvão dos Reis  
Pesquisador Titular  
CPqGM-FIOCRUZ

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Mitermayer Galvão dos Reis e Albert Icksang Ko pela orientação ativa em todas as etapas da realização do projeto.

Aos amigos Everton Fagonde da Silva e Cleiton Santos Silva pelo apoio diário em todos os experimentos.

Andréa Carvalho, Deborah Fraga e todos outros integrantes do LPBM.

Gustavo Rocha pelas imagens de microscopia de varredura.

Marcos Vannier e Cláudio Figueira do laboratório de biomorfologia parasitária.

Toda equipe do Biotério.

Toda equipe da Histopatologia.

Dr Zilton Andrade pelas sugestões ao projeto.

Dr Washington Luis dos Santos do Laboratório de Biointervenção pelo auxílio nos experimentos de imunofluorescência.

Funcionários da Biblioteca.

Aos meus pais e à Carmen,

**Agradeço à Fundação Oswaldo Cruz e ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz pelo apoio ao projeto em todas as suas etapas.**

# SUMÁRIO

## RESUMO

## ABSTRACT

1. REVISÃO DE LITERATURA .....	09
1.1 A EPTOSPIROSE HUMANA .....	09
1.2 PATOLOGIA DA LEPTOSPIROSE .....	11
1.3 INFECÇÕES NATURAIS E MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DA LEPTOSPIROSE .....	14
1.3.1 Roedores usados para reprodução de doença aguda .....	14
1.3.2 Camundongos .....	15
1.3.3 Primatas não humano .....	16
1.3.4 Cães .....	17
1.3.5 Marsupiais .....	18
1.3.6 Equinos .....	18
1.3.7 Bovinos, ovinos e suínos .....	19
1.4 RATOS COMO RESERVATÓRIOS E MODELO EXPERIMENTAL .....	20
1.4.1 Histórico .....	20
1.4.2 Ratos como reservatórios.....	21
1.4.3 Estudos em ratos naturalmente infectados .....	22
1.4.4 Ratos como modelo experimental .....	24
2. JUSTIFICATIVA .....	28
3. OBJETIVOS .....	30
3.1 OBJETIVO GERAL .....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	31
4.1 BACTÉRIAS .....	31
4.2 ANIMAIS E EXPERIMENTOS .....	31
4.2.1 Hamsters .....	31
4.2.2 Ratos .....	33
4.3 MICROSCOPIA ÓPTICA E IMPREGNAÇÃO PELA PRATA .....	34
4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA .....	35
4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA .....	35
5. RESULTADOS .....	37
5.1 PATOLOGIA EXPERIMENTAL EM HAMSTERS .....	37
5.2 AUSÊNCIA DE DOENÇA AGUDA EM RATOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS .....	54
5.3 EXPERIMENTOS PILOTOS PARA ESTABELECIMENTO DO ESTADO PORTADOR EM RATOS .....	54
5.4 COLONIZAÇÃO RENAL AVALIADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VERREDURA .....	56
5.5 INFLUÊNCIA DO INÓCULO PARA ESTABELECIMENTO DO ESTADO PORTADOR EM RATOS .....	59

5.6 ESTUDO DA CINÉTICA DE DISSEMINAÇÃO EM RATOS .....	60
5.7 TEMPO PARA ESTABELECIMENTO DO ESTADO PORTADOR EM RATOS .....	63
5.8 TEMPO DE PERSISTÊNCIA DA COLONIZAÇÃO RENAL EM RATOS .....	65
5.9 HISTOPATOLOGIA DE RATOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS	66
6. DISCUSSÃO .....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela I. Classificação atual das principais leptospirosas patogênicas .....	27
Tabela 1. Experimentos de dose letal 50% em hamsters .....	38
Tabela 2. Patologia experimental em hamsters com leptospirose aguda – inóculo $10^3$ .....	39
Tabela 3. Patologia experimental em hamsters com leptospirose aguda – altos inóculos .....	40
Figura 1. Tumefação do epitélio tubular proximal na leptospirose aguda .....	41
Figura 2. Hemorragias do parênquima renal na leptospirose aguda .....	43
Figura 3. Dissociação de hepatócitos na leptospirose aguda .....	44
Figura 4. Hemorragia intra-alveolar na leptospirose aguda .....	46
Figura 5. Regeneração tubular no córtex renal de hamsters convalescentes .....	48
Figura 6. Nefrite intersticial subaguda em hamsters convalescentes .....	50
Figura 7. Detecção de leptospirosas por Warthin-Starry no tecido renal de hamsters .....	52
Tabela 4. Experimentos pilotos para estabelecimento de colonização renal de ratos .....	54
Figura 8. Detecção de leptospirosas por Warthin-Starry no tecido renal de ratos .....	55
Figura 9. Colonização renal à microscopia eletrônica de varredura (15.000x) I .....	56
Figura 10. Colonização renal à microscopia eletrônica de varredura (15.000x) II .....	57
Figura 11. Colonização renal à microscopia eletrônica de varredura (100x) .....	57
Figura 12. Colonização renal à microscopia eletrônica de varredura (5.000x) .....	58
Tabela 5. Influência do inóculo para estabelecimento de colonização renal em ratos .....	59
Figura 13. Detecção por imunofluorescência em estudo de cinética de disseminação .....	61
Tabela 6. Estudo de disseminação de leptospirosas nos tecidos de ratos infectados .....	62
Tabela 7. Tempo para estabelecimento da colonização renal .....	63
Figura 14. Detecção de leptospirosas por imunofluorescência no tecido renal de ratos .....	64
Tabela 8. Tempo de persistência da colonização renal em ratos .....	65
Figura 15. Nefrite intersticial periarterial em ratos experimentalmente infectados .....	67
Figura 16. Nefrite intersticial mais intensa em um rato 2 meses após inóculo $10^8$ .....	69

## RESUMO

ESTUDO EXPERIMENTAL COMPARATIVO DA INFECÇÃO POR LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS NO HAMSTER E NO RATO. **DANIEL ABENSUR ATHANAZIO**. A leptospirose persiste como uma doença cuja patogênese é pouco compreendida. O modelo experimental de ratos é atraente para compreensão de mecanismos envolvidos na disseminação e tropismo de leptospiros, persistência da colonização renal e fatores relacionados à resistência à doença. No entanto, os relatos experimentais em ratos são escassos. O presente trabalho tem como objetivo validar o modelo de ratos experimentalmente infectados para estudos subsequentes de colonização, tropismo e patogênese, avaliando a influência do inóculo, idade do animal, tempo de persistência e tempo requerido para colonização renal, e achados de histopatologia relacionados ao processo de disseminação e colonização. Ratos Wistar foram infectados com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 e avaliados em diferentes intervalos até o máximo de 4 meses. A detecção de leptospiros nos tecidos foi realizada por cultura, impregnação pela prata e imunofluorescência. A comportamento da infecção e patologia associada foram comparadas no modelo de hamsters e ratos. A dose infectante para estabelecimento de colonização renal em 50% dos ratos foi calculada em  $10^{4,68}$  ou 47863 leptospiros. Em diferentes experimentos, a persistência da colonização renal durou até quatro meses, o último intervalo estudado. Após uma semana de inóculo, 75% dos ratos apresentam colonização de leptospiros nos rins. Num estudo de cinética da colonização renal, um padrão de colonização tubular pode ser detectado a partir do oitavo dia. O processo de colonização não é acompanhado por achados histopatológicos no rim. Todavia, após intervalos iguais ou maiores de um mês, demonstrou-se nefrite intersticial linfocitocitária de grau discreto. Concluímos que a colonização renal é facilmente reproduzida neste modelo persistindo por até 4 meses após o inóculo e em 75% dos ratos requer menos de 1 semana para ser estabelecida. A análise histológica não identifica lesões relacionadas com o processo de colonização, mas uma nefrite intersticial tardia pôde ser observada. Concluímos que o modelo experimental de ratos pode contribuir para estudos relacionados à patogênese da leptospirose.

**PALAVRAS-CHAVE:** leptospirose; *Rattus norvegicus*; experimental; colonização; patogênese.

## ABSTRACT

A COMPARATIVE EXPERIMENTAL STUDY OF LEPTOSPIRAL INFECTION IN THE HAMSTER AND IN THE RAT. **DANIEL ABENSUR ATHANAZIO.** Leptospirosis persists as a disease whose pathogenesis is still poorly understood. The experimental model of rats is attractive to investigate the mechanisms of leptospiral dissemination and tropism, persistence of renal colonization and factors related to resistance to disease. Nevertheless, this model has been poorly explored. The objective of this study is to validate the an experimental model to be used in subsequent studies on colonization, tropism and pathogenesis, evaluation of inoculum, age of animal, persistence time, time required to for establishing renal colonization, and histopathological features related to dissemination and colonization processes. For these purposes, Wistar rats were infected by *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni strain FIOCRUZ L1-130. The detection of leptospire in tissues were performed by culture, silver impregnation and indirect immunofluorescence. The infection outcome and related pathology was compared between the hamster and the rat models. The infection dose that induced persistent colonization in 50% of the rats were calculated as  $10^{4.68}$  or 47863 leptospire. In different experiments, the renal colonization by leptospire persisted up to four months, the last studied interval. After one week post-infection, 75% of rats already exhibited renal colonization. In a kinetics study, tubular colonization could be detected from the eighth day after inoculation. The process of colonization is not related to histopathological features in renal tissue. However, after intervals of one month or later, a picture of mild interstitial nephritis by lymphocytes and hystiocytes can be seem. We conclude renal colonization is easily reproducible in this model, persists up to four months, and 75% of animals require one week to establish renal carrier state. The histological analysis did not identify lesions related to colonization, but rather a late mild interstitial nephritis was observed. Thus, we conclude the experimental rat model can be used in subsequent studies that will contributed to our comprehension of the underlying mechanisms of disease in leptospirosis.

**KEYWORDS:** leptospirosis; *Rattus norvegicus*; experimental; colonization; pathogenesis.

# 1. REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 A LEPTOSPIROSE HUMANA

A leptospirose é uma zoonose de importância global causada por leptospiras patogênicas transmitidas através do contato com reservatórios animais ou água contaminada. A epidemiologia da doença está associada ao contato humano com roedores ou animais domésticos e selvagens, numa ampla variedade de ocupações rurais e urbanas, e às estações chuvosas e enchentes nos países em desenvolvimento com precário saneamento (FAINE. 1999; LEVETT. 2001; BHARTI et al. 2003).

A leptospirose foi por muito tempo reconhecida como uma doença rural ou associada às ocupações que envolviam risco de contágio com água contaminada ou contato com reservatórios, como atividades militares, criação de animais e lavouras de arroz (FAINE. 1999). Apesar de atualmente a leptospirose manter-se associada à exposição ocupacional em ambientes rurais de países desenvolvidos ou regiões endêmicas do Sudeste Asiático, a sua epidemiologia está mudando. Em países desenvolvidos, a doença vem sendo relacionada à prática de esportes aquáticos (HAAKE et al. 2002; MEITES et al. 2004). Nos países em desenvolvimento, a leptospirose ocorre em ambientes urbanos como epidemias associadas a estações chuvosas e enchentes. Essa relação já foi documentada nas principais cidades brasileiras como Salvador, Rio de Janeiro, São Paulo, Belo Horizonte e Florianópolis (KO et al. 1999; KUPEK et al. 2000; BARCELLOS & SABROZA. 2001; COSTA et al. 2001; DE FIGUEIREDO et al. 2001; ROMERO et al. 2003), e em outros centros urbanos como na Índia, ou em áreas rurais da Nicarágua (TREVEJO et al. 1998; BHARADWAJ et al. 2002). A mudança do contexto rural para urbano também ocorre em países desenvolvidos como EUA e Israel, com paralelo aumento da frequência do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, carregados especialmente por ratos (VINETZ et al. 1996; KARIV et al. 2001; BISHARA et al. 2002). No contexto urbano, o rato é a principal fonte de contaminação da água para transmissão da infecção aos humanos (FAINE. 1999; BHARTI et al. 2003).

No Brasil e em Salvador, a leptospirose está relacionada à pobreza e ocorre principalmente nas estações chuvosas acompanhadas por alagamento de zonas urbanas de baixas condições sanitárias. Neste contexto, as cepas da espécie genômica *Leptospira interrogans* sensu stricto do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* são as principais causadoras de leptospirose grave e, tradicionalmente, os sorovares deste grupo são mais associados às

formas ictéricas (graves) da doença (VERONESI et al. 1991), embora esta concepção vem sendo desafiada por evidências mais recentes (LEVETT. 2001; VINETZ. 2001). A mortalidade da forma grave da leptospirose varia entre 5-15% e está relacionada ao desenvolvimento de insuficiência renal aguda (BHARTI et al. 2003). O advento do tratamento desta condição com diálise peritoneal aumentou a importância de outras complicações possivelmente fatais, como a hemorragia pulmonar grave, que vem despertando atenção crescente dos investigadores no Brasil e no mundo (TREVEJO et al. 1998; MAROTTO et al. 1999; SILVA J.J. et al. 2002).

A descrição da forma ictérica grave da doença descrita por Weil em 1886 representa uma minoria dos casos. A infecção humana tem amplo espectro de manifestações clínicas que variam do curso subclínico ou sintomas semelhantes ao resfriado comum, até a forma grave clássica (doença de Weil) caracterizada por insuficiência renal aguda, icterícia e diátese hemorrágica. A variabilidade das manifestações pode ser explicada em parte pela virulência intrínseca dos diferentes sorovares. A forma grave é mais comumente relacionada ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, mas pode ser observada nas infecções por outros sorovares (FAINE. 1999; LEVETT. 2001; BHARTI et al. 2003). A hemorragia pulmonar é causa importante de óbito em algumas regiões e independe da presença de icterícia ou do sorovar infectante (TREVEJO et al. 1998; MAROTTO et al. 1999; VIJAYACHARI et al. 2003; VIJAYACHARI et al. 2004; SEGURA et al. 2005).

A patogenia da leptospirose ainda não é bem compreendida. As complicações mais graves surgem na fase imune – após estabelecimento de uma resposta adaptativa - e é questão de discussão até que ponto as lesões dependem da ação tóxica das bactérias nos tecidos ou são agressões imunologicamente mediadas (BHARTI et al. 2003). Enquanto a doença renal parece depender da presença de componentes bacterianos tóxicos (YASUDA et al. 1986; ALVES et al. 1991), foram propostos mecanismos imunológicos para explicar os achados de uveíte (PARMA et al. 1985; LUCCHESI et al. 2002; RATHINAM. 2002), hemorragia pulmonar (NALLY et al. 2004) e diátese hemorrágica (REN et al. 2003). Alguns relatos sugerem um mecanismo de imunopatogênese relacionado à exacerbada resposta inata (TAJIKI & SALOMAO. 1996; KLIMPEL et al. 2003). Recentemente, o primeiro estudo sobre susceptibilidade genética relatou a associação do alelo HLA-DQ6 com maior risco de infecção após exposição (LINGAPPA et al. 2004). Também não são conhecidos quais fatores da bactéria e do hospedeiro determinam porque 5-10% de todos indivíduos infectados desenvolverão a forma ictérica (LEVETT. 2001).

## 1.2 PATOLOGIA DA LEPTOSPIROSE

Estudos da patologia humana e experimental da leptospirose caracterizam-a como uma doença generalizada associada à diátese hemorrágica (AREAN. 1962a; AREAN. 1962b; DE BRITO et al. 1966; NICODEMO et al. 1997). As alterações histopatológicas geralmente são desproporcionalmente brandas quando comparadas ao acentuado grau de perturbações fisiológicas. A perda de função do tecido antecede o surgimento de reação inflamatória, que parece refletir apenas efeitos tóxicos ou alterações isquêmicas secundárias ao dano vascular (AREAN. 1962a; AREAN. 1962b; DE BRITO et al. 1966; DE BRITO et al. 1979; DAVILA DE ARRIAGA et al. 1982).

O quadro morfológico renal é classicamente descrito como lesão do epitélio tubular associado à nefrite intersticial (AREAN. 1962a; AREAN. 1962b; DE BRITO et al. 1966; DE BRITO et al. 1967a; DAVILA DE ARRIAGA et al. 1982). Alterações degenerativas, como tumefação do epitélio tubular e das células endoteliais, são precoces (DAVILA DE ARRIAGA et al. 1982). A presença de necrose de células tubulares isoladas ou em grupos é descrita, mas não é um achado freqüente (DE BRITO et al. 1966; DE BRITO et al. 1967a; DAVILA DE ARRIAGA et al. 1982).

A associação da nefrite intersticial com a gravidade da doença clínica e é um tema controverso na leptospirose (DAVILA DE ARRIAGA et al. 1982). A inflamação do tecido renal é um achado tardio na evolução da doença, como observado em animais portadores crônicos com leptospirúria (FAINE. 1999). Numa série de 33 autópsias, alterações degenerativas tubulares foram observadas em pacientes que morreram na primeira semana de evolução; necrose tubular foi documentada nos pacientes mortos na segunda semana; e um quadro de nefrite intersticial difusa passava a ser observado nos pacientes que morreram a partir da terceira semana de doença (AREAN. 1962b). Isto sugere que a nefrite desenvolve-se nos pacientes que sobrevivem o tempo necessário para desenvolvê-la. Este quadro foi comparado ao da nefrite nefrotóxica por diversas etiologias, enfatizando a possibilidade de lesão mediada diretamente pela leptospira ou seus produtos (AREAN 1962b; DE BRITO. 1968).

A icterícia é um achado típico nas formas graves de leptospirose, mas não está relacionada à necrose hepatocelular. O quadro histológico predominante é de perda de coesão das células hepáticas com alterações citológicas de aspecto regenerativo como mitoses, binucleação e multinucleação. A presença de colestase na zona centrolobular pode

ser um achado marcante. O infiltrado inflamatório tende a ser discreto e restrito às áreas portais (AREAN. 1962a; AREAN 1962b; DE BRITO et al. 1966; DE BRITO et al. 1967b).

O achado de focos de inflamação do miocárdio é freqüente em autópsias, mas a manifestação clínica de miocardite é rara (AREAN. 1962b; DE BRITO et al. 1987). Além disso, anormalidades eletrocardiográficas ocorrem freqüentemente contrastando com o achado incomum de disfunção cardíaca clinicamente detectável (WATT et al. 1990; SACRAMENTO et al. 2002). Da mesma forma, alterações inflamatórias no parênquima pancreático podem ser freqüentes em pacientes autopsiados, mas a pancreatite clinicamente identificável é infreqüente, e essa associação clínica é mais difícil de ser caracterizada, pois a insuficiência renal pode explicar o aumento do nível sérico de amilase descrito em grupos de pacientes com leptospirose (AREAN. 1962b; DAHER et al. 2003).

Uma diátese hemorrágica de patogenia pouco compreendida é a uma manifestação grave da leptospirose (AREAN. 1962b; NICODEMO et al. 1997; SILVA J.J. et al. 2002; BHARTI et al. 2003). A leptospirose grave tem semelhanças com a sepse por gram negativos, e tanto a ativação leucocitária quanto a secreção de citocinas pró-inflamatórias ocorrem em respostas a componentes da leptospira como lipopolissacarídeo (LPS), extrato de glicolipoproteína (GLP) e proteoglicana (CINCO et al. 1996; WERTS et al. 2001; DIAMENT et al. 2002). Além disso, a trombocitopenia é achado freqüente da patologia humana e experimental (HIGGINS & COUSINEAU. 1977; NAVARRO & KOCIBA. 1982; NICODEMO et al. 1990; DA SILVA et al. 1995). No entanto, do ponto de vista fisiopatológico, o quadro da leptospirose parece estar mais ligado à púrpura trombocitopênica trombótica (PPT) – desencadeada por lesão endotelial e subsequente ativação plaquetária – do que à coagulação intravascular disseminada (CID) – na qual predominam a ativação e o consumo dos fatores de coagulação como mecanismo deflagrador da doença (VAN GORP et al. 1999). O papel da lesão endotelial e ativação plaquetária é reforçado pelo achado em 12 autópsias de pacientes com manifestações hemorrágicas que evidenciou tumefação de células endoteliais pulmonares à microscopia eletrônica e outros achados interpretados como lesão de capilares da circulação pulmonar. Além disso, foram observados agregados de plaquetas nas luzes de capilares septais e alterações morfológicas plaquetárias que sugerem ativação (NICODEMO et al. 1997). Anticorpos antifosfolípidios podem ser freqüentes em algumas séries de pacientes, mas seu papel na patogenia da diátese hemorrágica da leptospirose não está claro (SANTIAGO et al. 2001; DE FRANCESCO DAHER et al. 2002; RODA. 2003).

A hemorragia pulmonar vem recebendo atenção crescente como causa importante de óbito (LEVETT. 2001; BHARTI et al. 2003). O achado de hemorragia intra-alveolar microscópica é freqüente na leptospirose experimental e humana (AREAN. 1962b, NALLY et al. 2004; PEREIRA et al. 2005). No entanto, o quadro clínico pode ser dramático com hemoptise maciça e insuficiência respiratória de curso rápido (SILVA et al. 2002). A forma grave e hemorrágica do acometimento pulmonar pode ocorrer em epidemias ou casos esporádicos, associada ou não com icterícia (TREVEJO et al. 1998; MAROTTO et al. 1999; SILVA J.J et al. 2002; SEGURA et al. 2005).

A mialgia é um sintoma proeminente e freqüente da leptospirose aguda. Numa série de análises histopatológicas de 63 pacientes com leptospirose no Rio de Janeiro, demonstrouse que a maioria dos casos exibia áreas de necrose hialina focal (GUEDES E SILVA et al. 1980). A presença dessa lesão associa-se com o achado freqüente de aumento de creatina fosfoquinase (CPK) e mioglobina no soro (JOHNSON et al. 1975; WATT et al. 1990). No entanto, a rabdomiólise, apesar de ser freqüente, não parece ter associação com o quadro de insuficiência renal que acompanha a leptospirose grave (MARTINELLI et al. 1994). A tentativa experimental de reproduzir as lesões musculares gerou achados variáveis de inflamação, atrofia e degeneração das fibras (LAURAIN. 1955) sendo recentemente descritos inflamação branda e necrose focal de fibras na infecção experimental de primatas não humanos (PEREIRA et al. 2005).

A manifestação de sintomas de irritação meníngea é comum na leptospirose. Um quadro auto-limitado de meningite linfocítica pode ocorrer mesmo em casos oligossintomáticos que não chegam a ser corretamente diagnosticados (FAINE. 1999; BHARTI et al. 2003). Um exemplo disso é a demonstração da presença de leptospiros, por PCR, num considerável número de pacientes com diagnóstico de meningite asséptica (ROMERO et al. 1998; SILVA H.R. et al. 2002). Numa série de 103 pacientes estudados em São Paulo, o DNA de leptospiros foi amplificado do líquido de 39,8% dos casos, contrastando com baixos índices de sinais sorológicos de infecção (ROMERO et al. 2003). A base morfológica dessas manifestações não foi extensamente estudada. Na série de 33 necrópsias descritas por Arean, focos esparsos de infiltrado linfocítico perivascular são descritos no parênquima de todo sistema nervoso central (AREAN et al. 1962b). Utilizando um modelo experimental de macacos *Cercopithecus aethiops*, tentou-se reproduzir a leptospirose humana auto-limitada utilizando cepas dos sorovares Tarassovi e Balcanica, que não causam formas ictéricas e hemorrágicas graves em humanos. Estes animais desenvolvem

um quadro de meningoencefalite não-supurativa que estende dos giros aos sulcos e fissuras profundas que resolvem entre o 26<sup>o</sup> e 33<sup>o</sup> dia de infecção, sugerindo que essa pode ser a base morfológica para as manifestações neurológicas auto-limitadas que ocorrem nas formas benignas da leptospirose humana (MARSHALL et al. 1980). Uma meningoencefalite linfocítica leve entre o 11<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dia pós-infecção em suínos experimentalmente infectados com sorovar Pomona também já foi relatado (SLEIGHT et al. 1960).

### 1.3 INFECÇÕES NATURAIS E MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DA LEPTOSPIROSE

O gênero *Leptospira* é atualmente classificado em diferentes espécies genômicas e exibe mais de duzentos sorovares com diferente seletividade por hospedeiros mamíferos (FAINE. 1999; BRENNER et al. 1999; BHARTI et al. 2003), como indicado na tabela I. A grande diversidade de hospedeiros naturais resultou na utilização de vários modelos experimentais para o estudo da leptospirose. Alguns modelos vêm sendo utilizados para investigações de aspectos específicos da infecção, como complicações imunologicamente mediadas ou ensaios de imunoproteção.

#### 1.3.1 Roedores usados para reprodução de doença aguda

Algumas espécies de roedores usadas em laboratório são susceptíveis à infecção potencialmente fatal por leptospirosas patogênicas, e reproduzem lesões de órgãos alvo da leptospirose humana grave. Entre os modelos mais estudados, a cobaia foi responsável pela maior parte do conhecimento acumulado sobre patogênese da leptospirose experimental (FAINE. 1957; YASUDA et al. 1986; ALVES et al. 1991; NALLY et al, 2004). Em recente publicação, o achado de depósitos lineares de imunoglobulina e complemento nos septos alveolares de cobaias com hemorragia pulmonar reforça uma antiga suspeita do papel da auto-imunidade nesta complicação (NALLY et al. 2004). Da mesma forma, os estudos clássicos da patologia experimental da leptospirose foram descritos neste modelo (AREAN. 1962a; DE BRITO et al. 1966; DE BRITO et al. 1979; DAVILA DE ARRIAGA et al. 1982). Hamsters também são susceptíveis e vêm sendo usados recentemente para reprodução de lesões descritas em humanos e ensaios de imunoproteção, tratamento e

comprovação de expressão *in vivo* de proteínas clonadas (MILLER & WILSON. 1967; MILLER et al. 1974; JOST et al. 1989; OLIVA et al. 1994; FAJARDO et al. 1998; BARNETT et al. 1999; TRUCCOLO et al. 2002). Gerbils também reproduzem a doença e são utilizados para estudos de intervenção terapêutica e imunoproteção (YUKAWA et al. 1994; SONRIER et al. 2000; BRANGER et al. 2001).

### 1.3.2 Camundongos

Camundongos tendem a exibir resistência natural à doença e já foram usados em estudos que avaliam a seqüência de eventos envolvidos na colonização renal (MARSHALL. 1976). A infecção inadvertida destes animais em biotérios tende a ser assintomática causando ampla contaminação nas colônias (ALEXANDER. 1984). Camundongos BALB/c submetidos à imunossupressão humoral tornam-se susceptíveis à doença grave e esse modelo serviu de base para estudos de imunização ativa e passiva, que auxiliaram na compreensão da importância da resposta humoral na proteção contra infecção por leptospiros (ADLER & FAINE. 1976; ADLER & FAINE. 1977). Apesar da resistência conhecida para uma série de sorovares conhecidos, algumas cepas de leptospiros podem causar doença letal em camundongos. Camundongos Swiss podem desenvolver doença letal ou colonização assintomática após infecção por diferentes sorovares em função da idade do animal e do inóculo (FAINE. 1962). Cepas recuperadas de roedores de laboratório contaminados com sorovar Javanica, cujo hospedeiro natural é o rato, foram usadas para infecção experimental de ratos e camundongos. Enquanto ratos evoluíram com colonização renal sem sintomas em todos os casos, os camundongos Swiss evoluíram ou com doença letal ou sobrevivendo com eliminação das leptospiros do tecido renal (NATARAJASEENIVASAN & RATNAM. 1997). Essa observação favorece a noção de que a adaptação de diferentes sorovares tende a ser espécie-específica, mesmo entre roedores tradicionalmente considerados como naturalmente resistentes.

Camundongos C3H/HeJ são caracterizados por pela homozigose de uma mutação pontual do receptor “Toll-like” 4 (TLR4), responsável pelo reconhecimento do lipopolissacarídeo da membrana externa da maioria das bactérias gram-negativas, abolindo o reconhecimento da endotoxina, o que os tornam resistente ao choque endotóxico (POLTORAK et al. 1998). Poucos sorovares foram avaliados neste modelo: enquanto os sorovares Icterohaemorrhagiae e Manilae podem induzir doença grave, estes animais são

naturalmente resistentes ao sorovar Hebdomadis (PEREIRA et al. 1998; KOIZUMI & WATANABE. 2004). Este modelo já foi utilizado para ensaio de imunoproteção por proteínas recombinantes de leptospiras (KOIZUMI & WATANABE. 2004). Apesar dos resultados encorajadores, eles devem ser interpretados com cautela, pois poucas cepas foram avaliadas neste modelo, e não são conhecidos completamente os mecanismos imunológicos de resistência na leptospirose, ou como eles são afetados pela alteração de camundongos C3H/HeJ. O reconhecimento do LPS de leptospiras difere daquele das bactérias gram negativas, pois depende do receptor “Toll-like 2” (TLR2) (WERTS et al. 2001). No entanto, recentes estudos demonstram o papel do TLR4 como receptor de ligantes endógenos tais como hsp60,  $\beta$ -defensina 2 e proteína surfactante pulmonar A, o que pode interferir em outras vias da resposta imunológica (AKIRA ET AL. 2001; DABBAGH & LEWIS. 2003). Mesmo quando susceptíveis a doença, o modelo é limitado por requerer inóculos relativamente altos.

Camundongos transgênicos sem o gene do receptor “Toll-like 2” (TLR2) não sofrem os efeitos letais de injeções de lipopolissacarídeo (LPS) de leptospiras confirmando a importância *in vivo* dos experimentos que demonstraram que o LPS de leptospiras difere da maioria das bactérias gram-negativas por ser reconhecido por uma via dependente de TLR2 e não do TLR4 (WERTS et al. 2001).

### 1.3.3 Primatas não humano

Estudos em primatas não humanos foram realizados desde os primeiros isolados obtidos de pacientes humanos. Em 1916, autores alemães já testavam espiroquetas isoladas de pacientes em diferentes espécies animais, e obtiveram infecções oligossintomáticas nos modelos que usavam primatas. Enquanto isso, Noguchi identificava espécies de macacos do Novo Mundo com maior ou menor susceptibilidade às formas graves e isolava espiroquetas com sucesso em seus experimentos, enquanto ainda acreditava estar estudando o agente etiológico da febre amarela e reproduzindo esta doença (MINETTE. 1966). De um modo geral, primatas mostraram ao longo de décadas de experimentos ser um grupo relativamente resistente às formas graves da infecção por leptospiras patogênicas (MINETTE. 1966; PALMER et al. 1987; MARSHALL et al. 1980). Minette realizou o maior estudo em primatas com diversas espécies descrevendo respostas sorológicas com reações cruzadas à microaglutinação, ausência de imunidade protetora na reinfeção por

sorovares heterólogos, e identificando a espécie *Saimiri sciureus* (“squirrel monkey”) como susceptível e capaz de reproduzir a doença icterica experimentalmente (MINETTE & SHAFFER. 1968). Macacos *Cercopithecus* infectados com sorovar Hardjo exibem leptospiremia e disseminação de espiroquetas em diversos tecidos, embora mantenham manifestações clínicas brandas (PALMER et al. 1987). Um estudo recente descreve a leptospirose experimental em sagüis (*Callithrix jacchus*) reproduzindo lesões descritas em humanos e cobaias, tais como hemorragia intra-alveolar, necrose tubular aguda, nefrite intersticial, necrose focal de hepatócitos, e degeneração muscular (PEREIRA et al. 2005). Uma limitação importante da literatura relacionada à leptospirose em primatas não-humanos é a variedade de espécies animais e cepas de leptospiras utilizadas tornando as observações incomparáveis.

#### 1.3.4 Cães

O modelo experimental de cães contribui em diferentes campos do estudo da leptospirose. Estudo sorológico demonstra que o cão pode manter estado portador renal crônico com níveis indetectáveis de aglutininas, por isso, um teste sorológico negativo não exclui a possibilidade de exposição prévia e colonização renal (MENGES et al. 1960), de forma semelhante ao conhecido em primatas e ratos naturalmente infectados (MINETTE. 1966.; MINETTE & SHAFFER. 1968; FARIA et al. 2000; SUNBÜL et al. 2001). Cães apresentam leptospiremia e leptospirúria independentemente da gravidade das manifestações clínicas (KEENAN et al. 1978; BRANGER et al 2005). Um relato neste modelo relacionou a trombocitopenia com elevação transitória de produtos de fibrinólise (NAVARRO & KOCIBA. 1982), entretanto, a descrição da leptospirose humana e de outros modelos experimentais não sustentam a possibilidade de coagulação intravascular disseminada. (NICODEMO et al. 1990; DA SILVA et al. 1995; NICODEMO et al. 1997; NALLY et al. 2004). Quanto à patologia, a nefrite intersticial por linfócitos e histiócitos domina o quadro da doença aguda e pode permanecer no estado portador assintomático tanto no modelo experimental quanto nos cães naturalmente infectados (McINTYRE & MONTGOMERY. 1957; ANDERSON. 1967; TAYLOR et a. 1970; MORRISON & WRIGHT. 1976). Além disso, o uso de vacinas com leptospiras inativadas é de uso restrito em humanos, porém amplamente usada em cães domésticos. Neste particular, os estudos de avaliação de vacinas em cães reforçam na noção de que este tipo de imunização confere

proteção específica para cada sorovar e frequentemente não confere imunidade esterilizante, com persistência de excreção urinária crônica de leptospiras (ANDRE-FOINTAINE et al. 2003; KLAASEN et al. 2003).

### 1.3.5 Marsupiais

A infecção experimental em 20 gambás (*Mephitis mephitis*) capturados também confirma a observação de leptospiremia transitória com tendência ao acúmulos nos túbulos renais que durou por todo o tempo do estudo (197 dias). Da mesma forma, as alterações degenerativas tubulares são precoces enquanto a nefrite intersticial surge tardiamente após estabelecimento da colonização renal (TABEL & KARSTAD. 1967).

### 1.3.6 Equinos

Outras espécies são usadas para investigação de complicações específicas. O principal problema da infecção por leptospiras em eqüinos é a alta frequência de uveíte recorrente e iridociclite, principais causas de cegueira nestes animais (FAINE. 1999). Os primeiros relatos de infecção experimental em eqüinos foram capazes de reproduzir lesões oculares diversas (MORTER et al. 1964; WILLIAMS et al. 1971). Investigações subseqüentes demonstraram que cavalos inoculados com córnea eqüina ou leptospiras mortas desenvolviam anticorpos capazes de ligar-se à córnea *in vivo* e *in vitro* (PARMA et al. 1985). Esses auto-anticorpos foram detectados no soro, humor aquoso e lágrimas de eqüinos experimentalmente infectados (PARMA et al. 1987). Um estudo subseqüente documentou a presença de depósitos de complemento (C3) na córnea eqüina *in vivo* após inóculo de leptospiras mortas e em células epiteliais da córnea *in vitro* quando incubadas com soro anti-*Leptospira* de eqüinos (PARMA et al. 1992a). Análises por Western-blot identificaram 5 frações antigênicas da córnea e cristalino de eqüinos que reagem com soro anti-*Leptospira* de eqüinos (PARMA et al. 1992b) e uma fração intracelular de leptospira que compartilha esses epítomos (PARMA et al. 1997). Investigações mais recentes de biologia molecular identificaram uma seqüência de DNA conservada entre diferentes sorovares que codifica uma proteína de 90 kDa implicada na reação cruzada com córnea eqüina (LUCCHESI & PARMA. 1999; LUCCHESI et al. 2002). Entre diferentes mecanismos de natureza auto-imune que são postulados na leptospirose, a uveíte recorrente

que ocorre em humanos e eqüinos é o mais bem documentado e estabelecido, em grande parte devido a este modelo experimental.

### 1.3.7 Bovinos, ovinos e suínos

Para bovinos, ovinos e suínos, o principal impacto da infecção consiste no prejuízo econômico relacionado à maior freqüência de abortos, prematuridade e natimortos (FAINE. 1999; LANGONI et al. 1999). No entanto, a reprodução experimental de abortos associados à leptospirose em ovelhas e vacas é raramente bem sucedida (ANDREANI et al. 1983; SMITH et al. 1997). Assim como em cães, bovinos são alvo de programa de vacinação e recentes estudos nesta área apontam para importância da ativação da imunidade celular na proteção conferida contra o sorovar Hardjo, um dos principais sorovares relacionados à leptospirose em bovinos (NAIMAN et al. 2001; NAIMAN et al. 2002; BROWN et al. 2003).

A infecção experimental de suínos em geral promove uma doença febril transitória. A patologia descrita em geral está restrita à nefrite intersticial com linfócitos, histiócitos e plasmócitos com freqüência em localização periarterial (LANGHAM et al. 1958; SLEIGHT et al. 1960). A nefrite pode ter graus variáveis podendo ser de grau intenso a partir do oitavo dia de infecção (SLEIGHT et al. 1960) e pode durar por mais de sete meses (LANGHAM et al. 1958). Além disso, uma meningoencefalite linfocítica de grau leve foi relatada em todos animais infectados e examinados entre 11 e 14 dias após inóculo (SLEIGHT et al. 1960). A tentativa experimental de reproduzir a doença reprodutiva em porcas prenhas é capaz de demonstrar abortos e partos prematuros, embora com freqüência variável, o que provavelmente reflete diferenças relacionadas ao inóculos, cepas de leptospiros usadas, e estágios diferentes da prenhez ao momento da infecção (FERGUSON et al. 1956; FENNESTAD & BORG-PETERSEN. 1966; ROCHA et al. 1992). A avaliação de vacinas baseadas em leptospiros inativadas confirmam os achados de imunidade não esterilizante e ausência de proteção à longo prazo (WHYTE et al. 1982; ELLIS et al. 1989).

A documentação de colonização renal examinada à microscopia eletrônica também já foi relatada na infecção experimental de ovelhas (MARSHALL. 1974). Os achados confirmam observações de outros modelos tais como a colonização seletiva dos túbulos proximais (DE MARTINO et al. 1969) e a observação da passagem de leptospiros através de junções intercelulares (MARSHALL. 1976). Por outro lado, a ausência de leptospiros intracelulares

é discordante com outros relatos (MILLER & WILSON, 1967; DE MARINO et al. 1969) e a relação encontrada entre lesões subcelulares de células epiteliais tubulares com a presença de leptospiras também não foi demonstrada em outros modelos (MILLER & WILSON, 1967).

## 1.4 RATOS COMO RESERVATÓRIOS E MODELO EXPERIMENTAL

### 1.4.1 Histórico

O papel dos ratos como transmissores de leptospiras foi demonstrado por um grupo de investigadores japoneses no início do século XX. Um trabalho de revisão dos dados epidemiológicos do Japão da época associado ao relato de uma série de experimentos em animais serviram de base para esta publicação histórica do ano de 1917. Baseados na relação conhecida entre leptospirose e o solo ou água estagnada, Miyajima investigou a presença de espiroquetas no tecido renal de camundongos do campo (*Microtus*) observando a presença de organismos de morfologia idêntica às leptospiras patogênicas - conhecidas na época como *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*. Como o soro imune contra leptospiras que causavam doença humana era capaz de destruir as bactérias isoladas dos animais, concluiu-se que eram a mesma espiroqueta e que camundongos podiam participar da transmissão da infecção. Ido et al examinaram diversas espécies de ratos e camundongos capturados em ambientes rurais e peridomiciliares, encontrando leptospiras nas emulsões de tecido renal destes animais. Posteriormente, demonstraram que a administração intraperitoneal em cobaias de uma emulsão de tecido renal ou urina de rato era capaz de reproduzir os achados de icterícia, hemorragia e ampla disseminação de leptospiras no fígado, de modo semelhante à doença de Weil descrita em humanos (IDO et al. 1917).

Em conjunto, as observações dos investigadores japoneses permitiram uma série de conclusões que seriam importantes para o conhecimento científico sobre a leptospirose: 1) ratos tornam-se portadores crônicos sem nenhum sinal clínico de doença e excretam leptospiras virulentas em sua urina; 2) o exame direto só encontra leptospiras no tecido renal e na urina de rato, e não em outros tecidos ou no sangue, sugerindo uma predileção pela colonização do tecido renal de modo semelhante ao que já era conhecido sobre a distribuição de leptospiras em cobaias convalescentes; 3) leptospiras de camundongos em

geral determinavam doenças menos graves em cobaias do que os organismos transmitidos por ratos, o que predizia o futuro reconhecimento da seletividade de diferentes sorovares por hospedeiros mamíferos (provavelmente dos sorogrupos Ballum e Icterohaemorrhagiae, respectivamente) e seus diferentes graus de virulência (tabela I); e 4) foi possível associar a proximidade de ratos e camundongos com as principais ocupações relacionadas à leptospirose no Japão, tais como cozinheiras urbanas em refeitórios de baixa higiene, trabalhadores rurais e mineradores. Do mesmo modo, os novos conhecimentos permitiram compreender a alta incidência da doença entre os soldados entinchados nos campos de batalha na Europa, na época em que o continente estava conflagrado na Primeira Guerra Mundial. Desde então, uma série de estudos relacionou a ocorrência da doença com a presença de ratos (FAINE et al. 1999).

#### 1.4.2 Ratos como reservatórios

Na epidemia de 1996 em Salvador, *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni foi a principal causa da forma grave da doença nos indivíduos hospitalizados. Como o sorovar Copenhageni pertence ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, cujo principal hospedeiro é o rato (gênero *Rattus*), este achado ressalta a importância deste reservatório na epidemiologia da leptospirose em nosso meio (KO et al. 1999).

Num estudo caso-controle realizado em Salvador, foram identificados como fatores de risco para leptospirose grave: residência próxima a canais de esgoto abertos, inundação desses canais, observação de cinco ou mais ratos peridomiciliares, e exposição ocupacional à água e solo contaminados. Esse estudo ressalta a proximidade de ratos e fontes de água contaminada como fatores independentes de risco, mesmo quando são comparados casos e controles que vivem na mesma área e compartilham o precário sistema sanitário e a infestação peridomiciliar de ratos (SARKAR et al. 2002).

A investigação de ratos capturados em Salvador tem dois relatos principais. Em 1954, foram relatados os achados de necropsia de um paciente com leptospirose demonstrando a presença de leptospiras nos tecidos pelo método de impregnação pela prata de Levaditi. Antes deste estudo, os casos de leptospirose na Bahia remontavam ainda aos pacientes com diagnóstico de febre amarela em que fora relatado isolamento de espiroquetas. Os autores sugeriram que a doença não era rara na cidade e possivelmente vinha sendo subdiagnosticada. Em estudo complementar, na mesma publicação, relataram o exame

microscópico do tecido renal de 229 ratos capturados: 227 *Rattus norvegicus* e 2 *Rattus rattus*. A técnica de Levaditi permitiu a identificação de colonização renal em 29,25% de todos os animais, sendo que a taxa em animais adultos era de 41,4% (ANDRADE & OLIVEIRA. 1954).

Um estudo de reservatórios relacionados às epidemias de leptospirose em Salvador capturou 142 *Rattus norvegicus* em 11 bairros da cidade na vizinhança de domicílios de casos índice entre maio de 1998 e março de 1999, observando 80% de colonização por leptospiras demonstrada pelo isolamento por cultura de urina ou macerado de tecido renal. Fêmeas e adultos tinham maior taxa de colonização. Dos 59 isolados que foram classificados, todos foram identificados como do sorogrupo Icterohaemorrhagiae e do sorovar Copenhageni (FARIA. 2000), o mesmo sorovar encontrado nos casos de leptospirose grave em Salvador (KO et al. 1999). Além disso, um estudo de validação de método de genotipagem de leptospira demonstrou que o padrão do “fingerprinting” das 5 cepas isoladas dos ratos capturados foi idêntico ao de 21 dos 22 isolados de pacientes com leptospirose grave em Salvador, reforçando a importância deste reservatório para infecção humana nas epidemias de Salvador (BAROCCHI et al. 2001).

Em países desenvolvidos, ratos também têm papel importante na transmissão da doença humana. Na cidade de Baltimore, a proximidade de ratos foi sugerida como principal fator de risco para casos esporádicos de leptospirose urbana a partir de investigação que documentou alta prevalência do estado portador determinado por sorologia e PCR nos ratos que habitavam as vizinhanças dos indivíduos infectados (VINETZ et al. 1996). Em outros ambientes como zonas rurais endêmicas da Turquia e nas proximidades de um canal em Rochefort-França, onde foi documentado surto de leptospirose relacionado a exposição recreacional, a investigação de ratos capturados fornece subsídios para relacionar a doença com a presença do estado portador nestes animais (SUNBUL et al. 2001; PERRA et al. 2002). A maior investigação de estado portador em ratos capturados foi realizada em Detroit, Estados Unidos, e revelou que na população de 358 animais examinados, 75% tiveram cultura de tecido renal positiva, 92% tiveram colonização renal através da coloração pela prata em tecido e 90% tinham elevações dos títulos de microaglutinação (THIERMANN. 1977).

#### 1.4.3 Estudos em ratos naturalmente infectados

A primeira avaliação ultraestrutural de colonização renal de ratos por leptospiros surgiu num relato de caso: De Martino et al descreveram os achados ultraestruturais num animal que seria usado para estudos fisiológicos, mas que apresentou contaminação por leptospiros. A microscopia eletrônica de transmissão revelou maciça colonização de espiroquetas em íntimo contato com a superfície luminal das células epiteliais tubulares proximais e foi evidenciado o achado freqüente de leptospiros dentro do citoplasma destas células (DE MARTINO et al. 1969). A contaminação inadvertida de ratos de laboratório foi relatada como um problema freqüente em biotérios demonstrando a facilidade da espécie em tornar-se portador crônico, inclusive com risco para transmissão aos humanos envolvidos na manutenção das colônias (NICOLESCU et al. 1973).

A avaliação ultraestrutural de ratos naturalmente infectados foi mais detalhadamente estudada nos ratos capturados de Detroit. De todos animais coletados durante investigação de campo (THIERMANN. 1977), foram selecionados para microscopia eletrônica de transmissão seis animais que apresentavam as maiores respostas sorológicas determinadas pelos títulos de microaglutinação. A coloração pela prata à microscopia óptica e a microscopia eletrônica de transmissão demonstraram intensa aderência de bactérias à superfície luminal dos túbulos contorcidos proximais. Neste estudo não foram observadas leptospiros nos túbulos distais e, raramente, algumas espiroquetas foram identificadas no citoplasma da célula tubular proximal imediatamente abaixo da borda em escova. Em ratos com respostas sorológicas mais intensas, supostamente refletindo infecções mais recentes, observou-se maior espessamento da membrana basal dos túbulos proximais, que assumia aspecto reticulado e por vezes com focos de partículas granulares (possivelmente depósitos de imunocomplexos), edema intersticial, e focos de infiltrado inflamatório de plasmócitos, linfócitos e histiócitos. Com base nesses achados, foi considerada a possibilidade de que ratos podem desenvolver algum grau de lesão renal rapidamente reversível na fase mais precoce da infecção (STERLING & THIERMANN. 1981). No entanto, informações sobre histopatologia de ratos experimentalmente ou naturalmente infectados disponíveis são escassas para confirmar esta hipótese.

O único relato que temos conhecimento sobre estudo histopatológico de ratos naturalmente infectados deriva de uma análise preliminar de 142 ratos capturados em Salvador entre 1998 e 1999 (FARIA. 2000). O estudo histopatológico demonstrou um amplo espectro de lesões tais como glomerulonefrite proliferativa focal segmentar mesangial; degeneração tubular hialina-goticular; necrose tubular; proteinúria cortical,

glomerular e tubular; regeneração tubular; pielite crônica; pielonefrite aguda com abscessos; fibrose intersticial e calcificação multifocal. Dificilmente, todas essas alterações poderiam ser atribuídas a infecção por leptospiros visto que estes animais estão expostos à uma ampla gama de agressões tóxicas e infecções em seu habitat. De modo importante, uma nefrite intersticial mononuclear descrita nos modelos experimentais de leptospirose também foi detectada em 50% de todos os casos estudados. Por outro lado, a necrose tubular só foi observada em apenas 5% dos casos avaliados. Desta forma, o modelo experimental poderá auxiliar na compreensão das interações entre leptospiros e o hospedeiro reconhecido como resistente sem a interferência de patologias concomitantes.

O outro relato de estudo histopatológico de ratos capturados infectados por leptospiros remonta às descrições de Laurain da infecção natural em cães e ratos, e experimental em cobaias e hamsters. Em onze ratos capturados em Denver, Estados Unidos, quatro apresentavam nefrite intersticial leve sendo que em apenas um deles a infecção por leptospira foi comprovada através da impregnação pela prata no tecido renal. Além disso, os animais exibiam miocardite, abscessos, granulomas hepáticos por *Capillaria hepatica* e outras infecções parasitárias ressaltando a possibilidade de que os achados inflamatórios renais não poderiam ser creditados com segurança às leptospiros (LAURAIN. 1955). A observação de infecção experimental sem alterações histopatológicas concomitantes foi relatada recentemente (NALLY et al. 2005), embora esteja incluído num contexto de dados ainda não publicados.

#### 1.4.4 Ratos como modelo experimental

A investigação da infecção experimental em ratos até o presente foi muito limitada e restrita às avaliações de microbiologia (THIERMANN. 1981; NATARAJASEENIVASAN & RATNAM. 1997). No primeiro estudo foi demonstrado que a infecção pelo sorovar *Icterohaemorrhagiae* promoveu colonização do tecido renal durando por todo período do experimento, 220 dias, enquanto outro sorovar não adaptado a ratos, o *Grippotyphosa*, causa apenas leptospirúria transitória (THIERMANN 1981). Por outro lado, no segundo estudo, ratos infectados com sorovar *Javanica* invariavelmente evoluíram para estador portador sem sintomas, enquanto camundongos tiveram outros desfechos incluindo doença letal ou sobrevivência com desaparecimento de leptospiros do tecido renal (NATARAJASEENIVASAN & RATNAM. 1997).

Além das descrições da história natural da infecção, o modelo de ratos já foi utilizado na tentativa de induzir doença e reconhecer mecanismos de resistência. Entretanto, apesar do potencial para compreensão das interações patógeno/hospedeiro, existe ainda grande campo de estudo nesta área.

Após sucessivas tentativas reproduzir doença aguda em ratos através de esplenectomia, tratamento com corticoesteróides, e dietas deficientes para diversos componentes, o investigador húngaro Bertók administrou dieta com suplemento de DL-etionina (S-etil-homocisteína) conseguindo induzir doença clínica com evolução fatal, culturas positivas, presença de leptospiras nos tecidos e achados morfológicos compatíveis com a leptospirose. Este antimetabólito etionina é um análogo inativo da metionina, um aminoácido fundamental para início da síntese protéica. Este achado sugeriu que a inibição da síntese protéica torna os ratos susceptíveis à leptospirose grave (BERTÓK et al. 1964).

Esta observação foi ampliada com Thiermann que demonstrou a susceptibilidade de ratos Sprague-Dawley tratados com ciclofosfamida, evidenciando o papel da imunidade humoral na resistência natural à doença. Animais submetidos à terapia imunossupressora e inoculados com sorovar *Icterohaemorrhagiae* cepa 820K apresentavam maior quantidade de leptospiras ao exame direto da urina, fase de leptospiremia mais longa, maior taxa de replicação bacteriana e achados patológicos como hemorragia pulmonar e fibrose renal. De modo interessante, mesmo cepas atenuadas em culturas eram capazes de colonizar os rins de ratos após tratamento com ciclofosfamida (THIERMANN. 1980). Este estudo seguiu os relatos de aumento da susceptibilidade de camundongos à leptospirose grave por diversos sorovares após administração de ciclofosfamida (ADLER & FAINE. 1976; ADLER & FAINE. 1977). Nesses experimentos, ratos tratados com 80-120 mg/Kg de ciclofosfamida exibiram sinais de queda de resistência, embora a morte seja um evento excepcional, enquanto camundongos que recebem 300 mg/kg desenvolvem doença aguda com alta letalidade (ADLER & FAINE. 1976; ADLER & FAINE. 1977; THIERMANN. 1980).

O modelo experimental de ratos voltou a despertar interesse como ferramenta para estudo da patogênese da leptospirose recentemente com um estudo de comparação de expressão do antígeno O do LPS nos tecidos de cobaias e ratos infectados. Observou-se por western-blot e por estudos de colocalização que a doença letal em cobaias está associada com menor expressão do antígeno O quando comparadas às leptospiras que são cultivadas *in vitro* ou purificadas de tecido renal de ratos cronicamente infectados (NALLY et al. 2005). Este estudo confirmou uma observação prévia que sugeria a capacidade de leptospiras de

modular a expressão ou estrutura do LPS *in vivo*: o soro de hamsters infectados com macerado de tecido de outros hamsters previamente infectados apresentava menor capacidade de reagir com LPS de leptospiras ao western-blot quando comparados com o soro de animais infectados com cepas cultivadas *in vitro* (BARNETT et al. 1999). Essas observações ressaltam a importância do estudo comparativo de modelos de doença aguda letal e modelos de infecção persistente para compreensão de mecanismos envolvidos na virulência e patogênese. No entanto, assim como em trabalhos anteriores, o modelo de ratos foi caracterizado apenas parcialmente. A disponibilidade de novas tecnologias pode contribuir para o interesse no modelo experimental de ratos, que até hoje foi usado de forma episódica na pesquisa de leptospirose.

O modelo experimental de ratos apresenta ainda um importante campo de pesquisa com potencial contribuição para estudo dos mecanismos de disseminação, tropismo, persistência e resistência à doença. O interesse no modelo experimental de ratos é também impulsionado pela recente publicação do seqüenciamento do genoma do *Rattus norvegicus*, espécie usada em laboratório, e terceiro mamífero com genoma completamente decifrado (GIBBS et al. 2004). Em breve, fatores genéticos de resistência à infecção poderão começar a ser elucidados neste modelo.

**Tabela I.** Classificação genômica e sorológica das principais leptospiros patogênicas de interesse médico e veterinário. (FONTE: adaptado de FAINE. 1999; BRENNER et al. 1999; BHARTI et al. 2003).

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

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

## 2. JUSTIFICATIVA

Uma série de questões fundamentais sobre a patogênese da leptospirose continua sem resposta. Os mecanismos de adaptação ao hospedeiro e os fatores que determinam a seletividade de diferentes sorovares a hospedeiros mamíferos distintos permanecem mal compreendidos. Muitos avanços recentes sobre fatores de virulência de leptospiras e mecanismos de resposta imune aumentaram nosso potencial para compreender a doença. A recente publicação do seqüenciamento do genoma da *Leptospira interrogans* permitirá uma nova era na investigação da leptospirose (REN et al. 2003; NASCIMENTO et al. 2004)..

Neste contexto, um modelo de animais resistentes ganha importância para compreensão dos mecanismos de colonização e de resistência natural à doença. Ratos são freqüentemente estudados na cadeia epidemiológica da leptospirose, mas os relatos sobre a infecção experimental são escassos. Nesta nova era da pesquisa da leptospirose, as relações entre leptospiras e seu principal hospedeiro permanecem pouco compreendidas. Recente publicação ressalta o valor de estudos comparativos em modelos de doença aguda letal e infecção persistente para compreensão dos mecanismos de doença (NALLY et al. 2005), no entanto, o modelo de ratos foi usado sem caracterização prévia do comportamento da infecção neste hospedeiro. A maioria dos estudos prévios usando ratos como modelo experimental foi limitada pela falta de caracterização paralela da cepa infectante em modelo de animais susceptíveis à doença letal. Para estabelecimento do modelo de ratos, realizamos também detalhado estudo da patologia de hamsters para caracterização do comportamento da mesma cepa padronizada nos dois modelos estudados.

Os poucos relatos de infecção experimental de ratos também não focaram na avaliação de alterações associadas ao estabelecimento da colonização renal, ou ao tempo necessário para estabelecimento do estado portador. Em sua grande maioria, esses estudos concentram-se nos resultados de cultura. A compreensão do modelo experimental requer, portanto, mais profunda avaliação do tempo necessário para colonização dos rins e alterações associadas. Além disso, é de importância documentar se há diferença de susceptibilidade dos animais considerados resistentes em função de sua idade, já que este parece ser o caso de outros roedores (ADLER et al. 1980; BARNETT et al. 1999).

Para estudos de disseminação, ratos também representam um atraente modelo visto que o processo de invasão dos tecidos não é influenciado por lesões concomitantes ou mesmo interrompido pelo óbito do animal experimentalmente infectado. No presente estudo,

avaliamos a detecção de leptospiros num ensaio de cinética de disseminação como ponto de partida para avaliações quantitativas futuras.

Uma questão fundamental não respondida até o momento é se ratos são naturalmente resistentes à doença subletal ou podem exibir alterações histológicas que representem recuperação de uma leptospirose aguda. A única investigação disponível sobre este tema relata que, entre ratos urbanos capturados, aqueles com maiores títulos de microaglutinação apresentam focos de infiltrado mononuclear com predomínio de plasmócitos (STERLING & THIERMANN. 1981). Este achado sugeriu que infecções mais recentes estavam relacionadas às alterações que podem representar um passado de doença aguda. O contraste entre a intensa colonização renal e ausência de indicadores de doença é um fenômeno amplamente reconhecido, porém pouco investigado. Dados sobre estudos histopatológicos de ratos experimentalmente infectados tanto da fase recente quanto da crônica da infecção de ratos por leptospiros patogênicos são escassos.

Um dos pontos fundamentais da pesquisa atual em doenças infecciosas é compreender que fatores do hospedeiro ou dos patógenos são capazes de transformar um processo de colonização indolente em doença clínica grave (MERRELL & FALKOW. 2004). Este, inclusive, é um antigo questionamento no estudo da leptospirose: como ratos são portadores crônicos, mantêm infecções em populações humanas com excreção de grande quantidade de leptospiros, e permanecem altamente resistentes à doença? O modelo de infecção experimental de ratos por leptospiros patogênicos tem potencial para responder uma série de questões sobre invasão e colonização, que já foi estudado em modelos *in vitro* e *in vivo*, porém permanecem pouco compreendidos (MILLER & WILSON. 1967; MARSHALL. 1974; MILLER et al. 1974; MARSHALL. 1976; BALLARD et al. 1986; THOMAS & HIGBIE. 1990; BAROCCHI et al. 2002; TRUCCOLO et al. 2002). Da mesma forma, os mecanismos de resistência tem grande campo de investigação neste modelo, especialmente após o conhecimento da seqüência completa do genoma de *Leptospira interrogans* (REN et al. 2003; NASCIMENTO et al. 2004) e do *Rattus norvegicus* (GIBBS et al. 2004).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer o modelo de ratos experimentalmente infectados com leptospiros patogênicas para estudos subseqüentes de colonização, tropismo e patogênese.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Caracterizar a virulência da cepa *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1130 na passagem 4.7, descrever a patologia associada no modelo de doença aguda (hamster) e estabelecer uma cepa capaz de induzir doença letal ou infecção persistente nos modelos de hamster e ratos, respectivamente.
- 3.2.2 Identificar tempo para estabelecimento de colonização, tempo de persistência de colonização, e influência do inóculo neste processo focalizando o tecido renal no modelo experimental de ratos.
- 3.2.3 Identificar alterações histopatológicas no curso da infecção experimental de ratos por leptospiros patogênicas comparando-as com aquelas observadas em animais susceptíveis à doença aguda (hamsters).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 BACTÉRIAS

A cepa utilizada nos experimentos foi *Leptospira interrogans* sensu stricto sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130, isolada através de hemocultura de um paciente com leptospirose grave da cidade de Salvador durante a epidemia de 1996 (KO et al. 1999). A cepa foi mantida em culturas no meio EMJH (Ellinghausen e McCullough modificado por Johnson e Harris) (FAINE. 1999) e a recuperação da virulência foi obtida através de quatro passagens em hamsters. A cepa inoculada é de baixa passagem *in vitro*, sendo obtida após 7 passagens em cultura. Em avaliações prévias, mais de 40 passagens são necessárias para atenuação da virulência desta cepa. A concentração de leptospiros em cada inoculação será aferida através de contagem em câmara de Petroff-Hausser.

### 4.2 ANIMAIS E EXPERIMENTOS

#### 4.2.1 Hamsters

Para avaliação da virulência e patologia num modelo experimental susceptível à doença aguda letal, foram utilizados hamsters da linhagem *Golden Syrian* com 9 semanas de idade. Os animais foram infectados por via intraperitoneal e mantidos em microisoladores sendo necropsiados em intervalos determinados. Os animais controle foram inoculados com 1 ml de meio EMJH estéril. Em cada experimento, os animais foram sacrificados em câmara de gás carbônico e durante a necrópsia foram coletadas amostras de tecidos fixados em solução de formol salino a 4%. Nos experimentos para reprodução da doença aguda (grupo 3, abaixo), fragmentos de tecido renal foram imediatamente macerados em seringa estéril e misturados a meio EMJH, sendo repicados até 60 minutos para novo tubo com meio EMJH para reisolamento das cepas.

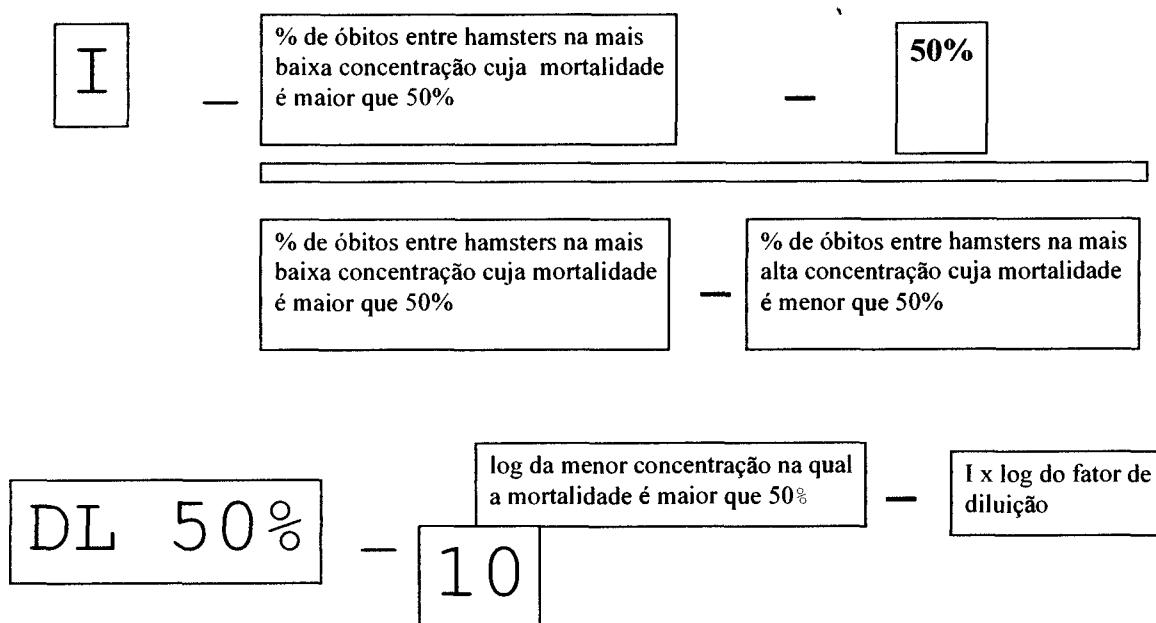
Desenho dos experimentos:

- 1) Cálculo da dose letal 50% (DL50%) e avaliação da patologia de hamsters convalescentes. Em quatro diferentes experimentos, grupos de 8 hamsters de nove semanas, pareados por sexo, foram infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1130 na passagem 4.7, pela via intraperitoneal. Nos dois

primeiros experimentos, foram incluídos grupos inoculados com  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  leptospiras. No terceiro experimento foram incluídos grupos de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  leptospiras. No quarto experimento, foram incluídos grupos de  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  leptospiras. Nos experimentos B e C, os sobreviventes foram examinados após 28 dias para caracterização da patologia da leptospirose convalescente em hamsters.

- 2) Reprodução de doença aguda letal em hamsters de nove semanas infectados por inóculo de  $10^3$  *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1130 na passagem 4.7, pela via intraperitoneal. Em dois experimentos, um grupo de 6 hamsters foi comparado a dois animais controles inoculados apenas com 1ml de meio EMJH estéril por via intraperitoneal.
- 3) Reprodução de doença aguda letal em hamsters de vinte semanas infectados por altos inóculos ( $10^6$ - $10^7$ ) de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1130 na passagem 4.7, pela via intraperitoneal. Sete animais infectados foram comparados a três controles não infectados (tabela 2).

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



#### 4.2.2 Ratos

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar entre 3 e 5 semanas de vida. Os animais foram infectados por via intraperitoneal e mantidos em microisoladores sendo necropsiados em intervalos determinados. Os animais controle foram inoculados com 1 ml de meio EMJH estéril. Em cada experimento, os animais foram sacrificados em câmara de gás carbônico e durante a necrópsia foram coletadas amostras de tecidos. As amostras tissulares foram congeladas e armazenadas em  $-70^{\circ}\text{C}$ , enquanto outras foram fixadas em solução de formol salino a 4%. Fragmentos de tecido renal foram imediatamente macerados em seringa estéril e misturados a meio EMJH, sendo repicados até 60 minutos para novo tubo com meio EMJH para reisolamento das cepas. Em alguns experimentos, as amostras foram também fixadas apropriadamente para estudo de microscopia eletrônica de varredura, incluindo perfusão com solução fixadora para os casos que incluíram microscopia de varredura (adiante).

##### Desenho dos experimentos:

- 1) Experimentos pilotos para avaliação de colonização em ratos 28 dias após inóculo intraperitoneal com  $10^8$  *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1130 na passagem 4.7. No primeiro experimento, foram usados animais de 3 semanas. No segundo experimento, foram usados animais de 4 semanas. Em ambos, três fêmeas infectadas foram comparadas à fêmea controle inoculada com 1 ml de meio EMJH estéril.
- 2) Experimentos para avaliação do papel do inóculo na determinação de colonização renal após 28 dias da infecção intraperitoneal por diluições seriadas de  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1130 na passagem 4.7. No primeiro experimento, grupos de duas fêmeas por inóculos foram comparadas a duas fêmeas inoculadas com 1 ml de meio EMJH estéril. No segundo experimento, grupos de quatro animais, pareados por sexo para cada inóculo, foram comparados a dois animais, pareados por sexo, inoculados com 1 ml de meio EMJH estéril.
- 3) Experimento de cinética de disseminação: 16 ratos de 4 semanas, fêmeas, infectadas com  $10^8$  *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1130 na passagem 4.7 examinados em intervalos de zero à 11 dias pós-inóculo para estudo de cinética de disseminação de leptospiros nos tecidos (tabela 6).

- 4) Experimento para avaliação do tempo necessário para estabelecimento de colonização renal: grupos de 4 ratos de 5 semanas, pareados por sexo, infectados  $10^8$  *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1130 na passagem 4.7 examinados em intervalos de sete dias para avaliação da persistência da colonização renal. Controles em cada intervalo semanal foram representados por animais inoculados com 1 ml de meio EMJH estéril.
- 5) Experimentos para determinação do tempo de persistência da colonização renal em animais inoculados com  $10^8$  *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1130 na passagem 4.7. No primeiro experimento, grupos de três fêmeas foram necropsiadas em intervalos de 1, 2, 3 e 4 meses e comparadas com uma fêmea controle ao final do 1º mês e do 4º mês de infecção. No segundo experimento, grupos de quatro ratos, pareados por sexo para cada intervalo mensal, foram comparados com um animal controle em cada intervalo.

Para cálculo da dose infectante capaz de induzir colonização do tecido renal de ratos após 28 dias foi utilizada a fórmula de Reed-Muench modificada.

### 4.3 MICROSCOPIA ÓPTICA E IMPREGNAÇÃO PELA PRATA

Tecidos de animais controle e infectados foram fixados em formaldeído salino a 4% e submetidos ao processamento de rotina. Os blocos de parafina foram cortados em secções de 4  $\mu$ m de espessura e corados com hematoxilina e eosina (H&E). Lesões como focos de hemorragia intra-alveolar, ou presença de polimorfonucleares nas luzes tubulares renais foram classificadas de maneira semi-quantitativa segundo o seguinte critério: + (menos de 1 foco observado por campo de 40X), ++ (1 ou 2 focos observados por campo de 40X), e +++ (mais de 2 focos observados por campo de 40X). Especificamente em relação a classificação semi-quantitativa do infiltrado inflamatório linfo-histiocitário do tecido renal foram usados os seguintes critérios: + (menos de 1 foco observado por campo de 40X), ++ (1 ou 2 focos observados por campo de 40X ou focos maiores de infiltrado linfo-histiocitário além da localização restrita a zonas periarteriais e permeando segmentos tubulares), e +++ (mais de 2 focos observados por campo de 40X ou focos maiores com freqüentes polimorfonucleares neutrófilos intersticiais ou agregados nas luzes tubulares)

A coloração de Warthin-Starry para visualização de espiroquetas foi padronizada a partir de seu protocolo descrito (FAINE. 1965; FAINE. 1982). Secções desparafinizadas foram imersas em solução de nitrato de prata 1% (Avi-Cenna) em ambiente escuro a 56°C por 60 minutos. As secções foram posteriormente imersas rapidamente, em ambiente escuro, na solução reveladora: 15 ml de gelatina 5% (Vetec), 8 ml de hidroquinona 0,3% (Nuclear) e 6 ml de nitrato de prata 2% (Avi-Cenna). As lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas e montadas em lamínulas com bálsamo do Canadá.

#### 4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Para as amostras programadas para estudo em microscopia eletrônica de varredura, a perfusão foi realizada com solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7.2). Animais selecionados foram anestesiados com solução de ketamina e xilazina e a perfusão foi feita por via intracardíaca utilizando escalpe nº 21 acoplado a um equipo de soro. A circulação da solução foi mantida pela secção da aorta abdominal abaixo dos vasos renais com desprezo do fixador. Rins fixados foram seccionados no maior eixo e secções incluindo a transição corticomedular foram mantidas na solução fixadora por uma hora. Em seguida, o material foi lavado em tampão cacodilato em três banhos de 10 minutos. A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7.2) por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro. O material foi lavado novamente três vezes em tampão cacodilato e desidratado 4°C em acetona 30%, 50% e 70% por 10 minutos. As lamínulas foram aderidas ao suporte de varredura e a desidratação foi continuada com acetona a 90% por 10 minutos e dois banhos em acetona a 100%, seguido de ponto crítico e metalização com ouro. A análise e as micrografias foram realizadas no Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro em microscópio eletrônico de varredura Jeol 5310 (ROCHA et al. 2004). As fotomicrografias documentadas incluíram magnificações de 100, 5000 e 15000X.

#### 4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Amostras congeladas em -70°C foram cortadas em secções de 4-5 µm de espessura e aderidas a lâminas tratadas com poli-L-lisina (Sigma). Os cortes foram fixados em acetona, lavados três vezes em solução salina tamponada fosfatada (PBS), e submetidos a bloqueio

de reação inespecífica com solução de albumina de soro bovino BSA (Sigma) 4mg/ml duas vezes por 20 minutos. Os tecidos foram lavados novamente em PBS e incubados por uma hora, em temperatura ambiente, com anticorpo primário policlonal (diluição 1:400), preparado a partir da imunização de coelhos New Zealand White com antígeno bruto de *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae cepa RGA. Os anticorpos foram diluídos em BSA (Sigma) 4mg/ml. Os antisoros selecionados exibiam títulos de microaglutinação superiores a 12.000. As secções foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo monoclonal anti-IgG de coelho conjugado com FITC (Jackson Immunoresearch) na diluição 1:400, por uma hora. As lâminas foram montadas com lamínulas em glicerol. Controles negativos consistiram em cortes congelados de tecidos de animais não infectados submetidos ao mesmo procedimento. Além disso, em cada experimento, cortes de tecidos com infecção previamente confirmada foram incubados com soro não imune de coelho para exclusão de reação inespecífica.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 PATOLOGIA EXPERIMENTAL EM HAMSTERS

Quatro experimentos para avaliar a virulência da cepa estudada foram realizados. Conforme listado na tabela 1, os dois primeiros experimentos (A e B) indicaram que a dose letal 50% para *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 na passagem 4.7, em hamsters de nove semanas, é menor que  $10^2$  leptospiras. Nos dois experimentos seguintes (C e D) foram calculadas doses letais 50% de  $10^{1,5}$  (equivalente a 32) leptospiras e em  $10^{1,75}$  (equivalente a 56) leptospiras, respectivamente.

A fim de comprovar que as leptospiras patogênicas usadas para infecção experimental de ratos são capazes de reproduzir os achados histopatológicos da leptospirose em animais susceptíveis, foram realizadas necropsias de hamsters experimentalmente infectados. A alta letalidade foi confirmada nos controles dos ensaios de imunoproteção, embora 2 de 12 animais sobreviveram (tabela 2). A maior parte dos óbitos distribuíram-se entre o 8º e 11º dia pós-infecção. Desta maneira, os resultados da tabela 1 permitem observar alterações histopatológicas características da leptospirose aguda. A tumefação multifocal do epitélio tubular renal, a dissociação das células hepáticas desorganizando a arquitetura trabecular, e a hemorragia intra-alveolar são os achados mais marcantes destes grupos de animais. A tumefação do epitélio tubular ocorreu em 8 de 12 animais (67%), estando presente em 8 dos 10 (80%) animais que apresentaram doença letal. A dissociação difusa de hepatócitos foi observada em 7 de 11 hamsters (64%), e 7 de 9 (78%) com doença letal.

O experimento subsequente avaliou as alterações observadas em hamsters infectados com inóculos mais altos -  $10^7$  e  $10^6$  - aproximando-se do que seria utilizado para o modelo de ratos. Um óbito foi observado no quarto dia pós-infecção enquanto todos os outros animais inoculados foram sacrificados por apresentar-se em estado moribundo no quinto dia. Em comparação com os experimentos com doses menores, o tempo de evolução para o óbito foi encurtado nesses animais (tabela 3). Entre os achados patológicos foram documentados a tumefação celular do epitélio tubular proximal do rim (figura 1), hemorragias no tecido renal (figura 2), desarranjo da arquitetura trabecular hepática (figura 3) e hemorragia intra-alveolar (figura 4). Além disso, freqüentes leptospiras puderam ser detectadas em íntima relação com a superfície luminal de células tubulares proximais do rim (figura 7).

**Tabela 1** – Experimentos de dose letal 50% em hamsters de nove semana infectados com diluições seriadas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130, na passagem 4.7, por via intraperitoneal.

<b>Experimento A</b>		Óbitos	Letalidade	Óbitos	Letalidade	Dias para o óbito	
Concentração	em fêmeas			em machos		fêmeas	machos
10 <sup>7</sup>	3/4	75%		4/4	100%	6,6,8	6,6,6,10
10 <sup>6</sup>	4/4	100%		2/4	50%	6,7,7,9	13,14
10 <sup>5</sup>	3/4	75%		4/4	100%	7,8,10	8,8,9,15
10 <sup>4</sup>	4/4	100%		4/4	100%	10,10,11,18	9,10,10,11
10 <sup>3</sup>	4/4	100%		4/4	100%	9,12,12,17	12,12,14,14
10 <sup>2</sup>	4/4	100%		4/4	100%	11,12,13,14	11,11,11,12
<b>Experimento B</b>		Óbitos	Letalidade	Óbitos	Letalidade	Dias para o óbito	
Concentração	em fêmeas			em machos		fêmeas	machos
10 <sup>7</sup>	4/4	100%		4/4	100%	7,8,9,15	7,7,10,10
10 <sup>6</sup>	4/4	100%		3/4	75%	7,7,8,11	6,7,8
10 <sup>5</sup>	3/4	75%		4/4	100%	8,8,12	8,8,8,9
10 <sup>4</sup>	4/4	100%		4/4	100%	10,10,10,12	8,9,9,9
10 <sup>3</sup>	4/4	100%		4/4	100%	11,11,11,11	10,10,11,11
10 <sup>2</sup>	2/4	50%		4/4	100%	13,14	11,11,11,13
<b>Experimento C</b>		Óbitos	Letalidade	Óbitos	Letalidade	Dias para o óbito	
Concentração	em fêmeas			em machos		fêmeas	machos
10 <sup>6</sup>	4/4	100%		4/4	100%	6,7,7,9	7,7,7,7
10 <sup>5</sup>	4/4	100%		4/4	100%	7,7,8,8	7,8,10,11
10 <sup>4</sup>	3/4	75%		4/4	100%	8,9,12	8,8,8,9
10 <sup>3</sup>	4/4	100%		4/4	100%	10,10,12,13	10,11,11,12
10 <sup>2</sup>	2/4	50%		3/4	75%	11,12	10,11,11
10 <sup>1</sup>	1/4	25%		2/4	50%	11	11,12
<b>Experimento D</b>		Óbitos	Letalidade	Óbitos	Letalidade	Dias para o óbito	
Concentração	em fêmeas			em machos		fêmeas	machos
10 <sup>5</sup>	4/4	100%		4/4	100%	10,11,11,14	8,8,10,10
10 <sup>4</sup>	4/4	100%		4/4	100%	10,10,10,10	9,9,10,10
10 <sup>3</sup>	4/4	100%		4/4	100%	10,11,11,11	10,11,13,14
10 <sup>2</sup>	2/4	50%		3/4	75%	14,14	11,11,12
10 <sup>1</sup>	0/4	0%		1/4	25%	-	11
10 <sup>0</sup>	0/4	0%		0/4	0%	-	-

**Tabela 2** – Alterações histopatológicas observadas em hamsters de 9 semanas infectados com  $10^3$  *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 por via intraperitoneal.

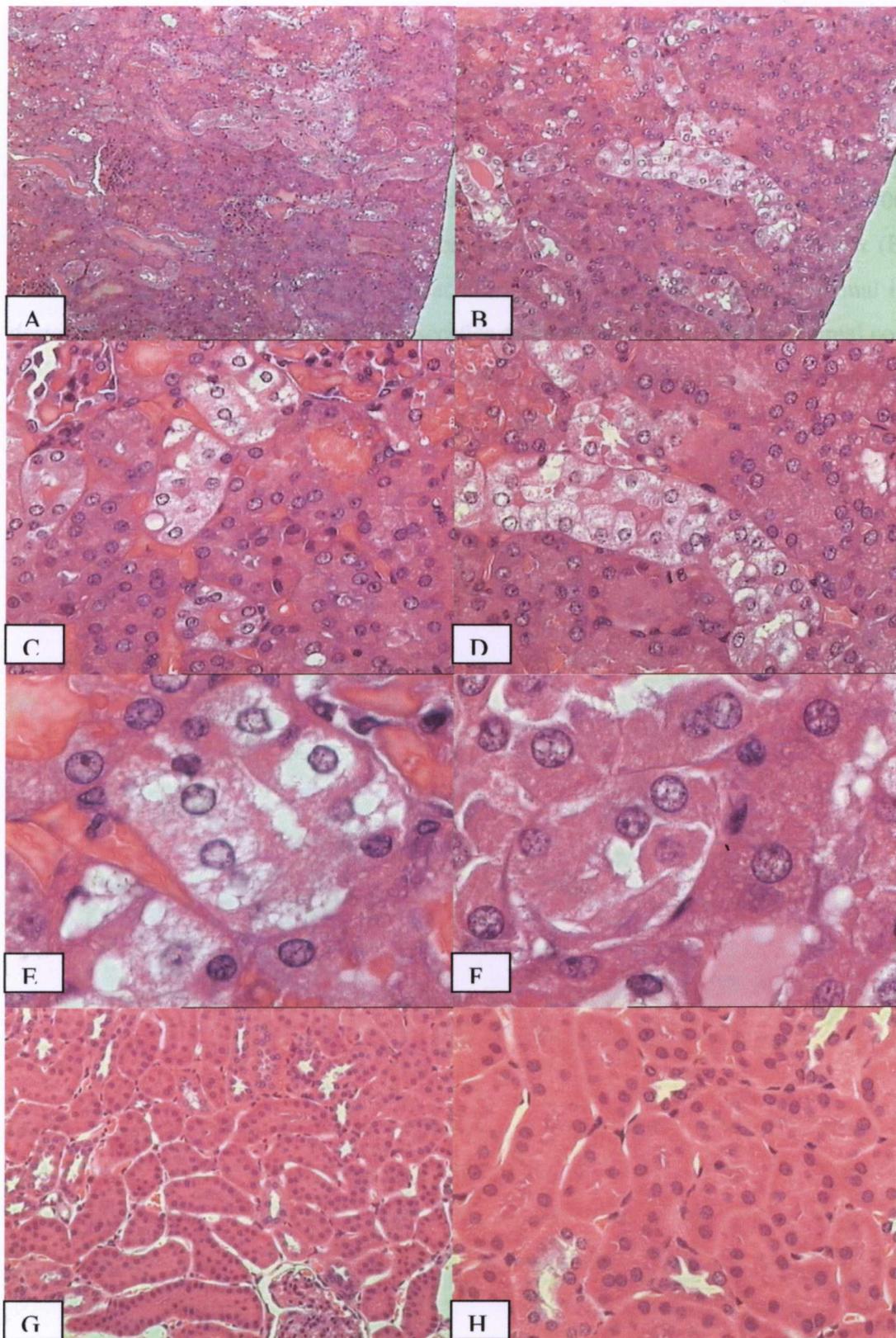
	Experimento E		Experimento F	
	Infectados n(%)	Controles n(%)	Infectados n(%)	Controles n(%)
Óbitos	4/6 (67)	0/2 (0)	6/6 (100)	0/2 (0)
<b>Rim</b>				
Tumefação multifocal do epitélio tubular	3/6 (50)	0/2 (0)	5/6 (83)	0/2 (0)
Regeneração focal ou multifocal	1/6 (17)	0/2 (0)	1/6 (17)	0/2 (0)
Nefrite intersticial	2/6 (33)	0/2 (0)	3/6 (50)	0/2 (0)
Warthin-Starry do tecido renal	2/6 (33)	0/2 (0)	3/6 (50)	0/2 (0)
Fígado – dissociação difusa dos hepatócitos	2/5 (40)	0/2 (0)	5/6 (83)	0/2 (0)
<b>Pulmões</b>				
Hemorragia intra-alveolar ++ ou +++	1/5 (20)	0/2 (0)	4/5 (80)	0/2 (0)
Hemorragia intra-alveolar +	0/5 (0)	0/2 (0)	0/5 (0)	0/2 (0)

Nota: todos animais são machos no experimento 1 e fêmeas no experimento 2. Os animais sobreviventes foram necropsiados após 28 dias de infecção.

**Tabela 3** – Alterações histopatológicas observadas em hamsters de 20 semanas infectados com altos inóculos de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 por via intraperitoneal.

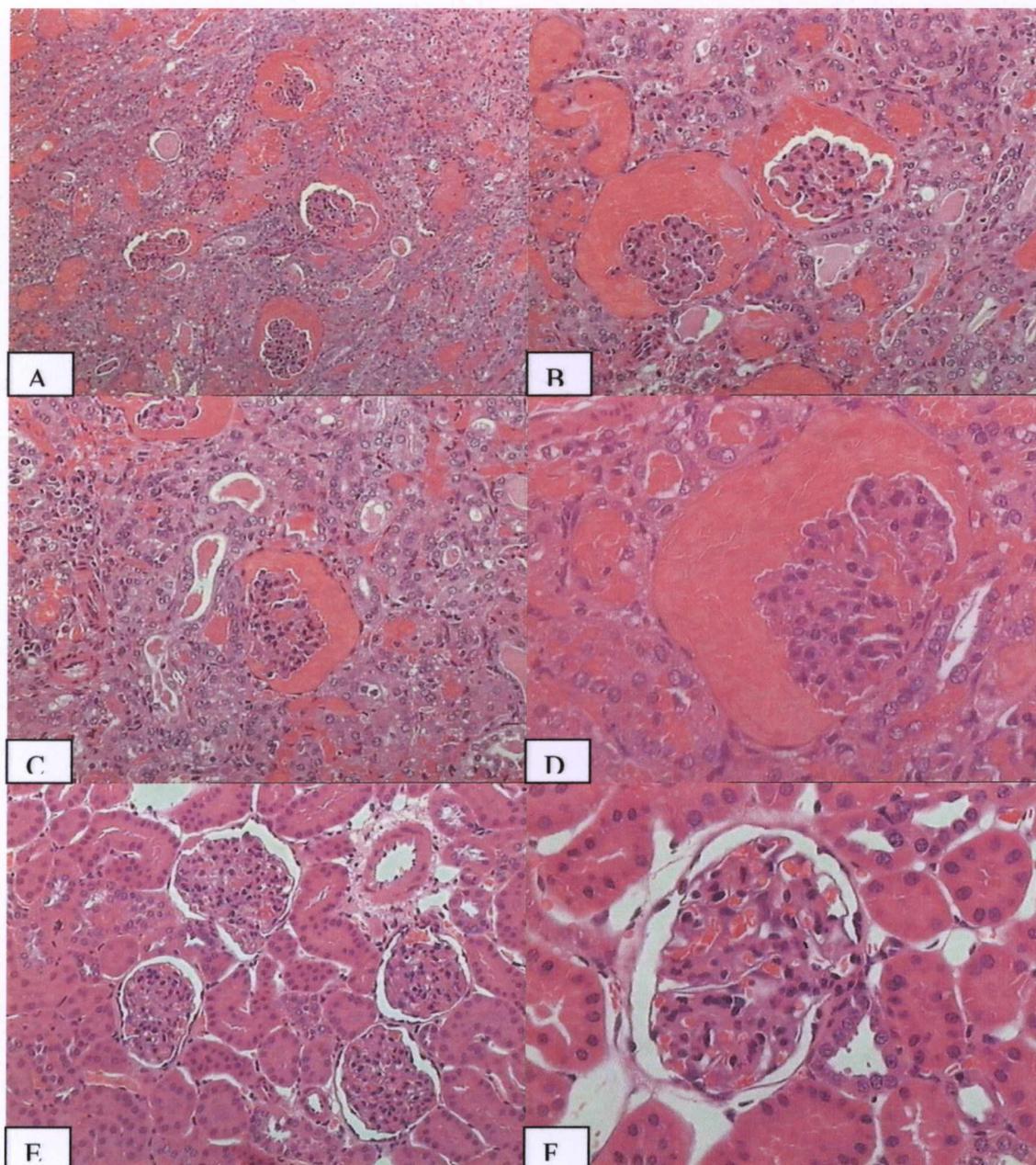
	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	Controles
	n(%)	n(%)	n(%)
Número total de hamsters	02 (100)	05 (100)	03 (100)
Machos	02 (100)	02 (40)	01 (33)
Fêmeas	00 (0)	03 (60)	02 (67)
Óbitos	1/2*(50)	0/5 (0)	00 (0)
Estado moribundo	1/2 (50)	5/5 (100)	00 (0)
<b>Rim</b>			
Tumefação multifocal do epitélio tubular	1/2 (50)	4/5 (80)	0/3 (0)
Hemorragia intersticial renal ++ ou +++	2/2 (100)	1/5 (20)	0/3 (0)
Nefrite intersticial (infiltrado linfo-histiocitário) +	1/2 (50)	4/5 (80)	0/3 (0)
Warthin-Starry do tecido renal	2/2 (100)	5/5 (100)	0/3 (0)
Fígado – dissociação difusa dos hepatócitos	2/2 (100)	5/5 (100)	0/3 (0)
<b>Pulmões</b>			
Hemorragia intra-alveolar ++ ou +++	2/2 (100)	3/5 (60)	0/3 (0)
Hemorragia intra-alveolar +	0/2 (0)	1/5 (20)	0/3 (0)

Nota: um animal foi a óbito no 4<sup>o</sup> dia pós-infecção e todos os infectados apresentavam estado moribundo no 5<sup>o</sup> dia pós-infecção, quando foram realizadas as necropsias.

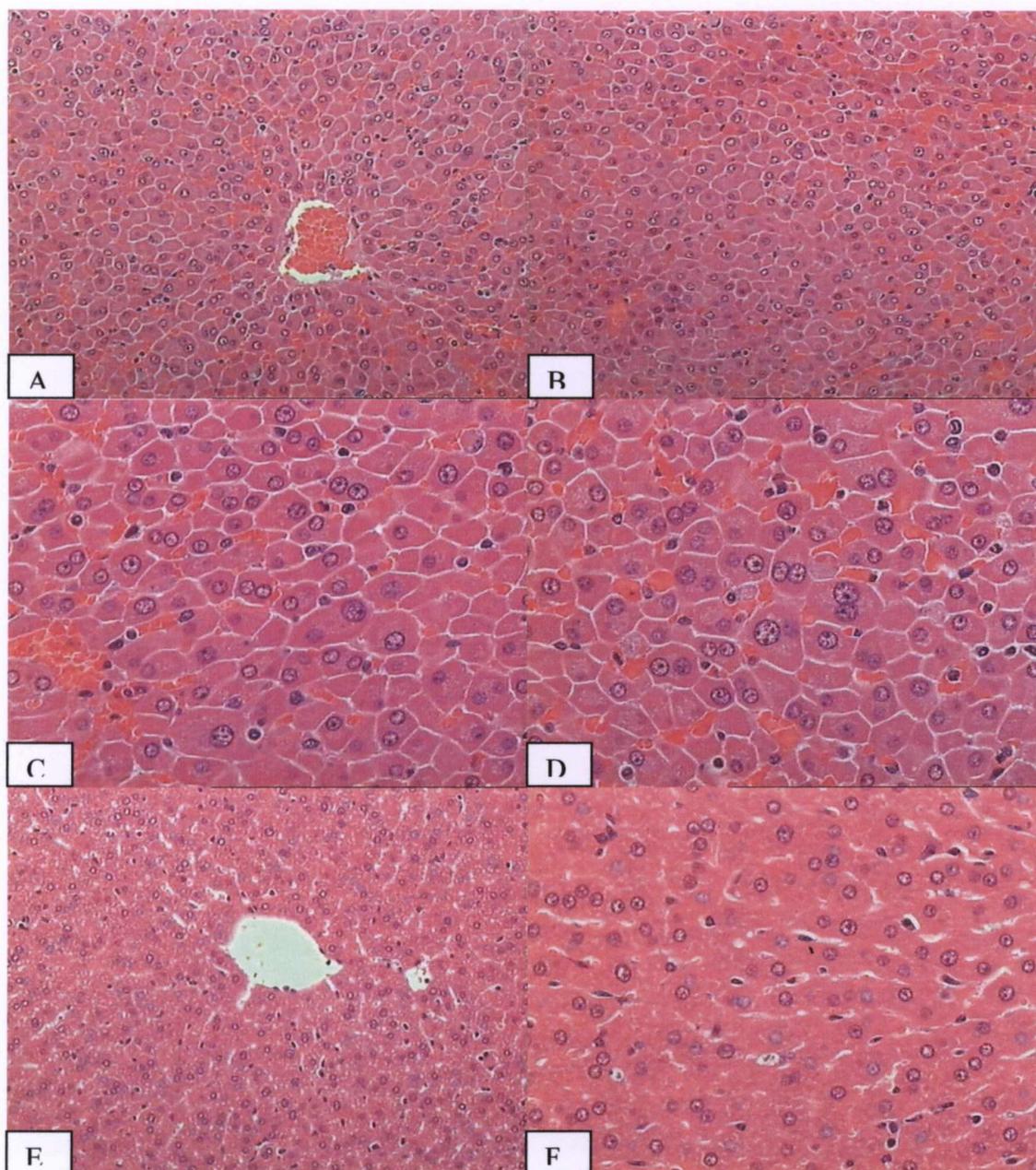


**Figura 1.** Tecido renal de hamster com leptospirose aguda em estado moribundo 5 dias após infecção com  $10^6$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal

(A-F) e hamster controle após 5 dias do inóculo com meio EMJH estéril por via intraperitoneal (G e H). A tumefação das células tubulares proximais é proeminente e pode ser observada em vários segmentos tubulares proximais coexistindo com áreas preservadas (A: aumento de 100x; B: aumento de 200x). Em comparação com as células adjacentes, as células tumefeitas exibem acentuada palidez citoplasmática (C e D: aumento de 400x). O detalhe da morfologia das células degeneradas é mostrado no aumento de 1000x (E e F), sendo que num túbulo pode-se identificar necrose de uma célula tubular proximal isolada destacada da membrana basal (F). Nas secções de córtex do tecido renal do animal controle, os segmentos tubulares proximais exibem eosinofilia citoplasmática características, sem achados patológicos (G: aumento de 200x; H: aumento de 400x).

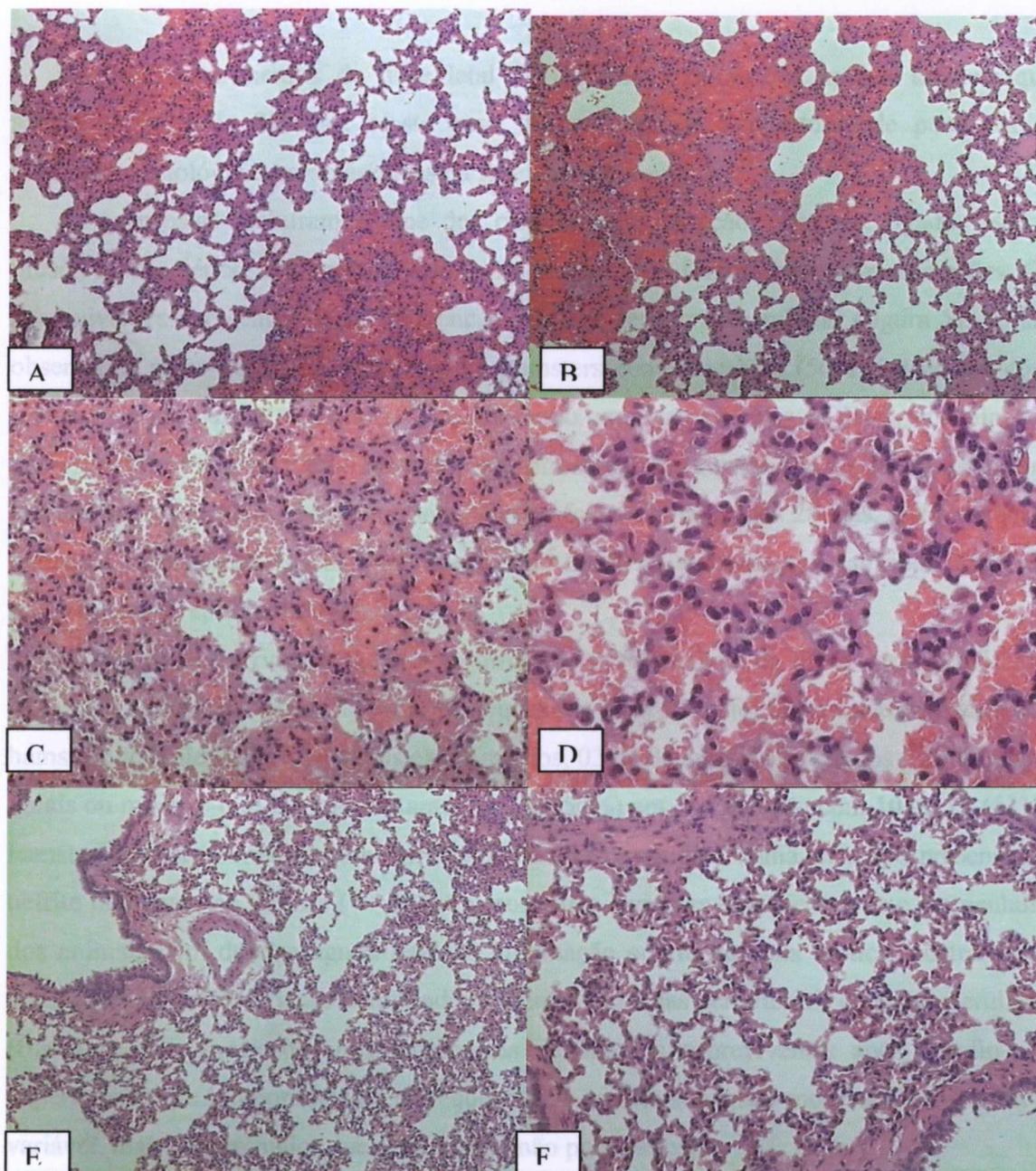


**Figura 2.** Tecido renal de hamster com leptospirose aguda em estado moribundo 5 dias após infecção com  $10^6$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal (A-D) e hamster controle após 5 dias do inóculo com meio EMJH estéril por via intraperitoneal (E e F). O quadro hemorrágico é exemplificado pelas freqüentes áreas de hemorragia intersticial no tecido renal. Em alguns casos, é freqüentemente observada hemorragia no espaço de Bowman glomerular e também no interior das luzes tubulares (A: aumento 100x; B e C: aumento de 200x; D: aumento de 400x). O tecido renal dos animais controle não exhibe zonas de hemorragia (E: aumento de 200x; F: aumento de 400x).



**Figura 3.** Tecido hepático de hamster com leptospirose aguda em estado moribundo 5 dias após infecção com  $10^6$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal (A-D) e hamster controle após 5 dias do inóculo com meio EMJH estéril por via intraperitoneal (E e F). Uma característica marcante da patologia hepática da leptospirose aguda é a perda de coesão dos hepatócitos com dissociação da arquitetura trabecular habitual, como mostrando em área centrolobular (A) e no interior do parênquima (B), ao aumento de 200x. Os hepatócitos apresentam aspecto regenerativo com variação do tamanho do citoplasma, freqüentes imagens de binucleação e atipias nucleares reativas (C e

D, aumento de 400x). No tecido hepático do animal controle, a área centrolobular (E) e o interior do parênquima (F) exibem traves hepáticas organizadas e hepatócitos de aspecto citológico habitual (E: aumento de 200x; F: aumento de 400x).

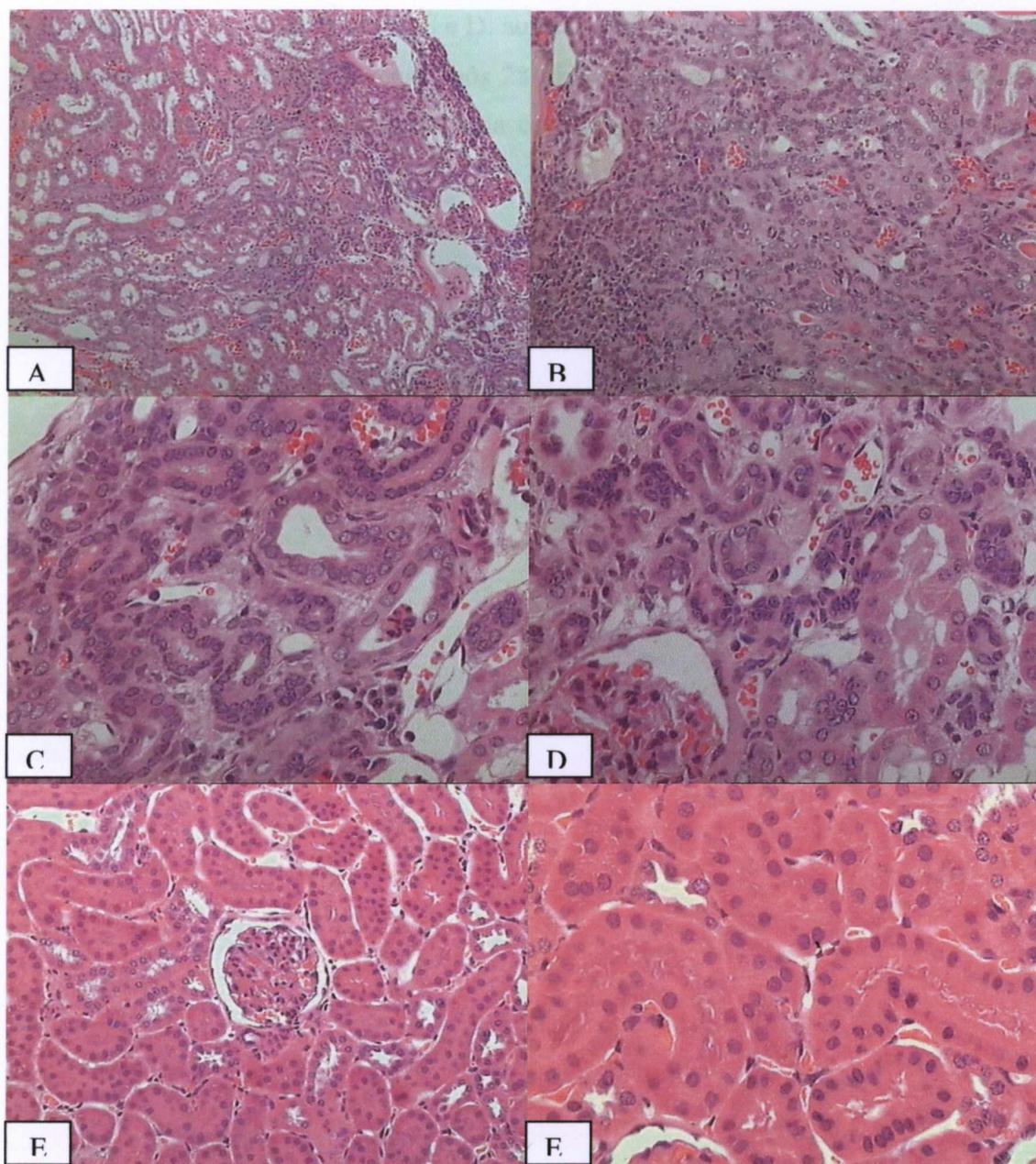


**Figura 3.** Tecido pulmonar de hamster com leptospirose aguda em estado moribundo 5 dias após infecção com  $10^6$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal (A-D) e hamster controle após 5 dias do inóculo com meio EMJH estéril por via intraperitoneal (E e F). O tecido pulmonar exibe focos de hemorragia intra-alveolar (A e B: aumento de 100x; C: aumento de 200x; D: aumento de 400x). O parênquima pulmonar do animal controle não exibe áreas de hemorragia (E: aumento de 100x; F: aumento de 200x).

De dois experimentos de dose letal 50%, foram examinados apenas animais que sobreviveram após 28 dias. Neste caso, foi aproveitada a oportunidade para avaliar alterações histológicas características da fase convalescente.

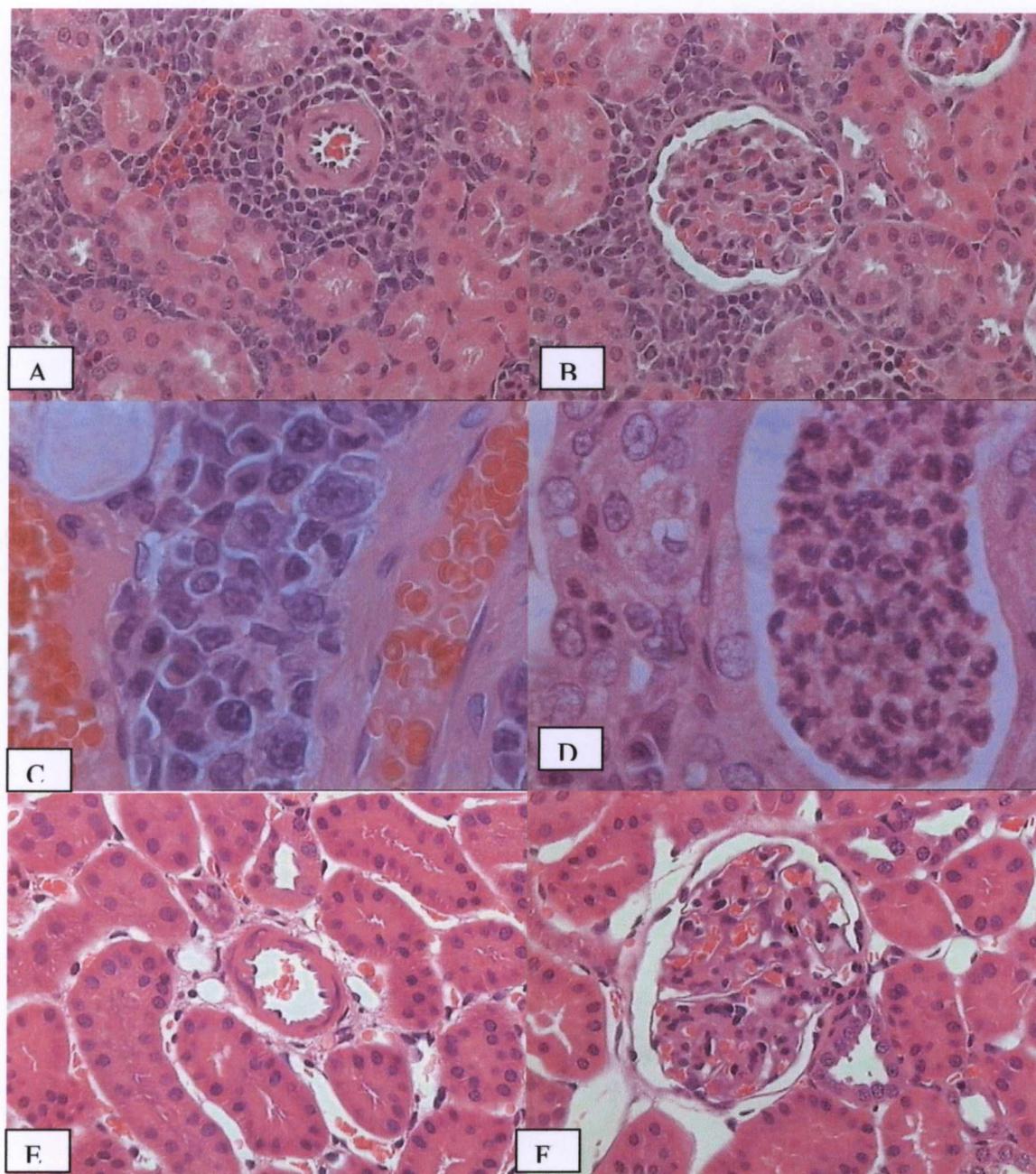
As necropsias incluíram exame dos rins, cérebro, coração, pulmões, fígado, baço e músculo esquelético. No entanto, apenas no tecido renal foram observadas alterações. Os sobreviventes apresentam com frequência focos de regeneração tubular (figura 5). Foram observadas áreas de regeneração em 3/6 hamsters convalescentes (50%) infectados com inóculos iguais ou maiores que  $10^2$ , contrastando com apenas 2 dos 19 (10%) examinados nos experimentos para reprodução de leptospirose aguda (tabelas 2 e 3). Além disso, um dos animais do experimento E que sobreviveu e foi examinado após 28 dias, assim como os hamsters convalescentes dos experimentos de DL50%, apresentaram múltiplas áreas de regeneração do epitélio tubular.

Um quadro de nefrite subaguda com infiltrado predominante de linfócitos e histiócitos, por vezes com coexistência de polimorfonucleares neutrófilos foi um achado marcante dos hamsters convalescentes. Nos dois experimentos, 03 de 06 animais infectados com inóculos iguais ou maiores que  $10^2$  apresentaram nefrite (50%) em comparação com 10 de 19 (53%) hamsters dos experimentos para reprodução da doença aguda. Chama atenção à presença de nefrite moderada ou intensa (++ ou +++) nos cinco hamsters convalescentes e em nenhum dos animais com doença aguda letal. A inflamação ocorre na zona cortical ou transição corticomedular e tende a apresentar adensamentos em áreas periarteriais e periglomerulares (figura 6). Em avaliações histopatológicas de animais sobreviventes após desafio em experimentos de imunoproteção, a frequência de nefrite subaguda moderada ou intensa é variável, mas sempre maior que 50% (dados não publicados).



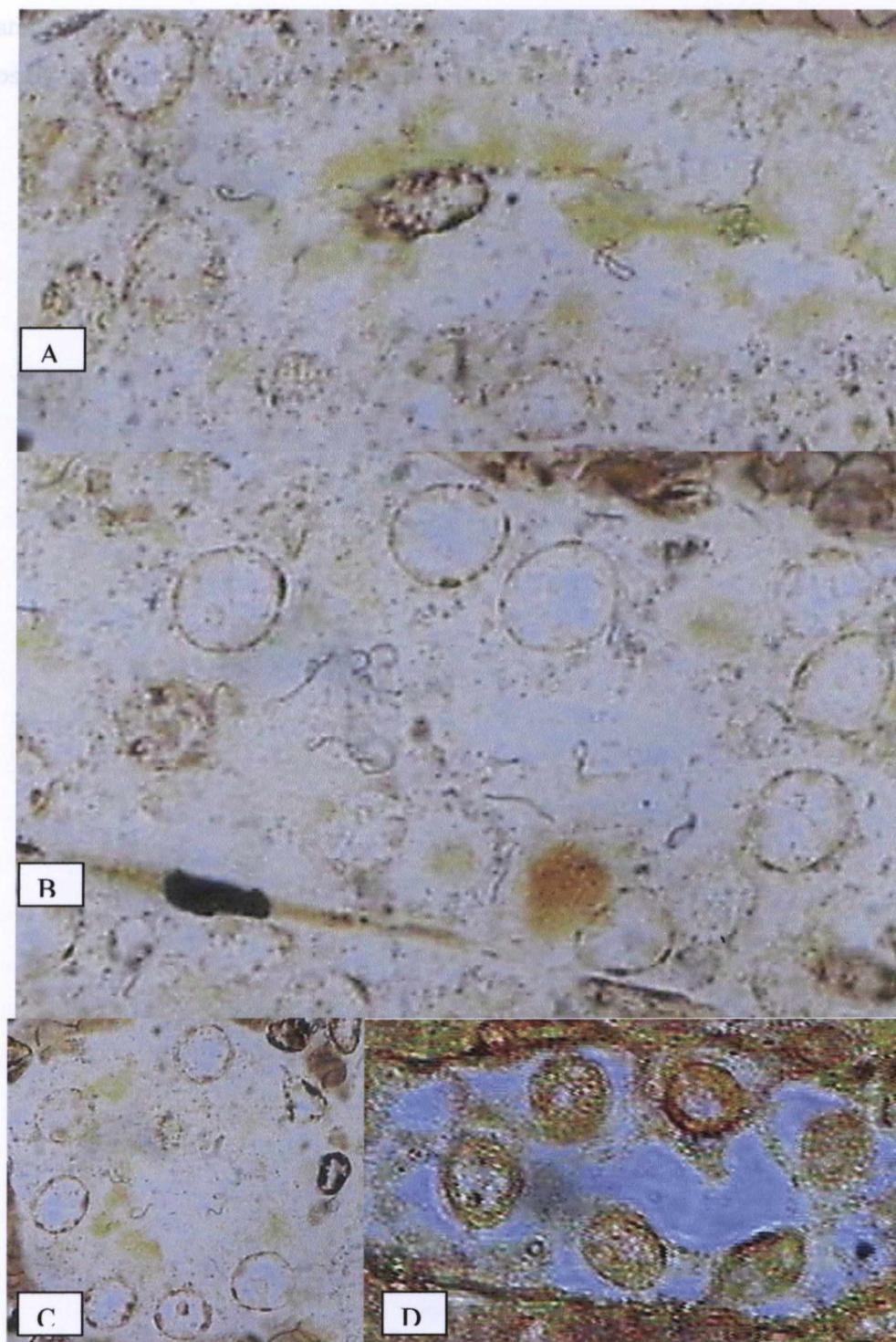
**Figura 5.** Tecido renal de hamster convalescente sacrificado após 28 dias de infecção com  $10^6$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal (A-D) e hamster sacrificado após 28 dias de infecção com  $10^2$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal sem leptospiros detectadas em exame de cultura ou Warthin-Starry (E e F). O córtex renal exibe zonas focais ou multifocais de regeneração nos animais convalescentes, observados freqüentemente nas áreas subcapsulares. Um foco de regeneração tubular é mostrada em localização subcapsular (A: aumento de 100x). O epitélio regenerativo é baixo, com núcleos hiper cromáticos e escasso citoplasma quando comparados com as células tubulares dos segmentos proximais vizinhos que apresentam-se

preservados (B: aumento de 200x; C e D: aumento de 400x). O tecido renal de hamster que não desenvolveu colonização renal após 28 dias mostra ausência de achados patológicos como demonstrado nas imagens da zona cortical (E: aumento de 200x; F: aumento de 400x).



**Figura 6.** Tecido renal de hamster convalescente sacrificado após 28 dias de infecção com  $10^6$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal (A-D) e hamster sacrificado após 28 dias de infecção com  $10^2$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal sem leptospiros detectadas em exame de cultura ou Warthin-Starry (E e F). O infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos e histiócitos é um achado freqüente nos animais convalescentes e tende a estar localizado em torno de artérias de pequeno calibre (A: aumento de 400x) ou em torno de glomérulos (B: aumento de 400x). Um infiltrado rico em histiócitos e plasmócitos pode ser observado em íntima relação com

a parede de uma artéria (C: aumento de 1000x). Em casos com maior intensidade de inflamação, é freqüente a observação de polimorfonucleares neutrófilos no interstício ou em aglomerados nas luzes tubulares (D: aumento de 1000x). Áreas periarteriolas e periglomerulares correspondentes de um animal que não desenvolveu infecção mostram ausência de achados inflamatórios (E e F: aumento de 400x).



**Figura 7.** Tecido renal de hamster com leptospirose aguda em estado moribundo 5 dias após infecção com  $10^6$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal (A-C). A coloração de Warthin-Starry exhibe fundo castanho a amarelo claro com núcleos exibindo cromatina de coloração marrom. Hamsters com leptospirose aguda exibem organismos com forma encurvada de coloração negra em íntima associação com células

tubulares proximais (A-C: aumento de 2000x). Leptospiras não são identificadas nos túbulos de hamsters controles não infectados (D: aumento de 2000x).

## 5.2 AUSÊNCIA DE DOENÇA AGUDA EM RATOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS.

Um achado consistente em todos os experimentos com ratos foi a ausência de doença clínica durante todos os intervalos examinados. Os achados histopatológicos são raros após 28 dias de infecção e, quando presentes, são discretos (ver item 5.9). Por outro lado, o exame de ratos infectados após 4 a 11 dias de infecção, período de óbito dos hamsters letalmente infectados, não mostra nenhuma alteração histológica nos tecidos examinados (ver item 5.6).

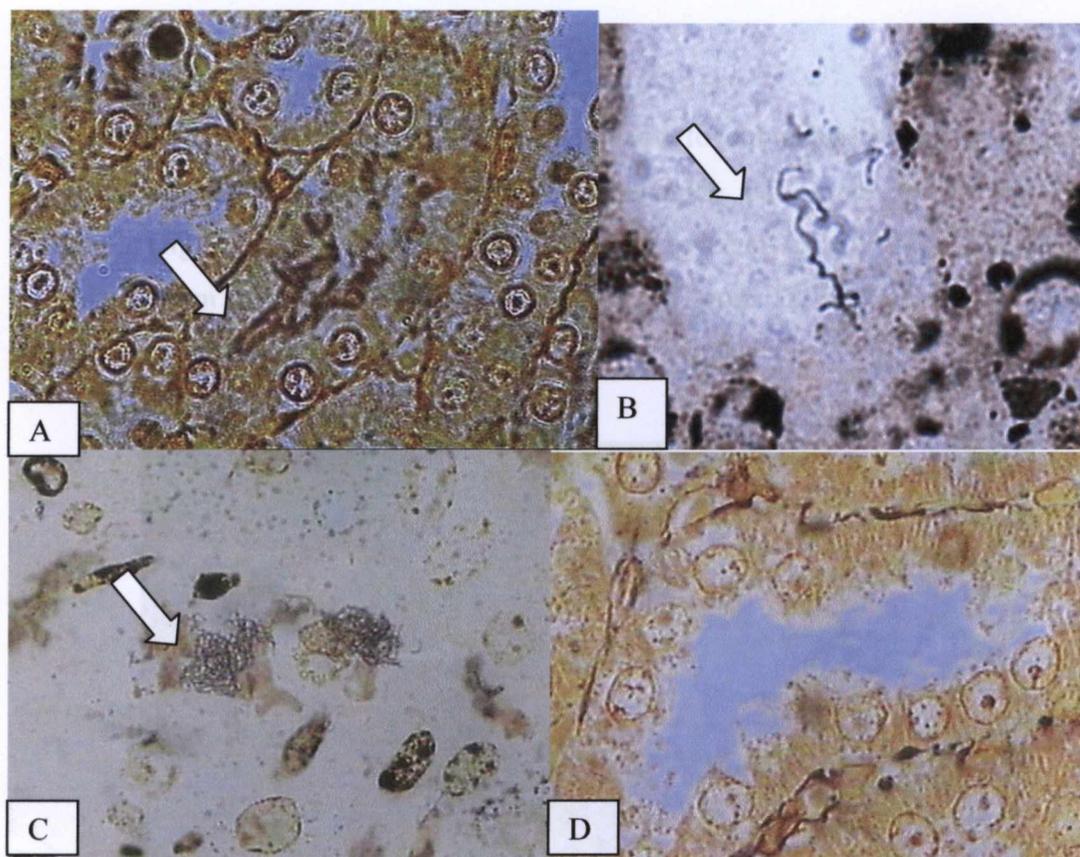
## 5.3 EXPERIMENTOS PILOTOS PARA ESTABELECIMENTO DO ESTADO PORTADOR EM RATOS.

Dois experimentos foram realizados para confirmar o estabelecimento de colonização renal após 28 dias, desta vez apenas com os inóculos mais altos. Os resultados reforçam que ratos de 3 e 4 semanas desenvolvem o estado portador sem sinais de doença (tabela 4). Mesmo em animais com apenas 3 semanas de idade, os ratos mostram-se resistentes à doença. A colonização da superfície epitelial ocorre seletivamente nos túbulos proximais (figura 8).

**Tabela 4** - ratos inoculados com  $10^8$  *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz LI-130 4.7 via intraperitoneal necropsiados após 28 dias.

Intervalo	Cultura n(%)	Warthin-Starry n(%)	Histologia n(%)
Experimento 3 – ratos, fêmeas, de 4 semanas.			
$10^8$	3/3 (100)	3/3 (100)	sem alterações (0)
Controle	0/1 (0)	0/1 (0)	sem alterações (0)
Experimento 4 – ratos, fêmeas, de 3 semanas			
Intervalo	Cultura	Warthin-Starry	Histopatologia
$10^8$	2/3 (67)	2/3 (67)	sem alterações (0)
Controle	0/1 (0)	0/1 (0)	sem alterações (0)

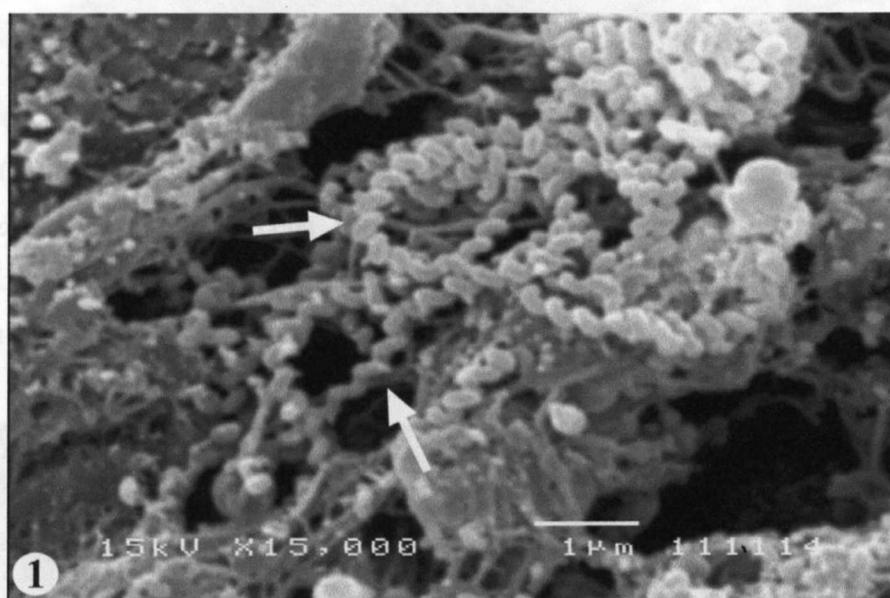
## 5.4 COLONIZAÇÃO RENAL AVALIADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE



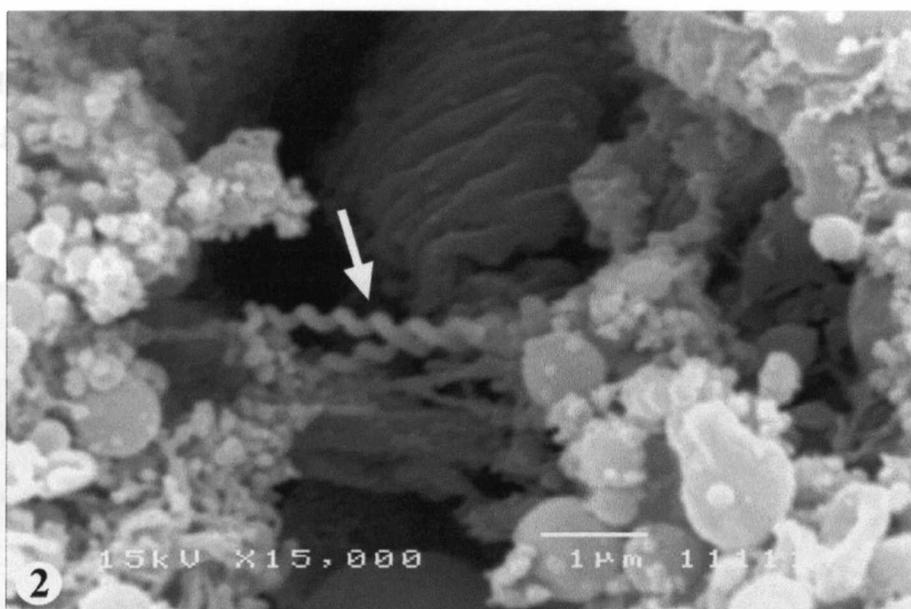
**Figura 8.** Detecção de leptospiros colonizando túbulos renais de um rato de 3 semanas infectado com  $10^8$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal. Leptospiros com forma típica em espiral são observadas nas luzes tubulares através da coloração de Warthin-Starry. Em A, uma colônia de leptospiros está intimamente relacionada à superfície luminal das células tubulares proximais (A: aumento de 400x, indicado na seta). Formas espiraladas individuais podem ser vistas em aumentos maiores (B: aumento de 2000x, indicado na seta). Frequentemente, emaranhados de leptospiros são vistos no interior de túbulos proximais (C: aumento de 1000x, indicado na seta). Um animal controle inoculado com 1ml de meio EMJH estéril não exibe espiroquetas à coloração de Warthin-Starry (D: aumento de 1000x). Nesta coloração, o fundo é corado de castanho amarelado em tonalidade variável, núcleos são corados em marrom e espiroquetas são identificadas por sua forma características e pela pigmentação engrossada derivada da reação com nitrato de prata.

#### 5.4 COLONIZAÇÃO RENAL AVALIADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.

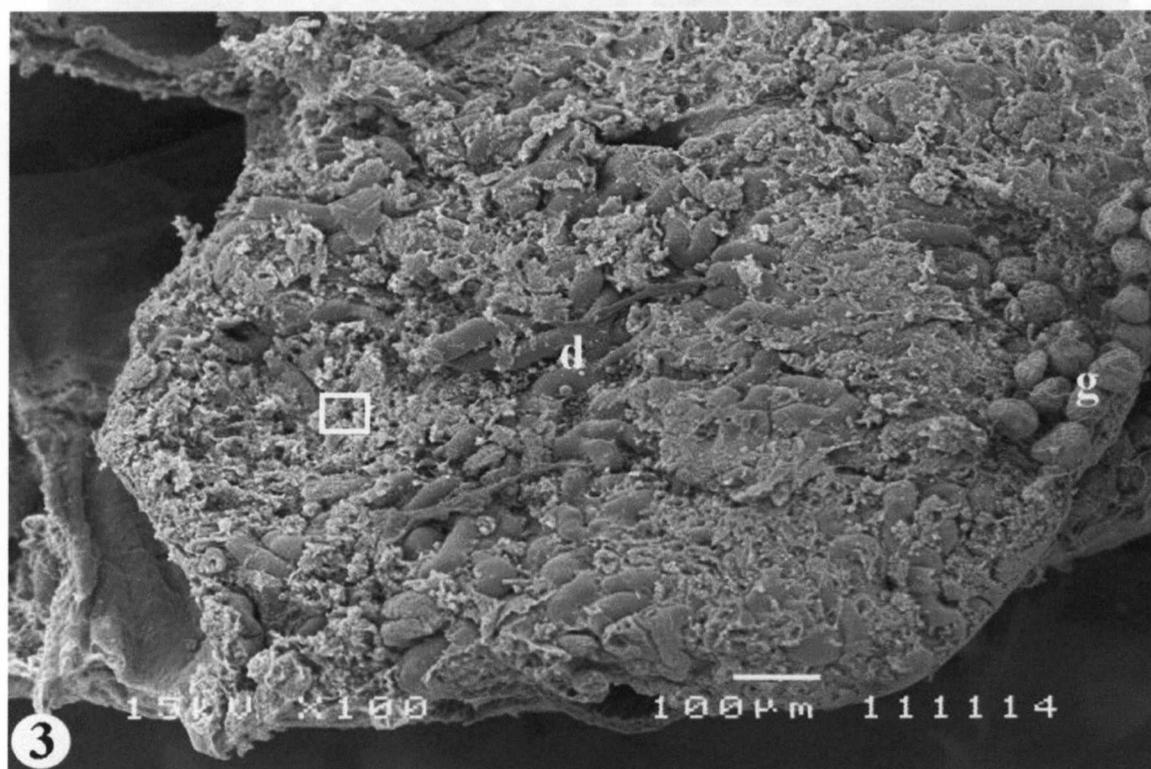
Um dos animais colonizados indicados na tabela 5 foi submetido à perfusão com solução de fixação para microscopia eletrônica e preparado para microscopia eletrônica de varredura (figuras 9 a 12). As fotomicrografias revelam íntima associação de formas espiraladas com as superfícies do hospedeiro e, na figura 12, chama a atenção o intenso grau de colonização da luz de um túbulo renal (figura 12).



**Figura 9.** Microscopia eletrônica de varredura de um rato de 3 semanas infectado com  $10^8$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal, 28 dias após inóculo. Leptospiras com forma típica em espiral são observadas. A seta aponta para uma leptospira com forma espiral típica (aumento de 15000X).



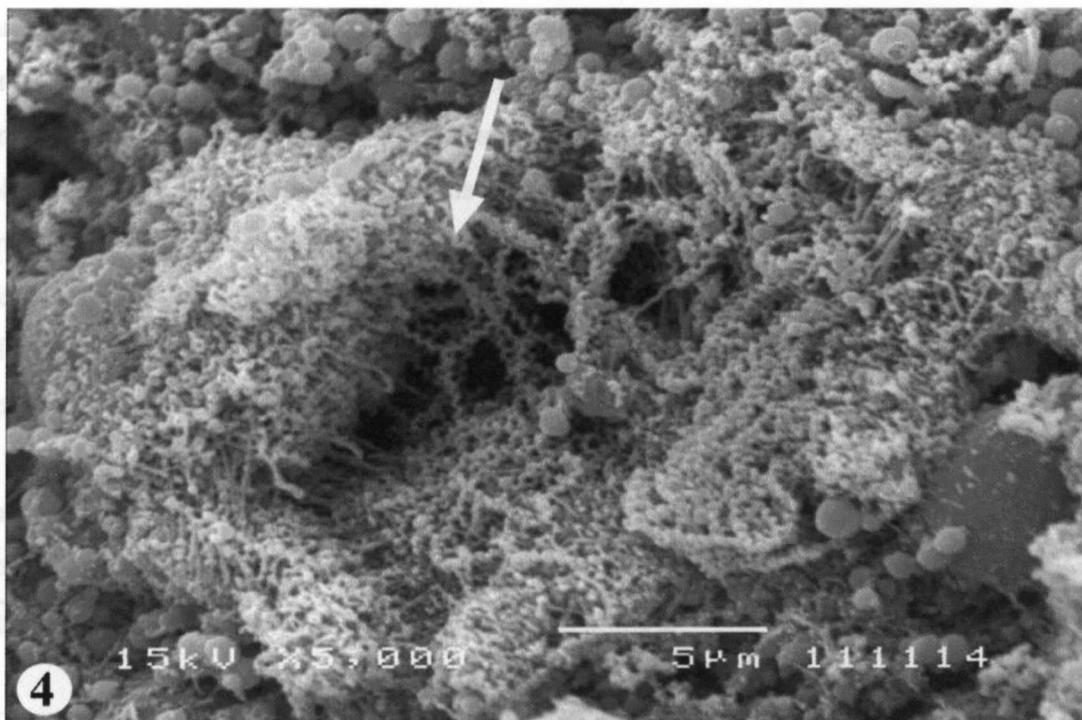
**Figura 10.** Microscopia eletrônica de varredura de um rato de 3 semanas infectado com  $10^8$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal, 28 dias após inóculo. Leptospiras com forma típica em espiral são observadas. A seta aponta para uma leptospira com forma espiral típica (aumento de 15000X).



**Figura 11.** Microscopia eletrônica de varredura de um rato de 3 semanas infectado com  $10^8$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal, 28 dias após

inóculo. No aumento de 100X é possível distinguir a arquitetura do tecido renal com glomérulos (g) abaixo da superfície capsular e ductos coletores (d) convergindo para pelve renal onde o quadrado limita área de intensa colonização por leptospiros ampliada na figura 12.

Dois diferentes experimentos foram realizados para determinar a influência do inóculo



**Figura 12.** Microscopia eletrônica de varredura de um rato de 3 semanas infectado com  $10^8$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal, 28 dias após inóculo. Colonização renal por múltiplas leptospiros em associação com as superfícies do hospedeiro (aumento de 5000X).

$10^7$	2/2 (100)	2/2 (100)	Nefrite	0/2 (0)
$10^6$	0/2 (0)	0/2 (0)	Nefrite	0/2 (0)
Controle	0/2 (0)	0/2 (0)	Nefrite	0/2 (0)
Experimento 2 – Ratos pareados por sexo, de 5 semanas				
$10^7$	3/3* (100)	4/4 (100)	Nefrite	2/4 (50)
$10^6$	4/4 (100)	2/4 (50)	Nefrite	0/4 (0)
$10^5$	1/4 (25)	1/4 (25)	Nefrite	0/4 (0)
$10^4$	0/4 (0)	0/4 (0)	Nefrite	1/4 (25)
Controle	0/2 (0)	0/2 (0)	Nefrite	0/2 (0)

Nota: \* cultura e c/nt+ por contaminação.

## 5.5 INFLUÊNCIA DO INÓCULO PARA ESTABELECIMENTO DO ESTADO PORTADOR EM RATOS.

Dois diferentes experimentos foram realizados para determinar a influência do inóculo para estabelecimento do estado portador renal após 28 dias. No primeiro experimento foram utilizados ratos fêmeas de 4 semanas. O segundo experimento foi repetido com fêmeas de 5 semanas (tabela 5). Os altos inóculos ( $10^6$  e  $10^8$ ) são capazes promover colonização renal em todos os animais de modo reproduzível. Vale destacar que os ratos atravessam o período de estudo sem sintomas e os achados histopatológicos, quando presentes, são discretos. No maior experimento (experimento 2 – tabela 4), a dose infectante 50% para colonização renal foi calculada em  $10^{4,68}$ , equivalente a 47863 leptospiras.

**Tabela 5** - ratos inoculados com  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 4.7 via intraperitoneal necropsiados após 28 dias.

Intervalo	Cultura n(%)	Warthin-Starry n(%)	Histologia n(%)
<b>Experimento 1 – Ratos, fêmeas, de 4 semanas</b>			
$10^8$	2/2 (100)	1/2 (50)	Nefrite + 1/2 (50) Nefrite ++ 1/2 (50)
$10^6$	2/2 (100)	1/2 (50)	Nefrite + 1/2 (50)
$10^4$	1/2 (50)	2/2 (100)	Nefrite 0/2 (0)
$10^2$	0/2 (0)	0/2 (0)	Nefrite 0/2 (0)
Controle	0/2 (0)	0/2 (0)	Nefrite 0/2 (0)
<b>Experimento 2 – Ratos, pareados por sexo, de 5 semanas</b>			
$10^8$	3/4* (75)	4/4 (100)	Nefrite + 2/4 (50)
$10^6$	4/4 (100)	2/4 (50)	Nefrite 0/4 (0)
$10^4$	1/4 (25)	1/4 (25)	Nefrite 0/4 (0)
$10^2$	0/4 (0)	0/4 (0)	Nefrite + 1/4 (25)
Controle	0/2 (0)	0/2 (0)	Nefrite 0/2 (0)

Nota: \* cultura excluída por contaminação.

## 5.6 ESTUDO DA CINÉTICA DE DISSEMINAÇÃO EM RATOS.

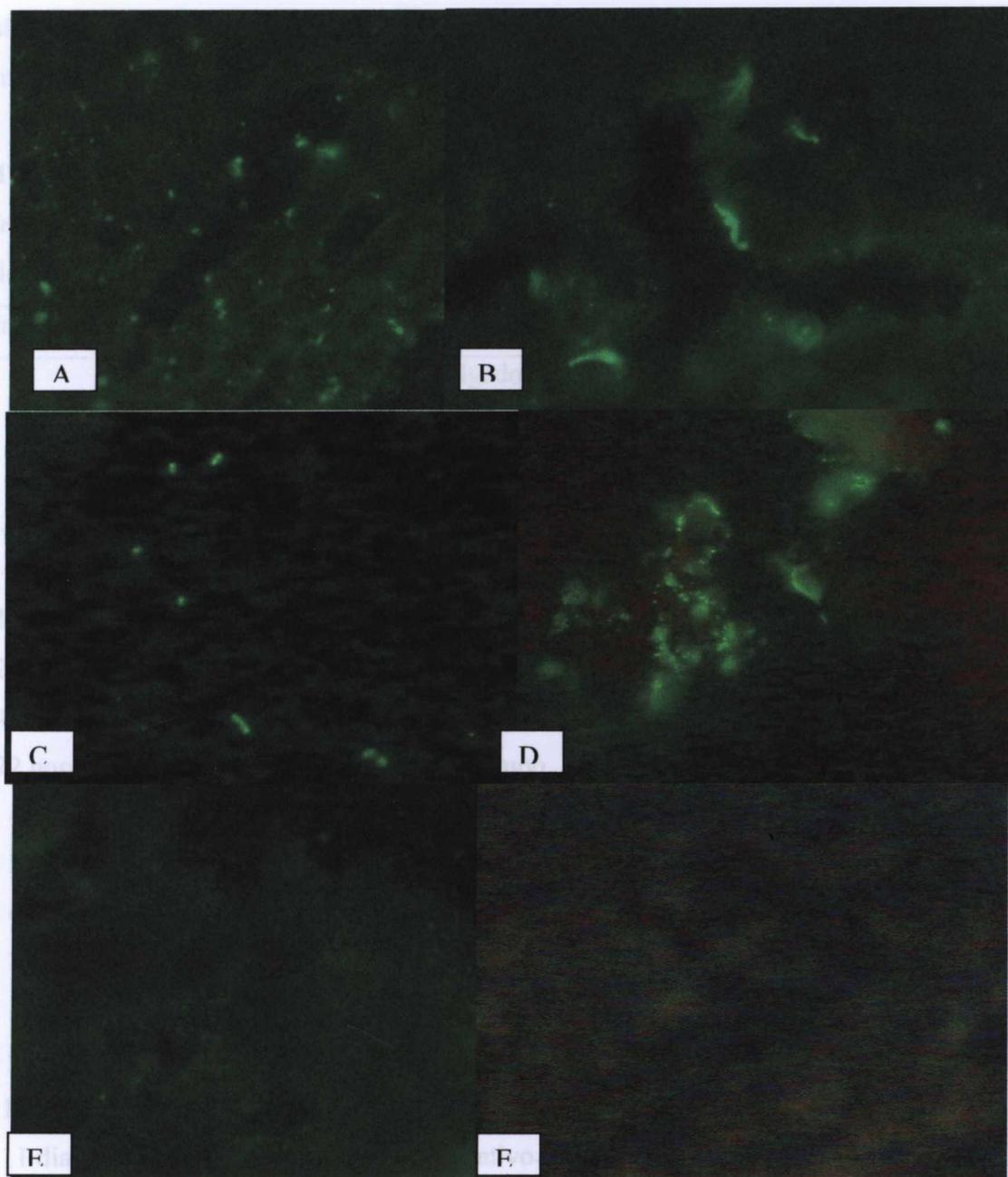
Em experimento piloto para investigação da cinética de disseminação de leptospiras nos tecidos renal, hepático, pulmonar e esplênico do hospedeiro; ratos do sexo feminino foram necropsiados em intervalos determinados após alto inóculo intraperitoneal. Foram coletados amostras de rim, fígado, pulmão e baço. A análise histológica dos tecidos não demonstra alterações em nenhum intervalo. Por outro lado, a coloração de Warthin-Starry detectou leptospiras nos túbulos renais dos animais necropsiados no 8º, 9º e 11º dia pós-infecção (tabela 6).

A contagem de leptospiras com formas típicas marcadas por imunofluorescência indireta foi medida em campos de 400x. Em nenhum intervalo anterior a 24 horas pós-inóculo foram detectados leptospiras nos quatro tecidos avaliados. A densidade maior de leptospiras foi detectada no tecido hepático entre o primeiro e o sétimo dia de infecção, com pico de 20 leptospiras por campo no quarto dia (figura 13). A presença de leptospiras pôde ser documentada no tecido pulmonar, embora tenha sido detectada apenas após 2 e 4 dias do inóculo (tabela 6). No tecido esplênico, a contagem de leptospiras foi prejudicada pelo predomínio de sinais fluorescentes de padrão granular sem morfologia compatível com leptospiras viáveis.

No rim, a detecção de leptospiras entre os intervalos de um a sete dias pós-infecção pôde ser quantificada através da contagem de espiroquetas distribuídas difusamente no tecido renal (tabela 6). Entretanto, a partir do oitavo dia, as leptospiras deixaram de apresentar distribuição difusa tendendo a concentrar-se em áreas de contorno tubular, identificadas como a luz de segmentos tubulares (figura 13). De modo interessante, a observação deste padrão de colonização tubular observado nos dias 8, 9, 10 e 11 da infecção correlacionou com a positividade da impregnação pela prata nos dias 8, 9 e 11.

Em todos os intervalos estudados, o exame histopatológico dos tecidos renal, hepático e cardíaco não apresentou particularidades. O baço apresentou um quadro de congestão a partir do 1º dia pós-infecção.

partir do oitavo dia, é possível observação a tendência de acúmulo de leptospiras em limitadas às superfícies tubulares (D: aumento de 1000x). Imagens típicas de leptospiras não



**Figura 13.** Detecção de leptospiras no tecido renal e hepático de ratos por imunofluorescência indireta. O tecido hepático de um rato de 5 semanas infectado com  $10^8$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal, 4 dias após a infecção, exibe densidade máxima de leptospiras (A: aumento de 400x). A observação ao maior aumento permite identificar leptospiras individuais aderidas às traves hepáticas (B: aumento de 1000x). No tecido renal de um rato de 5 semanas após 4 dias do mesmo inóculo, leptospiras podem ser vistas esparsamente distribuídas (C: aumento de 400x). A

partir do oitavo dia, é possível observação a tendência de acúmulo de leptospiras em limitadas às superfícies tubulares (D: aumento de 1000x). Imagens típicas de leptospiras não são observadas nos tecidos hepático e renal dos ratos sacrificados imediatamente após o inóculo (E: tecido hepático, 400x; F: tecido renal, 400x).

**Tabela 6** – ratos Wistar fêmeas, um animal por intervalo, inoculados com  $10^8$  *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 necropsiados em intervalos determinados para estudo de disseminação nos tecidos.

Intervalo	WS rim	Imunofluorescência		
		Rim	Fígado	Pulmão
0 min	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
30 min	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2 horas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4 horas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12 horas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
24 horas	Negativo	3 / campo	5 / campo	Negativo
48 horas	Negativo	2 / campo	12 / campo	< 1 / campo
72 horas	Negativo	3 / campo	15 / campo	Negativo
4 dias	Negativo	7 / campo	20 / campo	< 1 / campo
5 dias	Negativo	4 / campo	13 / campo	Negativo
6 dias	Negativo	5 / campo	6 / campo	Negativo
7 dias	Negativo	5 / campo	1 / campo	Negativo
8 dias	<b>Positivo</b>	Colonização	Negativo	Negativo
9 dias	<b>Positivo</b>	Colonização	Negativo	Negativo
10 dias	Negativo	Colonização	Negativo	Negativo
11 dias	<b>Positivo</b>	Colonização	Negativo	Negativo

Nota: WS = Warthin-Starry do tecido renal; a contagem é feita por campo de 400X.

## 5.7 TEMPO PARA O ESTABELECIMENTO DO ESTADO PORTADOR EM RATOS.

Para investigar o tempo necessário para estabelecimento da colonização renal, foi desenhado um experimento no qual 16 ratos infectados com alto inóculo foram examinados em intervalos de uma semana. Mais um método de detecção de leptospiras nos tecidos, a imunofluorescência, foi adicionado para aumentar a sensibilidade visto que os outros métodos podem não ser tão sensíveis durante a fase de estabelecimento da colonização renal. Para a maioria (75%) dos ratos, uma semana é o período requerido para colonização dos túbulos renais (tabela 7). Após um mês, os túbulos renais apresentam intensa emissão de fluorescência de onde podem ser identificadas espiroquetas individualizadas (figura 14). A impregnação pela prata mostra colonização de túbulos proximais, sendo negativa nos outros tecidos avaliados: fígado, pulmão e baço.

**Tabela 7** - ratos Wistar machos e fêmeas de 5 semanas inoculados com  $10^8$  *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 4.7 via intraperitoneal necropsiados a cada 7 dias.

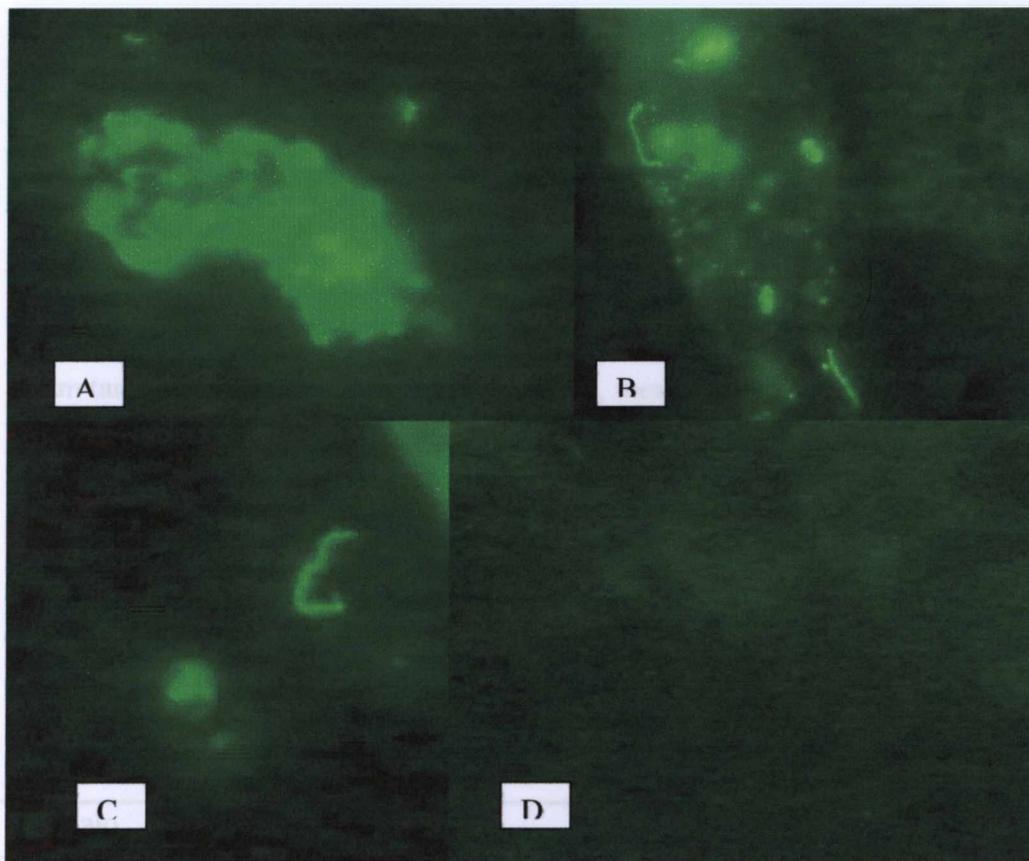
Intervalo	Infectados			
	Cultura n(%)	WS n(%)	IHF n(%)	Histologia n(%)
1 sem	3/4 (75)	3/4 (75)	3/4** (75)	Nefrite+ 1/4 (25)
2 sem	4/4 (100)	4/4 (100)	4/4 (100)	Nefrite 0/4 (0)
3 sem	3/4*(75)	4/4 (100)	4/4 (100)	Nefrite 0/4 (0)
4 sem	3/4*(75)	4/4 (100)	4/4 (100)	Nefrite 0/4 (0)

Nota: \* cultura excluída por contaminação.

\*\* IHF (imunofluorescência) detectou apenas leptospiras esparsas no tecido renal.

Para todos os intervalos, um animal controle não infectado foi examinado apresentando todos os testes negativos.

## 5.8 TEMPO DE PERSISTÊNCIA DA COLONIZAÇÃO RENAL EM RATOS.



**Figura 14.** Detecção de leptospiras no tecido renal de ratos por imunofluorescência indireta. O tecido renal de um rato de 5 semanas infectado com  $10^8$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal, 4 semanas após a infecção, exibe intensa emissão de fluorescência concentrada em uma área tubular (A: aumento de 1000x). Leptospiras isoladas podem ser identificadas no mesmo tecido, assim como agregados exibem emissões de fluorescência de contorno esférico (B: aumento de 1000x). Uma forma espiralada típica pode ser observada num aumento maior (C: aumento de 2000x). Não há detecção de nenhuma fluorescência além da emissão de fundo no tecido renal do rato controle inoculado com meio EMJH estéril e necropsiado após 4 semanas (D: aumento de 1000x).

Nota: \* cultura excluída por contaminação. WS = Warthin-Starry do tecido renal

## 5.8 TEMPO DE PERSISTÊNCIA DA COLONIZAÇÃO RENAL EM RATOS.

Para determinar o tempo de persistência de colonização renal, dois experimentos foram desenhados com ratos de 4 e de 5 semanas (tabela 8). A combinação de avaliação por cultura e impregnação pela prata permitiram confirmar a colonização renal em 100% dos animais, em cada intervalo mensal, nos dois experimentos. A impregnação pela prata mostra densa colonização de túbulos proximais, sendo negativa nos outros tecidos avaliados: fígado, pulmão e baço. No experimento 6, os resultados positivos do tecido renal foram também obtidos por imunofluorescência, mostrando tendência a denso acúmulo focal de leptospiras no tecido renal, de aspecto similar ao mostrado na figura 14A. As alterações patológicas, quando presentes, são restritas à discreto infiltrado linohistiocitário em torno de pequenas artérias, com exceção de um caso com nefrite intersticial moderada em animal necropsiado 2 meses após inoculo (ver item 5.9).

**Tabela 8** - ratos Wistar fêmeas de 4 semanas inoculados com  $10^8$  *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 4.7 via intraperitoneal necropsiados a cada mês.

Intervalo	Infectados			Controles		
	Cultura n(%)	WS n(%)	Histologia n(%)	Cultura n(%)	WS n(%)	Histologia n(%)
Experimento 5 – ratos, fêmeas, de 4 semanas.						
Após 1 mês	3/3 (100)	3/3 (100)	Nefrite 0/3 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	Nefrite 0/1 (0)
Após 2 meses	2/3*(67)	3/3 (100)	Nefrite + 3/3 (100)	---	---	---
Após 3 meses	2/3 (67)	3/3 (100)	Nefrite + 1/3 (33)	---	---	---
Após 4 meses	3/3 (100)	3/3 (100)	Nefrite 0/3 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	Nefrite 0/1 (0)
Experimento 6 – ratos, pareados por sexo, de 5 semanas.						
Após 1 mês	4/4 (100)	3/4 (75)	Nefrite + 1/4 (25)	0/1 (0)	0/1 (0)	Nefrite 0/1 (0)
Após 2 meses	2/4 (50)	4/4 (100)	Nefrite + 2/4 (50) Nefrite ++ 1/4 (25)	0/1 (0)	0/1 (0)	Nefrite 0/1 (0)
Após 3 meses	3/4 (75)	4/4 (100)	Nefrite + 4/4 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)	Nefrite 0/1 (0)
Após 4 meses	3/4 (75)	4/4 (100)	Nefrite + 1/4 (25)	0/1 (0)	0/1 (0)	Nefrite 0/1 (0)

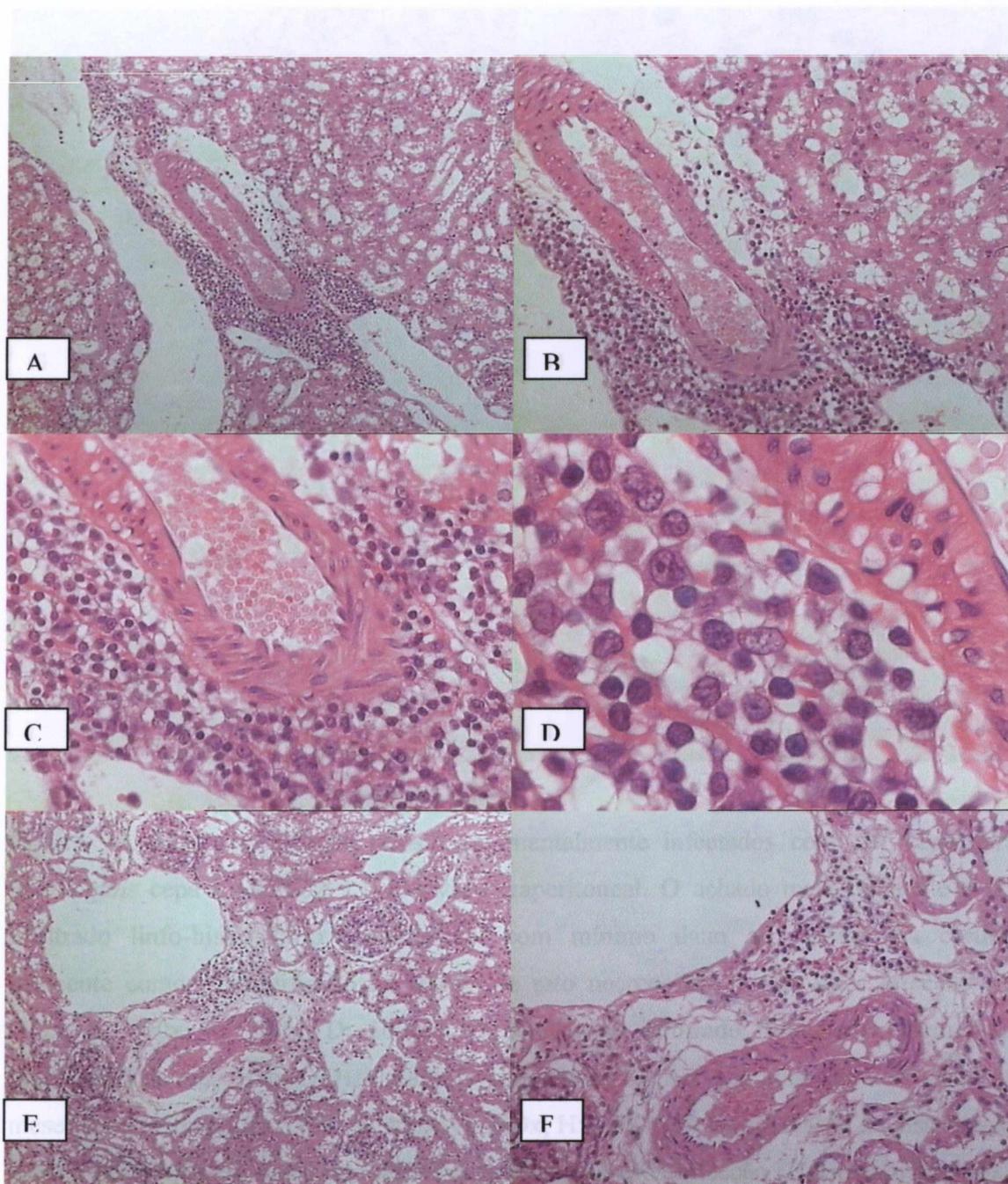
Nota: \* cultura excluída por contaminação. WS = Warthin-Starry do tecido renal

## 5.9 HISTOPATOLOGIA DE RATOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

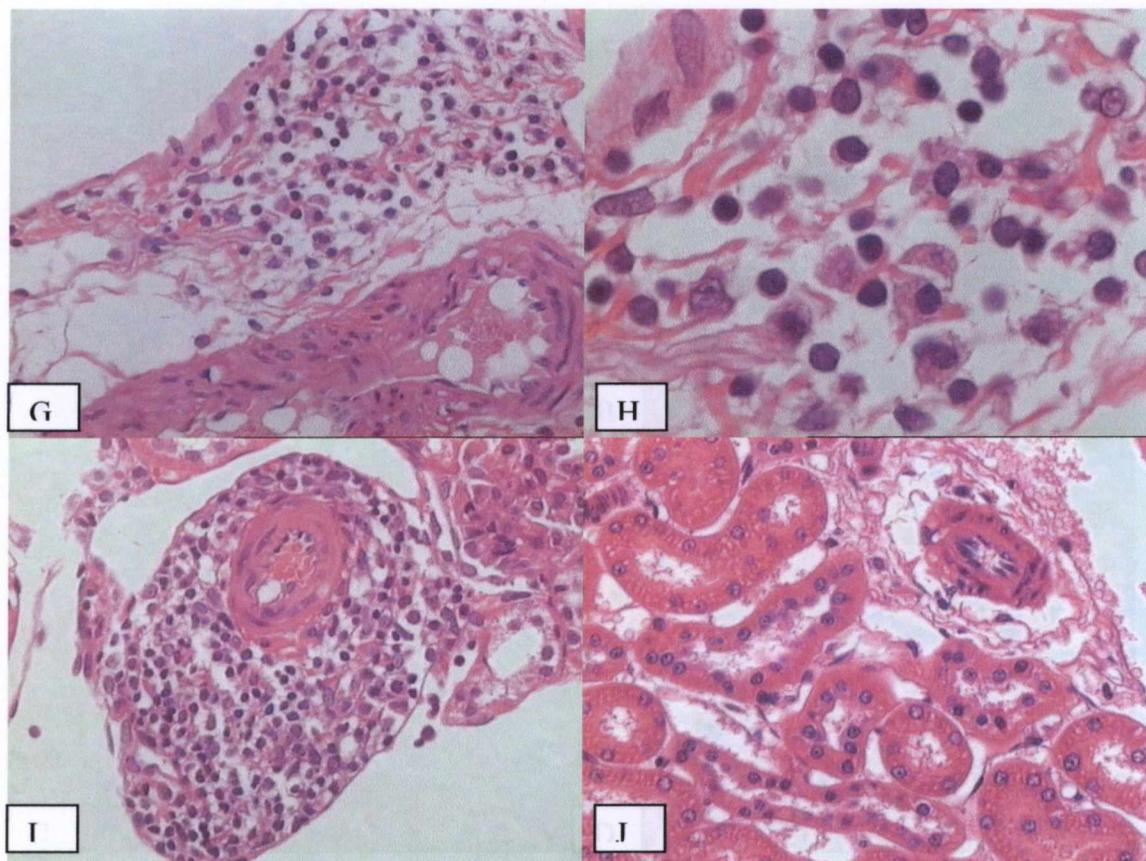
Em todos experimentos foram realizados exames histopatológicos dos ratos infectados. Apesar de inflamação discreta ter sido documentada em uma necropsia realizada uma semana após infecção (tabela 7), tal achado é mais freqüente nos animais examinados em intervalos de um mês ou mais após infecção (tabelas 5 e 8). Uma observação marcante é que o processo de disseminação precoce evoluiu e a colonização renal é estabelecida sem nenhum achado histopatológico associado (tabela 6). A lesão mais observada são focos esparsos de infiltrado linfo-histiocitário em torno de pequenas artérias e arteríolas, de pequena intensidade e mínimo dano ao tecido cortical adjacente (figura 15). Um animal, todavia, exibiu inflamação mais intensa (tabela 8, figura 16) embora jamais atinja a intensidade de alguns casos de tecido renal de hamsters convalescentes com nefrite subaguda intensa associada a infiltração intersticial de polimorfonucleares neutrófilos que por vezes apresentam-se também em agregados nas luzes lúminais (figura 6).

Os achados histopatológicos em ratos experimentalmente infectados por leptospiras patogênicas apresentaram-se restritos ao tecido renal e apresentam padrão semelhante ao observado em hamster, com disposição tipicamente periarterial ou periglomerular, na zona cortical ou transição corticomedular. Um total de 22 casos (24,4%) com nefrite foi identificado entre os 90 ratos experimentalmente infectados em intervalos que variaram de 1 semana à 4 meses de acompanhamento. Do conjunto de 18 controles inoculados com meio EMJH estéril, nenhum deles apresentou tal tipo de lesão.

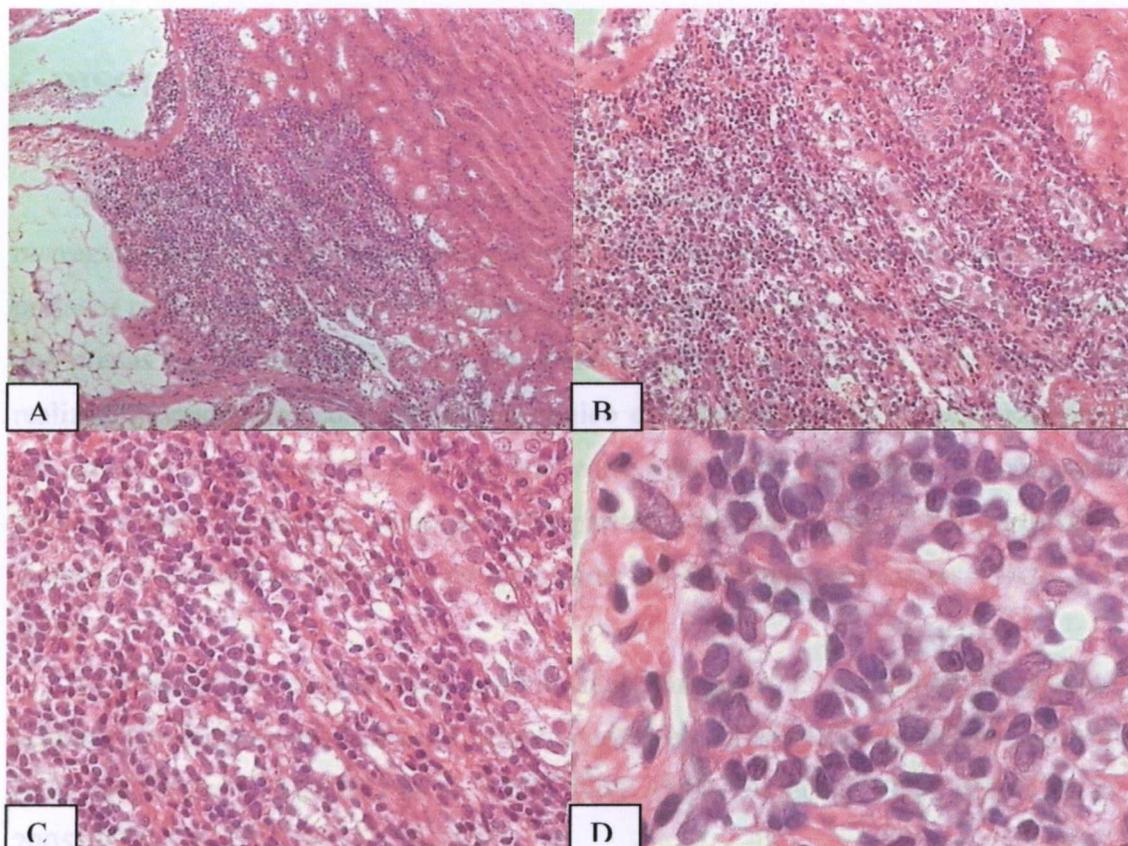
Nenhum animal, infectado experimentalmente ou controle, exibiu outras alterações renais tais como abscessos, pielonefrite ou necrose tubular – alterações previamente descritas em ratos capturados de Salvador (FARIA. 2000).



(continua na página seguinte) córtex de um animal controle necropsiado após 2 meses do inóculo com meio EMJH estéril não exhibe achados inflamatórios (J: aumento de 400x).



**Figura 15.** Histopatologia de ratos experimentalmente infectados com  $10^8$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal. O achado mais freqüente é um infiltrado linfo-histiocitário periarteriolar com mínimo dano ao parênquima cortical adjacente como exemplificado na secção de rato necropsiado 1 mês após infecção (A: 100x; B: 200x; C: 300x; D: 1000x). O detalhe do infiltrado inflamatório demonstra predomínio de macrófagos (D). Uma lesão semelhante é observada num rato necropsiado 2 meses após infecção (E: 100x; F: 200x; G: 300x; H: 1000x). A mesma lesão de distribuição focal é observada em outro rato necropsiado 2 meses após infecção (I: aumento de 400x). Uma área correspondente do córtex de um animal controle necropsiado após 2 meses do inóculo com meio EMJH estéril não exhibe achados inflamatórios (J: aumento de 400x).



**Figura 16.** Histopatologia de rato experimentalmente infectado com  $10^8$  *Leptospira interrogans* cepa FIOCRUZ L1-130 via intraperitoneal necropsiado após 2 meses que apresentou nefrite intersticial graduada como ++. Focos de infiltrado linfo-histiocitário são observados no parênquima cortical (A: aumento de 100x; B: aumento de 200x). A inflamação é de maior intensidade e não está restrita a áreas periarteriais. No interior destes focos é possível observar lesão de segmentos tubulares proximais (C: aumento de 400x). O detalhe do infiltrado inflamatório permite identificar freqüentes macrófagos exibindo menor quantidade de linfócitos (D: aumento de 1000x).

desenvolver a doença aguda mas recuperam-se rapidamente. Em humanos, a nefrite subaguda observada na leptospirose não é preta e parece ocorrer apenas naqueles indivíduos que sobrevivem o bastante para desenvolvê-la (AREAN 1962b). Os mesmos achados são relatados na leptospirose experimental (DE BRITO et al. 1967; DAVILA DE ARRIAGA et al. 1962). Os resultados de nosso experimento de dissecação documentaram estabelecimento de colônias renais sem nenhuma alteração morfológica identificável. Da mesma forma, outros autores descrevem que, mesmo em animais susceptíveis, não há relação direta entre a presença de leptospiros e o dano do epitélio renal do hospedeiro (MILLER & WILSON, 1967).

## 6. DISCUSSÃO

Os achados experimentais confirmam amplamente a resistência natural do *Rattus norvegicus* à doença por leptospiros patogênicas. Além disso, o estabelecimento do estado portador renal pode ser documentado em virtualmente todos os casos. A fim de comprovar que nossas cepas eram capazes de reproduzir a doença em modelos susceptíveis, foram realizados estudos de acompanhamento clínico e histopatologia da infecção experimental em hamsters. Recentemente, a comparação entre a patologia da infecção experimental em cobaias e ratos foi relatada como ponto de partida para investigação sobre a expressão de antígeno O do LPS na superfície de leptospiros em diferentes hospedeiros (NALLY et al. 2005).

A investigação da patologia experimental em hamsters confirmou largamente os achados previamente relatados por outros autores em diferentes hospedeiros susceptíveis (AREAN.1962a; DE BRITO et al. 1966; WAKAMATSU et al. 1990; PEREIRA et al. 2005).

A investigação de histopatologia em ratos infectados experimentalmente com leptospiros patogênicas só foi relatada recentemente como parte de estudos ainda não publicados (NALLY et al. 2005). Neste relato, não se observou achado histopatológico algum na infecção pelas mesmas cepas que causam doença letal em cobaias. Entre as observações indiretas, um estudo ultraestrutural de ratos capturados descreve edema do córtex e infiltrados com predomínio de plasmócitos, em especial nos animais com respostas sorológicas mais altas (STERLING & THIERMANN. 1981). Esta observação foi interpretada como evidência de que ratos podem desenvolver a doença aguda mas recuperam-se rapidamente. Em humanos, a nefrite subaguda observada na leptospirose não é precoce e parece ocorrer apenas naqueles indivíduos que sobrevivem o bastante para desenvolvê-la (AREAN 1962b). Os mesmos achados são relatados na leptospirose experimental (DE BRITO et al. 1967; DAVILA DE ARRIAGA et al. 1982). Os resultados de nosso experimento de disseminação documentaram estabelecimento de colonização renal sem nenhuma alteração morfológica identificável. Da mesma forma, outros autores descrevem que, mesmo em animais susceptíveis, não há relação direta entre a presença de leptospiros e o dano do epitélio tubular do hospedeiro (MILLER & WILSON. 1967).

Ratos com colonização estabelecida por períodos de tempo maiores, entre semanas e meses, apresentaram infiltrados com predomínio de linfócitos e histiócitos. Em nossos experimentos, observamos que estes infiltrados são predominantemente de discreta intensidade e tendem a estar acumulados em torno de artérias, arteríolas e glomérulos na zona cortical ou transição corticomedular. Não foram observados focos inflamatórios na pelve renal. Apesar de ocorrer numa minoria dos casos (24,4%), as alterações inflamatórias não são observadas nos controles. Este achado, portanto, auxilia na compreensão da história natural da infecção em ratos, excluindo uma série de outras lesões observadas em rins de ratos capturados provavelmente causadas por diversos outros fatores ambientais (FARIA, 2000). No entanto, estudos subseqüentes de colocalização de antígenos serão importantes para compreender o papel da estimulação antigênica de leptospiras e de outros determinantes da resposta, como expressão de citocinas, neste processo.

Em contrapartida a nefrite leve observada em ratos, hamsters sobreviventes tendem a exibir um quadro de nefrite muito mais exuberante de maior intensidade, freqüentemente acompanhados por polimorfonucleares neutrófilos e zonas focais ou multifocais de regeneração tubular. Ratos parecem ser resistentes aos efeitos tóxicos agudos da disseminação de leptospiras nos tecidos, mas alguns componentes da membrana externa bacteriana liberados após a morte das leptospiras podem ser responsáveis pelo recrutamento inflamatório observado em alguns animais. Neste particular, um extrato de glicoliproteína liberado pela lise de leptospiras já foi relacionado à uma resposta inflamatória tardia não associada as alterações funcionais graves da infecção precoce (SANTOS et al. 1989; ALVES et al. 1991; ALVES et al. 1992).

Em nossos experimentos, a resistência natural à infecção não pareceu ser afetada pela idade do animal no momento do inóculo, pois altos inóculos em animais de três, quatro e cinco semanas foram capazes de induzir colonização renal quase que universalmente sem patologia. Esta observação contrasta com a susceptibilidade aumentada de outros roedores de laboratório, cuja resistência aumenta com a maturação do sistema imune (ADLER et al. 1980; BARNETT et al. 1999).

A investigação sobre a interferência do inóculo para estabelecimento da colonização renal permitiu a observação de que os altos inóculos ( $10^6$  e  $10^8$ ) são capazes de promover estado portador em virtualmente todos os casos. Este achado é intrigante, pois inóculos de  $10^4$  promovem estado portador em poucos casos, e em nenhum caso observamos

colonização renal com o inóculo de  $10^2$ . Comparativamente, o inóculo da mesma cepa que causa doença letal em hamsters em metade dos hamsters foi calculada em  $10^{1,5} - 10^{1,75}$  (32-56) leptospiras e o inóculo de  $10^3$  causa doença letal em 88% de todos os animais. Na natureza, é possível que nem todos os ratos tornem-se portadores, visto que a taxa de colonização renal varia muito entre ratos capturados (THIERMANN. 1977; PEREIRA & ANDRADE. 1988; FARIA. 2000), mas as cepas derivadas de ratos podem, mesmo em pequenos inóculos, promover doença letal em hospedeiros resistentes.

No presente trabalho, a colonização renal pôde ser demonstrada de modo reproduzível em intervalos de até 4 meses pós-inóculo. Apesar de ser amplamente aceito que ratos podem permanecer excretando leptospiras na urina por toda a vida, apenas dois estudos experimentais estão disponíveis. Thiermann observou que ratos Sprague-Dawley jovens (com cerca de 300g) mantinham rins colonizados pelas cepas 549K e 538Br do sorovar *Icterohaemorrhagiae* por até 220 dias, o máximo intervalo estudado (THIERMANN. 1981). Por outro lado, ratos Sprague-Dawley jovens (130-150g, 6 semanas de idade) infectados com cepa RJ16441 do sorovar *Copenhageni* mantêm excreção urinária que dura 72 dias (NALLY et al. 2005). As observações descritas no presente modelo favorecem a hipótese de uma infecção mais duradoura. No entanto, os achados discordantes do último relato podem ser analisados com as seguintes ressalvas: 1) enquanto Nally et al descrevem a excreção urinária de leptospiras detectadas por exame direto da urina em microscopia de campo escuro, os achados aqui descritos bem como os de Thiermann são baseados em positividade em culturas de rim ou urina, o que aumenta a sensibilidade para detecção de organismos viáveis; 2) apesar de pertecerem ao mesmo sorogrupo, a diferença de cepas podem representar relações menos evoluídas entre uma cepa e um hospedeiro (NATARAJASEENIVASAN & RATNAM. 1997); e 3) alguns achados do recente relato são descritos como parte de estudos ainda não publicados e os dados sobre todos os resultados e metodologias aplicadas não estão completamente disponíveis.

Quanto a questão dos métodos de detecção de leptospiras em tecidos, a cultura mostrou-se uma abordagem satisfatória na maioria dos casos. Leptospiras exibem crescimento lento requerendo com frequência algumas semanas para detecção à microscopia de campo escuro. Além disso, a freqüente contaminação por outras bactérias é um problema importante na investigação microbiológica de leptospiras (FAINE et al. 1999). Em nosso estudo, a cultura foi capaz de detectar a maioria dos casos positivos por outros métodos nas amostras que não sofreram contaminação. A impregnação pela prata através da técnica de

Warthin-Starry é uma abordagem tradicional de detecção de leptospiras em tecidos, mas sofre com a variabilidade dos resultados sendo relatadas baixa sensibilidade e especificidade (FAINE. 1965; ALVES et al. 1987). Neste estudo, a técnica permitiu identificação da colonização em túbulos renais em casos de cultura negativa ou contaminada. No entanto, alguns casos de infecções comprovadas por outras metodologias não foram detectados pelo método. Em particular, a técnica falhou em detectar leptospiras nas fases mais precoces da infecção. Desta forma, a imunofluorescência foi adicionada como alternativa mais sensível para estudos de disseminação precoce. A concordância entre cultura e Warthin-Starry foi maior na investigação em ratos do que em hamsters, o que pode ser explicada por uma maior colonização do tecido em hospedeiros mais adaptados sem patologia subjacente. Sobre a questão da reprodutibilidade, a maior dificuldade na técnica de Warthin-Starry é a intensidade da coloração de fundo, que mostrou-se variável de amarelo quase incolor até fundo amarelo acastanhado intenso. Esta variabilidade é uma dificuldade conhecida nesta técnica (BRIDGES & LUNA.; FAINE. 1965; ELLIOT. 1988). A morfologia da colonização renal confirma amplamente os relatos prévios de íntima associação com superfícies tubulares proximais em diferentes modelos experimentais e animais naturalmente infectados, incluindo os estudos prévios em ratos capturados (ANDRADE & OLIVEIRA. 1954; STERLING & THIERMANN. 1981; FARIA. 2000).

O estudo sobre a disseminação detectado por imunofluorescência demonstrou que, após uma fase de disseminação precoce caracterizada pela observação de leptospiras isoladas esparsas no tecido renal, ocorre uma tendência de concentração em zonas tubulares por volta do 8º dia infecção. Esse padrão de concentração da infecção no tecido renal é semelhante ao observado por um estudo, que através de imunohistoquímica em cobaias, demonstrou a presença de antígeno de leptospiras (sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* serovar *Monymusk*) no interstício renal no quarto dia de infecção, seguida por migração entre as células epiteliais, até predominar nas luzes tubulares a partir do sexto dia (ALVES et al. 1991). O uso de imunofluorescência indireta em tecidos para estudo de disseminação foi previamente utilizado para quantificar a disseminação de leptospiras em diferentes tecidos de cobaias até 96 horas pós-infecção com  $10^8$  *L.interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* via subcutânea, observando densidades iguais ou maiores de 100 leptospiras por campo de 400 vezes no fígado e maior que 10 em baço, coração e pulmão no 4º dia (MERIEN et al. 1998). Neste trabalho, também observamos uma maior densidade de leptospiras no tecido

hepático durante os primeiros dias da infecção, embora contagens maiores que 100 por campo não foram documentadas. Recente estudo em modelo experimental de primatas – *Callithrix jacchus* – foi capaz de demonstrar a presença de leptospiras no tecido pulmonar por imunofluorescência, embora esta detecção tenha sido infreqüente quando comparada ao tecido hepático e renal (PEREIRA et al. 2005). Do mesmo modo, a disseminação de leptospiras no fígado foi relatada como muito mais ampla do que no pulmão no modelo de hamster (MILLER et al. 1974). Em conjunto, essas observações reforçam a concepção de que uma disseminação hematogênica de leptospiras no primeiro dia de infecção, com grandes densidade no sangue e tecido hepático, são seguidas por uma colonização seletiva do tecido renal tanto em animais resistentes, e que servem como modelo de persistência da infecção, quanto animais susceptíveis à doença grave como hamsters, cobaias e sagüis.

A imunofluorescência oferece a avaliação da morfologia típica de leptospiras, o que permite uma avaliação da potencial viabilidade dos organismos observados. Além disso, este método já foi utilizado em outros modelos experimentais da leptospirose facilitando a comparação de resultados. Por outro lado, no caso do tecido renal, a agregação nas superfícies lúminais tubulares em dado momento da infecção impede a contagem tradicional permitindo apenas classificar como um padrão de colonização. Métodos baseados na detecção qualitativa do DNA de leptospiras não se baseiam necessariamente na presença de organismos vivos, e podem produzir dados difíceis de interpretar. Por exemplo, estudo em amostras de pacientes humanos já relataram detecção do DNA de leptospiras na urina de pacientes mais de um ano após a fase aguda ou até 56 dias após inícios de sintomas em amostras de sangue, o que não corresponde ao conhecimento prévio sobre a evolução da infecção (BAL et al. 1994; MERIEN et al. 1995). Os primeiros relatos de abordagens quantitativas de detecção do DNA de leptospiras em humanos, realizados em número reduzido de amostras clínicas e em séries não controladas, sugeriram que um ponto de corte de  $10^4$  leptospiras/ml no sangue como um fator prognóstico crítico, visto que todos os pacientes com densidades maiores apresentaram evolução fatal (TRUCCOLO et al. 2001; SEGURA et al. 2005).

Esses achados ressaltam a importância do modelo de persistência para estudos futuros que utilizem técnicas para detecção quantitativa do leptospiras nos tecidos. Novas metodologias tais como ensaio de PCR semi-quantitativo e Real-Time PCR já foram aplicadas no modelo de hamsters (TRUCCOLO et al. 2002; PALANIAPPAN et al. 2005). No entanto, o modelo de hamster não é apropriado para estudo de cinética de disseminação

visto que uma patologia aguda e letal freqüentemente é superposta ao processo. A quantificação da transcrição de genes envolvidos na adaptação ao hospedeiro por “Real Time RT-PCR” é também uma promissora abordagem no campo da leptospirose, visto que até o momento a incapacidade de manipular geneticamente leptospiras dificulta o estudo de seus fatores de virulência.

Desta forma, estabelecemos uma cepa de leptospira patogênica capaz de induzir doença letal em modelo susceptível (hamster) e infecção persistente (ratos). A maior parte dos estudos prévios usando o modelo experimental de ratos foi limitada pela ausência de estudos paralelos em modelos susceptíveis para comprovar a virulência das cepas avaliadas. Neste estudo, o modelo de hamsters foi detalhadamente avaliado quanto à capacidade de reproduzir doença letal e achados patológicos associados.

Com bases nestes resultados, concluímos que o modelo da infecção experimental de ratos pode ser usado para uma série de estudos sobre mecanismos de colonização e resistência. O estado portador é facilmente reproduzível em laboratório e tende a ser estabelecido em torno de uma semana após inóculo. Ratos são naturalmente resistentes e a disseminação de leptospiras não estão associadas com doença subletal. Alterações inflamatórias, quando presentes, são discretas. Os achados do experimento de cinética de disseminação avaliada por imunofluorescência sugerem que a colonização resulta de sobrevivência seletiva de leptospiras no tecido renal, ao invés de um tropismo seletivo para os rins, vistos que outros órgãos, como o fígado, podem exibir densidade muito maior na fase de leptospiremia. O estudo experimental comparativo de modelos de susceptibilidade à doença aguda letal e infecção persistente tem grande potencial para auxiliar a compreensão dos mecanismos básicos de doença na leptospirose.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER B.; FAINE S. Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* Serovar pomona. **Infect. Immun.**, 14(3):703-8, 1976.
2. ADLER B.; FAINE S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. **Infect. Immun.**, 17(1):67-72, 1977.
3. ADLER B.; FAINE S.; MULLER H.K.; GREEN D.E. Maturation of humoral immune response determines the susceptibility of guinea-pigs to leptospirosis. **Pathology.**, 12(4):529-38, 1980.
4. AKIRA S.; TAKEDA K.; AND KAISHO T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunol**, 2 (8): 675-680, 2001.
5. ALEXANDER AD. Leptospirosis in laboratory mice. **Science.**, 224(4654):1158, 1984.
6. ALVES V.A.; VIANNA M.R.; YASUDA P.H.; DE BRITO T. Detection of leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. **J. Pathol.**, 151(2):125-31, 1987.
7. ALVES V.A.; GAYOTTO L.C.; YASUDA P.H.; WAKAMATSU A.; KANAMURA C.T.; DE BRITO T. Leptospiral antigens (*L. interrogans* serogroup ictero-haemorrhagiae) in the kidney of experimentally infected guinea pigs and their relation to the pathogenesis of the renal injury. **Exp. Pathol.**, 42(2):81-93, 1991.
8. ALVES V.A.; GAYOTTO L.C.; DE BRITO T.; SANTOS R.T.; WAKAMATSU A.; VIANNA M.R.; SAKATA E.E. Leptospiral antigens in the liver of experimentally infected guinea pig and their relation to the morphogenesis of liver damage. **Exp. Toxicol. Pathol.**, 44(7):425-34, 1992.
9. ANDERSON L.J. Experimental reproduction of canine interstitial nephritis. **J. Comp. Pathol.**, 77(4):413-8, 1967.
10. ANDRADE Z.A. & OLIVEIRA J.C. Estudos sôbre a leptospirose na Bahia. **Boletim da Fundação Gonçalo Moniz.**, n 03: 1-28, 1954. v
11. ANDRE-FONTAINE G.; BRANGER C.; GRAY A.W.; KLAASEN H.L. Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis. **Vet. Rec.**, 153(6):165-9, 2003.
12. ANDREANI E.; TOLARI F.; FARINA R. Experimental infection in sheep with *Leptospira interrogans* serotype hardjo. **Br. Vet. J.**, 139(2):165-70, 1983.
13. AREAN V.M. Studies on the pathogenesis of leptospirosis. II – A clinico-pathological evaluation of hepatic and renal function in experimental leptospiral infections. **Lab. Invest.**, 11: 273 – 288, 1962.
14. AREAN V.M. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis. **Am. J. Pathol.**, 40:393-423, 1962.
15. BAL A.E.; GRAVEKAMP C.; HARTSKEERL R.A.; DE MEZA-BREWSTER J.; KORVER H.; TERPSTRA W.J. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.**, 32(8):1894-8, 1994.
16. BALLARD S.A.; WILLIAMSON M.; ADLER B.; VINH T.; FAINE S. Interactions of virulent and avirulent leptospires with primary cultures of renal epithelial cells. **J. Med. Microbiol.**, 21: 59-67, 1986.
17. BARCELLOS C. & SABROZA P.C. The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. **Cad. Saude Publica.**, 17 Supl:59-67, 2001.
18. BARNETT J.K.; BARNETT D.; BOLIN C.A.; SUMMERS T.A.; WAGAR E.A.; CHEVILLE N.F.; HARTSKEERL R.A.; HAAKE D.A. Expression and distribution

- of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. **Infect Immun.** 67(2):853-61, 1999.
19. BAROCCHI M.A.; KO A.I.; FERRER S.R.; FARIA M.T.; REIS M.G.; RILEY L.W. Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar copenhageni and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. **J Clin Microbiol.**, 39(1):191-5, 2001.
  20. BAROCCHI M.A.; KO A.I.; REIS M.G.; MCDONALD K.L.; RILEY L.W. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infect. Immun.**, 70(12):6926-32, 2002.
  21. BERTOK L.; KEMENES F.; SIMON G. Fatal leptospirosis icterohaemorrhagica induced by ethionine in albino rats. **J. Pathol. Bacteriol.**, 88:329-31, 1964.
  22. BHARADWAJ R.; BAL A.M.; JOSHI S.A.; KAGAL A.; POL S.S.; GARAD G.; ARJUNWADKAR V.; KATTI R. An urban outbreak of leptospirosis in Mumbai, India. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 55(6):194-6, 2002.
  23. BHARTI A.R.; NALLY J.E.; RICALDI J.N.; MATTHIAS M.A.; DIAZ M.M.; LOVETT M.A.; LEVETT P.N.; GILMAN R.H.; WILLIG M.R.; GOTUZZO E.; VINETZ J.M.; PERU-UNITED STATES LEPTOSPIROSIS CONSORTIUM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect. Dis.**, 3(12):757-71, 2003.
  24. BISHARA J.; AMITAY E.; BARNEA A.; YITZHAKI S.; PITLIK S. Epidemiological and clinical features of leptospirosis in Israel. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 21(1):50-2, 2002.
  25. BOQVIST S.; MONTGOMERY J.M.; HURST M.; THU H.T.; ENGVALL E.O.; GUNNARSSON A.; MAGNUSSON U. *Leptospira* in slaughtered fattening pigs in southern Vietnam: presence of the bacteria in the kidneys and association with morphological findings. **Vet. Microbiol.**, 93(4):361-8, 2003.
  26. BRANGER C.; SONRIER C.; CHATRENET B.; KLONJKOWSKI B.; RUVOEN-CLOUET N.; AUBERT A.; ANDRE-FONTAINE G.; ELOIT M. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. **Infect. Immun.**, 69(11):6831-8, 2001.
  27. BRANGER C.; BLANCHARD B.; FILLONNEAU C.; SUARD I.; AVIAT F.; CHEVALLIER B.; ANDRE-FONTAINE G. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. **FEMS Microbiol. Lett.**, 243(2):437-45, 2005.
  28. BRENNER D.J.; KAUFMANN A.F.; SULZER K.R.; STEIGERWALT A.G.; ROGERS F.C.; WEYANT R.S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 49 Pt 2:839-58, 1999.
  29. BRIDGES C.H. & LUNA L. Kerr's improved Warthin-Starry technique: study of the permissible variations. **Lab Invest.**, 6(4): 357-67, 1957.
  30. BROWN R.A.; BLUMERMAN S.; GAY C.; BOLIN C.; DUBY R.; BALDWIN C.L. Comparison of three different leptospiral vaccines for induction of a type I immune response to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. **Vaccine.**, 21(27-30):4448-58, 2003.
  31. CINCO M.; VECILE E.; MURGIA R.; DOBRINA P.; DOBRINA A. *Leptospira interrogans* and *Leptospira peptidoglycans* induce the release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes. **FEMS Microbiol. Lett.**, 138(2-3): 211-4, 1996.

32. COSTA E.; COSTA Y.A.; LOPES A.A.; SACRAMENTO E.; BINA J.C. [Severe forms of leptospirosis: clinical, demographic and environmental aspects]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **34**(3):261-7, 2001.
33. DABBAGH K. AND LEWIS D.B. Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **16**(3):199-204, 2003.
34. DAHER EDE F.; BRUNETTA D.M.; DE SILVA JUNIOR G.B.; PUSTER R.A.; PATROCINIO R.M. Pancreatic involvement in fatal human leptospirosis: clinical and histopathological features. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*, **45**(6):307-13, 2003.
35. DA SILVA J.J.; NETTO B.A.; LILEMBAUM W.; ALVIM M.E.; DE OLIVEIRA A.V. The hemorrhagic syndrome of leptospirosis: an experimental study in guinea pigs. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **28**(3):169-77, 1995.
36. DAVILA DE ARRIAGA A.J.; ROCHA A.S.; YASUDA P.H.; DE BRITO T. Morpho-functional patterns of kidney injury in the experimental leptospirosis of the guinea-pig (*L. icterohaemorrhagiae*). *J. Pathol.*, **138**(2):145-61, 1982.
37. DE BRITO T.; FREYMULLER E.; HOSHINO S.; PENNA D.O. Pathology of the kidney and liver in the experimental leptospirosis of the guinea-pig. A light and electron microscopy study. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.*, **341**(1):64-78, 1966.
38. DE BRITO T.; PENNA D.O.; PEREIRA V.C.; HOSHINO S. Kidney biopsies in human leptospirosis: a biochemical and electron microscopy study. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.*, **343**(2):124-35, 1967.
39. DE BRITO T.; MACHADO M.M.; MONTANS S.D.; HOSHINO S.; FREYMULLER E. Liver biopsy in human leptospirosis: a light and electron microscopy study. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.*, **342**(1):61-9, 1967.
40. DE BRITO T. On the pathogenesis of the hepatic and renal lesions in leptospirosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*, **10**(4):237-41, 1968.
41. DE BRITO T.; BOHM G.M.; YASUDA P.H. Vascular damage in acute experimental leptospirosis of the guinea-pig. *J. Pathol.*, **128**(4):177-82, 1979.
42. DE BRITO T.; MORAIS C.F.; YASUDA P.H.; LANCELLOTTI C.P.; HOSHINO-SHIMIZU S.; YAMASHIRO E.; ALVES V.A. Cardiovascular involvement in human and experimental leptospirosis: pathologic findings and immunohistochemical detection of leptospiral antigen. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **81**(3):207-14, 1987.
43. DE FIGUEIREDO C.M.; MOURAO A.C.; DE OLIVEIRA M.A.; ALVES W.R.; OOTEMAN M.C.; CHAMONE C.B.; KOURY M.C. [Human leptospirosis in Belo Horizonte City, Minas Gerais, Brazil: a geographic approach]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **34**(4):331-8, 2001.
44. DE FOST M.; HARTSKEERL R.A.; GROENENDIJK M.R.; VAN DER POLL T. Interleukin 12 in part regulates gamma interferon release in human whole blood stimulated with *Leptospira interrogans*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **10**(2):332-5, 2003.
45. DE FRANCESCO DAHER E.; OLIVEIRA NETO F.H.; RAMIREZ S.M. Evaluation of hemostasis disorders and anticardiolipin antibody in patients with severe leptospirosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*, **44**(2):85-90, 2002.
46. DE MARTINO C.; BRUNI C.B.; BELLOCCI M.; NATALI P.G. Spontaneous leptospiral infection of the rat kidney. An ultrastructural study. *Exp. Mol. Pathol.*, **10**(1):27-38, 1969.

47. DIAMENT D.; BRUNIALTI M.K.; ROMERO E.C.; KALLAS E.G.; SALOMAO R. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. **Infect. Immun.**, 70(4):1677-83, 2002.
48. ELLIOTT K.G. A simple step to enhance the demonstration of *Leptospira* in Young's Warthin-Starry technique. **Stain Technol.**, 63(2):122-4, 1988.
49. ELLIS W.A.; MONTGOMERY J.M.; MCPARLAND P.J. An experimental study with a *Leptospira interrogans* serovar bratislava vaccine. **Vet. Rec.**, 125(12):319-21, 1989.
50. FAJARDO E.M.; ORTIZ B.; CHAVEZ A.; GAINZA N.; IZQUIERDO L.; HERNANDEZ Y.; LABRADOR I.; ALVAREZ E. [Standardization of the lethal dose 50% of *Leptospira interrogans* strains used in the control of the leptospirosis cuban vaccine for human use]. **Rev. Cubana Med. Trop.**, 50(1):22-6, 1998.
51. FAINE S. Virulence in *Leptospira*. I. Reactions of guinea-pigs to experimental infection with *Leptospira icterohaemorrhagiae*. **Br. J. Exp. Pathol.**, 38(1):1-7, 1957.
52. FAINE S. Virulence in *Leptospira*. II. The growth in vivo of virulent *Leptospira icterohaemorrhagiae*. **Br. J. Exp. Pathol.**, 38(1):8-14, 1957.
53. FAINE S: Factors affecting the development of the carrier state in leptospirosis. **J. Hyg. (Cambridge)**, 60:427-434, 1962.
54. FAINE S. Silver staining of spirochaetes in single tissue sections. **J. Clin. Pathol.**, 18:381-2, 1965.
55. FAINE, S. **Guidelines for the Control of Leptospirosis**. WHO Offset Publication n°67. 1982. 171 p.
56. FAINE S. ***Leptospira* and leptospirosis**. CRC Press, 2<sup>nd</sup> ed. MedSci, Melbourne, 1999.
57. FARIA M.T. **Leptospirose epidêmica em Salvador**. Estudo de reservatórios e desenvolvimento do teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) para sua identificação. 2000. 118f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental). Centro de pesquisa Gonçalo Muniz, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
58. FENNESTAD K.L. & BORG-PETERSEN C. Experimental leptospirosis in pregnant sows. **J. Infect. Dis.**, 116(1):57-66, 1966.
59. FERGUSON L.C. & POWERS T.E. Experimental leptospirosis in pregnant swine. **Am. J. Vet. Res.**, 17(64):471-7, 1956.
60. GAMBERINI M.; GOMEZ R.M.; ATZINGEN M.V.; MARTINS E.A.; VASCONCELLOS S.A.; ROMERO E.C.; LEITE L.C.; HO P.L.; NASCIMENTO A.L. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiol Lett.**, 244(2):305-13, 2005.
61. GIBBS R.A.; WEINSTOCK G.M.; METZKER M.L.; MUZNY D.M.; SODERGREN E.J.; SCHERER S.; SCOTT G.; STEFFEN D.; WORLEY K.C.; BURCH P.E.; OKWUONU G.; HINES S.; LEWIS L.; DERAMO C.; DELGADO O.; DUGAN-ROCHA S.; MINER G.; MORGAN M.; HAWES A.; GILL R.; CELERA.; HOLT R.A.; ADAMS M.D.; AMANATIDES P.G.; BADEN-TILLSON H.; BARNSTEAD M.; CHIN S.; EVANS C.A.; FERRIERA S.; FOSLER C.; GLODEK A.; GU Z.; JENNINGS D.; KRAFT C.L.; NGUYEN T.; PFANNKOCHE C.M.; SITTER C.; SUTTON G.G.; VENTER J.C.; WOODAGE T.; SMITH D.; LEE H.M.; GUSTAFSON E.; CAHILL P.; KANA A.; DOUCETTE-STAMM L.; WEINSTOCK K.; FECHTEL K.; WEISS R.B.; DUNN D.M.; GREEN E.D.; BLAKESLEY R.W.; BOUFFARD G.G.; DE JONG P.J.; OSOEGAWA K.; ZHU B.; MARRA M.; SCHEIN J.; BOSDET I.; FJELL C.; JONES S.; KRZYWINSKI M.; MATHEWSON C.; SIDDIQUI A.; WYE N.; MCPHERSON J.; ZHAO S.;

- FRASER C.M.; SHETTY J.; SHATSMAN S.; GEER K.; CHEN Y.; ABRAMZON S.; NIERMAN W.C.; HAVLAK P.H.; CHEN R.; DURBIN K.J.; EGAN A.; REN Y.; SONG X.Z.; LI B.; LIU Y.; QIN X.; CAWLEY S.; WORLEY K.C.; COONEY A.J.; D'SOUZA L.M.; MARTIN K.; WU J.Q.; GONZALEZ-GARAY M.L.; JACKSON A.R.; KALAFUS K.J.; MCLEOD M.P.; MILOSAVLJEVIC A.; VIRK D.; VOLKOV A.; WHEELER D.A.; ZHANG Z.; BAILEY J.A.; EICHLER E.E.; TUZUN E.; BIRNEY E.; MONGIN E.; URETA-VIDAL A.; WOODWARK C.; ZDOBNOV E.; BORK P.; SUYAMA M.; TORRENTS D.; ALEXANDERSSON M.; TRASK B.J.; YOUNG J.M.; HUANG H.; WANG H.; XING H.; DANIELS S.; GIETZEN D.; SCHMIDT J.; STEVENS K.; VITT U.; WINGROVE J.; CAMARA F.; MAR ALBA M.; ABRIL J.F.; GUIGO R.; SMIT A.; DUBCHAK I.; RUBIN E.M.; COURONNE O.; POLIAKOV A.; HUBNER N.; GANTEN D.; GOESELE C.; HUMMEL O.; KREITLER T.; LEE Y.A.; MONTI J.; SCHULZ H.; ZIMDAHL H.; HIMMELBAUER H.; LEHRACH H.; JACOB H.J.; BROMBERG S.; GULLINGS-HANDLEY J.; JENSEN-SEAMAN M.I.; KWITEK A.E.; LAZAR J.; PASKO D.; TONELLATO P.J.; TWIGGER S.; PONTING C.P.; DUARTE J.M.; RICE S.; GOODSTADT L.; BEATSON S.A.; EMES R.D.; WINTER E.E.; WEBBER C.; BRANDT P.; NYAKATURA G.; ADETOBI M.; CHIAROMONTE F.; ELNITSKI L.; ESWARA P.; HARDISON R.C.; HOU M.; KOLBE D.; MAKOVA K.; MILLER W.; NEKRUTENKO A.; RIEMER C.; SCHWARTZ S.; TAYLOR J.; YANG S.; ZHANG Y.; LINDPAINTNER K.; ANDREWS T.D.; CACCAMO M.; CLAMP M.; CLARKE L.; CURWEN V.; DURBIN R.; EYRAS E.; SEARLE S.M.; COOPER G.M.; BATZOGLOU S.; BRUDNO M.; SIDOW A.; STONE E.A.; VENTER J.C.; PAYSEUR B.A.; BOURQUE G.; LOPEZ-OTIN C.; PUENTE X.S.; CHAKRABARTI K.; CHATTERJI S.; DEWEY C.; PACHTER L.; BRAY N.; YAP V.B.; CASPI A.; TESLER G.; PEVZNER P.A.; HAUSSLER D.; ROSKIN K.M.; BAERTSCH R.; CLAWSON H.; FUREY T.S.; HINRICHS A.S.; KAROLCHIK D.; KENT W.J.; ROSENBLOOM K.R.; TRUMBOWER H.; WEIRAUCH M.; COOPER D.N.; STENSON P.D.; MA. B.; BRENT M.; ARUMUGAM M.; SHTEYNBERG D.; COPLEY R.R.; TAYLOR M.S.; RIETHMAN H.; MUDUNURI U.; PETERSON J.; GUYER M.; FELSENFELD A.; OLD S.; MOCKRIN S.; COLLINS F.; RAT GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORTIUM. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature.*, **428**(6982):493-521,2004.
62. GUEDES E SILVA J.B.; PAIVA L.M.; PEREIRA DA SILVA J.J., DE SOUZA NETTO B.A. Pathological involvement of human gastrocnemius muscle in leptospirosis (a study in 63 patients). *Rev. Bras. Pesqui. Med. Biol.*, **13**(1-3):9-13, 1980.
63. HAAKE D.A.; WALKER E.M.; BLANCO D.R.; BOLIN C.A.; MILLER M.N.; LOVETT M.A. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during in vitro cultivation. *Infect. Immun.*, **59**(3):1131-40, 1991.
64. HAAKE D.A.; MARTINICH C.; SUMMERS T.A.; SHANG E.S.; PRUETZ J.D.; MCCOY A.M.; MAZEL M.K.; BOLIN C.A. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infect. Immun.*, **66**(4):1579-87, 1998.
65. HAAKE D.A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology.*, **146**: 1491-1504, 2000.
66. HAAKE D.A.; CHAO G.; ZUERNER R.L.; BARNETT J.K.; BARNETT D.; MAZEL M.; MATSUNAGA J.; LEVETT P.N.; BOLIN C.A. The leptospiral major

- outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infect. Immun.**, **68**(4):2276-85, 2000.
67. HAAKE D.A.; DUNDOO M.; CADER R.; KUBAK B.M.; HARTSKEERL R.A.; SEJVAR J.J.; ASHFORD D.A. Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. **Clin. Infect. Dis.**, **34**(9):e40-3, 2002.
  68. HAAKE D.A. & MATSUNAGA J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. **Infect. Immun.**, **70**(9):4936-45, 2002.
  69. HIGGINS R. & COUSINEAU G. The pathogenesis of leptospirosis I. Hemorrhages in experimental leptospirosis in guinea pigs. **Can. J. Comp. Med.**, **41**(2):174-81, 1977.
  70. IDO Y.; HOKI R.; ITO H.; WANI H. The rat as a carrier of *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, the causative agent in Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). **J. Exp. Med.**, **26**, 341-53, 1917.
  71. JOHNSON W.D. Jr.; SILVA I.C.; ROCHA H. Serum creatine phosphokinase in leptospirosis. **JAMA.**, **233**(9):981-2, 1975.
  72. KARIV R.; KLEMPFNER R.; BARNEA A.; SIDI Y.; SCHWARTZ E. The changing epidemiology of leptospirosis in Israel. **Emerg. Infect. Dis.**, **7**(6):990-2, 2001.
  73. KEENAN K.P.; ALEXANDER A.D.; MONGOMERY C.A. Jr. Pathogenesis of experimental *Leptospira interrogans*, serovar bataviae, infection in the dog: microbiological, clinical, hematologic, and biochemical studies. **Am. J. Vet. Res.**, **39**(3):449-54, 1978.
  74. KLAASEN H.L.; MOLKENBOER M.J.; VRIJENHOEK M.P.; KAASHOEK M.J. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. **Vet. Microbiol.**, **95**(1-2):121-32, 2003.
  75. KLIMPEL G.R.; MATTHIAS 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.**, **171**(3):1447-55, 2003.
  76. KO A.I.; GALVAO REIS M.; RIBEIRO DOURADO C.M.; JOHNSON W.D. Jr; RILEY L.W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, **354** (9181):820-5, 1999.
  77. KOIZUMI N. & WATANABE H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine.**, **22** (11-12):1545-52, 2004.
  78. KUPEK E.; DE SOUSA SANTOS FAVERSANI M.C.; DE SOUZA PHILIPPI J.M. The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianopolis, Brazil, 1991-1996. **Braz. J. Infect. Dis.**, **4**(3):131-4, 2000.
  79. LANGHAM R.F.; MORSE E.V.; MORTER R.L. Experimental leptospirosis. V. Pathology of *Leptospira pomona* infection in swine. **Am. J. Vet. Res.**, **19**(71):395-400, 1958.
  80. LANGONI H.; DE SOUZA L.C.; DA SILVA A.V.; LUVIZOTTO M.C.; PAES A.C.; LUCHEIS S.B. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. **Prev. Vet. Med.**, **40**(3-4):271-5, 1999.
  81. LAURAIN A.R. Lesions of skeletal muscle in leptospirosis: review of reports and an experimental study. **Am. J. Pathol.**, **31**(3):501-19, 1955.
  82. LEVETT P.N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, **14** (2): 296-326, 2001.
  83. LEVETT P.N.; MOREY R.E.; GALLOWAY R.L.; TURNER D.E.; STEIGERWALT A.G.; MAYER L.W. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. **J. Med. Microbiol.**, **54**(Pt 1):45-9, 2005.

84. LINGAPPA J.; KUFFNER T.; TAPPERO J.; WHITWORTH W.; MIZE A.; KAISER R.; McNICHOLL J. HLA-DQ6 and ingestion of contaminated water: possible gene-environment interaction in an outbreak of Leptospirosis. **Genes Immun.**, 5(3):197-202, 2004.
85. LUCCHESI P.M. & PARMA A.E. A DNA fragment of *Leptospira interrogans* encodes a protein which shares epitopes with equine cornea. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 71(3-4):173-9, 1999.
86. LUCCHESI P.M.; PARMA A.E.; ARROYO G.H. Serovar distribution of a DNA sequence involved in the antigenic relationship between *Leptospira* and equine cornea. **BMC Microbiol.**, 2(1):3, 2002.
87. MARANGONI A.; ALDINI R.; SAMBRI V.; MONTAGNANI M.; BALLARDINI G.; STORNI E.; CEVENINI R. Uptake and killing of *Leptospira interrogans* and *Borrelia burgdorferi*, spirochetes pathogenic to humans, by reticuloendothelial cells in perfused rat liver. **Infect. Immun.**, 68(9):5408-11, 2000.
88. MARANGONI A.; ALDINI R.; SAMBRI V.; GIACANI L.; DI LEO K.; CEVENINI R. Production of tumor necrosis factor alpha by *Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi* s.l., and *Leptospira interrogans* in isolated rat Kupffer cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, 40(3):187-91, 2004.
89. MAROTTO P.C.; NASCIMENTO C.M.; ELUF-NETO J.; MAROTTO M.S.; ANDRADE L.; SZTAJNBOK J.; SEGURO A.C. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. **Clin. Infect. Dis.**, 29(6):1561-3, 1999.
90. MARSHALL R.B. Ultrastructural changes in renal tubules of sheep following experimental infection with *Leptospira interrogans* serotype pomona. **J. Med. Microbiol.**, 7(4):505-8, 1974.
91. MARSHALL R.B. The route of entry of leptospires into the kidney tubule. **J. Med. Microbiol.**, 9(2):149-52, 1976.
92. MARSHALL R.B.; BASKERVILLE A.; HAMBLETON P.; ADAMS G.D. Benign leptospirosis: the pathology of experimental infection of monkeys with *Leptospira interrogans* serovars balcanica and tarassovi. **Br. J. Exp. Pathol.**, 61(2):124-31, 1980.
93. MARTINELLI R.; LUNA M.A.; ROCHA H. Is rhabdomyolysis an additional factor in the pathogenesis of acute renal failure in leptospirosis? **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, 36(2):111-4, 1994.
94. MATSUNAGA J.; BAROCCHI M.A.; CRODA J.; YOUNG T.A.; SANCHEZ Y.; SIQUEIRA I.; BOLIN C.A.; REIS M.G.; RILEY L.W.; HAAKE D.A.; KO A.I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol. Microbiol.**, 49(4):929-45, 2003.
95. MATSUNAGA J.; SANCHEZ Y.; XU X.; HAAKE D.A. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. **Infect. Immun.**, 73(1):70-8, 2005.
96. McINTYRE W.L.; MONTGOMERY G.L. Renal lesions in *Leptospira canicola* infection in dogs. **J. Pathol. Bacteriol.**, 64(1):145-60, 1952.
97. MEITES E.; JAY M.T.; DERESINSKI S.; SHIEH W.J.; ZAKI S.R.; TOMPKINS L.; SMITH D.S. Reemerging leptospirosis, California. **Emerg. Infect. Dis.**, 10(3):406-12, 2004.
98. MENGES R.W.; GALTON M.M.; HABERMANN R.T. Culture and serologic studies on four dogs inoculated with two leptospiral serotypes, *Leptospira pomona* and *Leptospira canicola*. **Am. J. Vet. Res.**, 21: 371-6, 1960.

99. MERIEN F.; BARANTON G.; PEROLAT P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. **J. Infect. Dis.**, **172**(1):281-5, 1995.
100. MERIEN F.; TRUCCOLO J.; ROUGIER Y.; BARANTON G.; PEROLAT P. In vivo apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. **FEMS Microbiol. Lett.**, **169**(1):95-102, 1998.
101. MERRELL D.S. & FALKOW S. Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis. **Nature**, **430**(6996):250-6, 2004.
102. MILLER N.G. & WILSON R.B. Electron microscopy study of the relationship of *Leptospira pomona* to the renal tubules of the hamster during acute and chronic leptospirosis. **Am. J. Vet. Res.**, **28**: 225-235, 1967.
103. MILLER N.G.; ALLEN J.E.; WILSON R.B. The pathogenesis of hemorrhage in the lung of the hamster during acute leptospirosis. **Med. Microbiol. Immunol. (Berl)**, **160**(4):269-78, 1974.
104. MINETTE HP. Leptospirosis in primates other than man. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **15**(2):190-8, 1966.
105. MINETTE H.P. & SHAFFER M.F. Experimental leptospirosis in monkeys. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **17**(2):202-12, 1968.
106. MORRISON W.I.; WRIGHT N.G. Canine leptospirosis: an immunopathological study of interstitial nephritis due to *Leptospira canicola*. **J. Pathol.**, **120**(2):83-9, 1976.
107. MORTER R.L.; HERSCHLER R.C.; FESSLER J.F.; LAVIGNETTE A. Experimental equine leptospirosis (*Leptospira pomona*). **Proc. Annu. Meet. U. S. Anim. Health. Assoc.**, **68**:147-52, 1964.
108. NAIMAN B.M.; ALT D.; BOLIN C.A.; ZUERNER R.; BALDWIN C.L. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and  $\gamma\delta$  T lymphocytes. **Infect. Immun.**, **69**(12): 7550-8, 2001.
109. NAIMAN B.M.; BLUMERMAN S.; ALT D.; BOLIN C.A.; BROWN R.; ZUERNER R.; BALDWIN C.L. Evaluation of type 1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. **Infect. Immun.**, **70**(11):6147-57, 2002.
110. NALLY J.E.; CHANTRANUWAT C.; WU X.Y.; FISHBEIN M.C.; PEREIRA M.M.; DA SILVA J.J.; BLANCO D.R.; LOVETT M.A. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. **Am. J. Pathol.**, **164**(3):1115-27, 2004.
111. NALLY J.E.; CHOW E.; FISHBEIN M.C.; BLANCO D.R.; LOVETT M.A. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. **Infect. Immun.**, **73**(6):3251-60, 2005.
112. NASCIMENTO A.L.; KO A.I.; MARTINS E.A.; MONTEIRO-VITORELLO C.B.; HO P.L.; HAAKE D.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA S.; HARTSKEERL R.A.; MARQUES M.V.; OLIVEIRA M.C.; MENCK C.F.; LEITE L.C.; CARRER H.; COUTINHO L.L.; DEGRAVE W.M.; DELLAGOSTIN O.A.; EL-DORRY H.; FERRO E.S.; FERRO M.I.; FURLAN L.R.; GAMBERINI M.; GIGLIOTI E.A.; GOES-NETO A.; GOLDMAN G.H.; GOLDMAN M.H.; HARAKAVA R.; JERONIMO S.M.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO I.L.; KIMURA E.T.; KURAMAE E.E.; LEMOS E.G.; LEMOS M.V.; MARINO C.L.; NUNES

- L.R.; DE OLIVEIRA R.C.; PEREIRA G.G.; REIS M.S.; SCHRIEFER A.; SIQUEIRA W.J.; SOMMER P.; TSAI S.M.; SIMPSON A.J.; FERRO J.A.; CAMARGO L.E.; KITAJIMA J.P.; SETUBAL J.C.; VAN SLUYS M.A. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J. Bacteriol.*, **186**(7):2164-72, 2004.
113. NATARAJASEENIVASAN K. & RATNAM S. Experimental leptospirosis in laboratory mice and rats. *J. Commun. Dis.*, **29** (3):291-3, 1997.
114. NAVARRO C.E. & KOCIBA G.J. Hemostatic changes in dogs with experimental *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection. *Am. J. Vet. Res.*, **43**(5):904-6, 1982.
115. NICODEMO A.C.; DEL NEGRO G.; AMATO NETO V. Thrombocytopenia and leptospirosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*, **32**(4):252-9, 1990.
116. NICODEMO A.C.; DUARTE M.I.; ALVES V.A.; TAKAKURA C.F.; SANTOS R.T.; NICODEMO E.L. Lung lesions in human leptospirosis: microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **56**(2):181-7, 1997.
117. NICOLESCU M.; BORSAI L.; ALAMITA I. Leptospirosis in albino rats. *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol.*, **32**(2):171-7, 1973.
118. OLIVA R; INFANTE J.F.; GONZALEZ M.; PEREZ V.; SIFONTES S.; MARRERO O.; VALDES Y.; FARINAS M.; ESTEVEZ L.; GONZALEZ I. Pathologic-clinical characterization of leptospirosis in a golden Syrian hamster model. *Arch. Med. Res.*, **25**(2):165-70, 1994.
119. PALANIAPPAN R.U.; CHANG Y.F.; CHANG C.F.; PAN M.J.; YANG C.W.; HARPENDING P.; McDONOUGH S.P.; DUBOVI E.; DIVERS T.; QU J.; ROE B. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Mol. Cell. Probes.*, **19**(2):111-7, 2005.
120. PALMER M.F.; WAITKINS S.A.; FITZGEORGE R.B.; BASKERVILLE A. Experimental infection of monkeys with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Epidemiol. Infect.*, **98**(2):191-7, 1987.
121. PARMA A.E.; SANTISTEBAN C.G.; VILLALBA J.S.; BOWDEN R.A. Experimental demonstration of an antigenic relationship between *Leptospira* and equine cornea. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **10** (2-3): 215-24, 1985.
122. PARMA A.E.; FERNANDEZ A.S.; SANTISTEBAN C.G.; BOWDEN R.A.; CERONE S.I. Tears and aqueous humor from horses inoculated with *Leptospira* contain antibodies which bind to cornea. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **14**(2):181-5, 1987.
123. PARMA A.E.; CERONE S.I.; SANSINANEIA S.A.; GHEZZI M. C3 fixed in vivo to cornea from horses inoculated with *Leptospira interrogans*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **34**(1-2):181-7, 1992.
124. PARMA A.E.; CERONE S.I.; SANSINANEIA S.A. Biochemical analysis by SDS-PAGE and western blotting of the antigenic relationship between *Leptospira* and equine ocular tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **33**(1-2):179-85, 1992.
125. PARMA A.E.; SANZ M.E.; LUCCHESI P.M.; MAZZONELLI J.; PETRUCELLI M.A. Detection of an antigenic protein of *Leptospira interrogans* which shares epitopes with the equine cornea and lens. *Vet. J.*, **153**(1):75-9, 1997.
126. PEREIRA M.M. & ANDRADE J. Epidemiological aspects of leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Search for leptospires and specific antibodies in rodents. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **82**(5):768-70, 1988.

127. PEREIRA M.M.; ANDRADE J.; MARCHEVSKY R.S.; RIBEIRO DOS SANTOS R. Morphological characterization of lung and kidney lesions in C3H/HeJ mice infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae: defect of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells are prognosticators of the disease progression. **Exp. Toxicol. Pathol.**, **50** (3):191-8, 1998.
128. PEREIRA M.M.; MATSUO M.G.; BAUAB A.R.; VASCONCELOS S.A.; MORAES Z.M.; BARANTON G.; SAINT GIRONS I. A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans* sensu stricto is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, **38**(1):450-2, 2000.
129. PEREIRA M.M.; DA SILVA J.J.; PINTO M.A.; DA SILVA M.F.; MACHADO M.P.; LENZI H.L.; MARCHEVSKY R.S. Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **72**(1):13-20, 2005.
130. PERRA A.; SERVAS V.; TERRIER G.; POSTIC D.; BARANTON G.; ANDRE-FONTAINE G.; VAILLANT V.; CAPEK I. Clustered cases of leptospirosis in Rochefort, France, June 2001. **Euro. Surveill.**, **7**(10):131-6, 2002.
131. POLTORAK A.; HE X.; SMIRNOVA I.; LIU M.Y.; VAN HUFFEL C.; DU X.; BIRDWELL D.; ALEJOS E.; SILVA M.; GALANOS C.; FREUDENBERG M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI P.; LAYTON B.; BEUTLER B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, **282**(5396):2085-8, 1998.
132. RATHINAM S.R. Ocular leptospirosis. **Curr. Opin. Ophthalmol.**, **13**(6):381-6, 2002.
133. REED L.J. & MUENCH H.A. Simple method of determining fifty percent endpoints. **Am. J. Hyg.**, **27**: 494-497, 1938.
134. REN S.X.; FU G.; JIANG X.G.; ZENG R.; MIAO Y.G.; XU H.; ZHANG Y.X.; XIONG H.; LU G.; LU L.F.; JIANG H.Q.; JIA J.; TU Y.F.; JIANG J.X.; GU W.Y.; ZHANG Y.Q.; CAI Z.; SHENG H.H.; YIN H.F.; ZHANG Y.; ZHU G.F.; WAN M.; HUANG H.L.; QIAN Z.; WANG S.Y.; MA W.; YAO Z.J.; SHEN Y.; QIANG B.Q.; XIA Q.C.; GUO X.K.; DANCHIN A.; SAINT GIRONS I.; SOMERVILLE R.L.; WEN Y.M.; SHI M.H.; CHEN Z.; XU J.G.; ZHAO G.P. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature.**, **422**(6934):888-93, 2003.
135. ROCHA G.M.; ATHANAZIO D.A.; SILVA E.F.; SANTOS C.S.; KO A.I.; VANNIER-SANTOS M.A. The Scanning Electron Microscopy in analysis of *Leptospira interrogans* in situ. In: **Simpósio Temático sobre patógenos, plantas medicinais e técnicas avançadas de microscopia**. 5-8 de Outubro de 2004, Salvador.
136. ROCHA T. & VIEIRA R.P. Experimental infection of pregnant gilts with *Leptospira interrogans* serovar mozdok. **Vet. Rec.**, **131**(9):197-9, 1992.
137. RODA L. Anticardiolipin antibodies and severe leptospirosis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, **45**(1):55, 2003.
138. ROMERO E.C.; BILLERBECK A.E.; LANDO V.S.; CAMARGO E.D.; SOUZA C.C.; YASUDA P.H. Detection of *Leptospira* DNA in patients with aseptic meningitis by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, **36**(5):1453-5, 1998.
139. ROMERO E.C.; BERNARDO C.C.; YASUDA P.H. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in Sao Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, **45**(5):245-8, 2003.
140. SACRAMENTO E.; LOPES A.A.; COSTA E.; PASSOS O.L.; COSTA Y.A.; MATOS E.D. Electrocardiographic alterations in patients hospitalized with

- leptospirosis in the Brazilian city of Salvador. *Arq. Bras. Cardiol.*, **78**(3):267-70, 2002.
141. SALAZAR J.C.; HAZLETT K.R.; RADOLF J.D. The immune response to infection with *Treponema pallidum*, the stealth pathogen. *Microbes. Infect.*, **4**(11):1133-40, 2002.
  142. SANTOS R.T.; SAKATA E.E.; YASUDA P.H.; WAKAMATSU A.; KANAMURA C.T.; CANDELORI I.; PESTANA C.B.; ALVES V.A. [Glycoproteins from *Leptospira interrogans* serogroup icterohaemorrhagiae: distribution in the liver and kidney of experimentally infected guinea pigs]. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*, **31**(4):235-41, 1989.
  143. SARKAR U.; NASCIMENTO S.F.; BARBOSA R.; MARTINS R.; NUEVO H.; KALAFANOS I.; GRUNSTEIN I.; FLANNERY B.; DIAS J.; RILEY L.W.; REIS M.G.; KO A.I. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **66**(5):605-10, 2002.
  144. SEGURA E.R.; GANOZA C.A.; CAMPOS K.; RICALDI J.N.; TORRES S.; SILVA H.; CESPEDES M.J.; MATTHIAS M.A.; SWANCUTT M.A.; LOPEZ LINAN R.; GOTUZZO E.; GUERRA H.; GILMAN R.H.; VINETZ J.M.; PERU-UNITED STATES LEPTOSPIROSIS CONSORTIUM. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. *Clin. Infect. Dis.*, **40**(3):343-51, 2005.
  145. SILVA H.R.; TANAJURA G.M.; TAVARES-NETO J.; GOMES MD MDE L.; LINHARES AD ADA C.; VASCONCELOS P.F.; KO A.I. [Aseptic meningitis syndrome due to enterovirus and *Leptospira* sp in children of Salvador, Bahia]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **35**(2):159-65, 2002.
  146. SILVA J.J.; DALSTON M.O.; CARVALHO J.E.; SETUBAL S.; OLIVEIRA J.M.; PEREIRA M.M. Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. *Rev. Soc. Brás. Med. Trop.*, **35**(4):395-9, 2002.
  147. SLEIGHT S.D.; LANGHAM R.F.; MORTER R.L. Experimental leptospirosis: the early pathogenesis of *Leptospira pomona* infection in young swine. *J. Infect. Dis.*, **106**:262-9, 1960.
  148. SMITH C.R.; MCGOWAN M.R.; MCCLINTOCK C.S.; CORNEY B.G.; KETTERER P.J.; SMYTHE L.; WARD W. Experimental *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo infection of pregnant cattle. *Aust. Vet. J.*, **75**(11):822-6, 1997.
  149. SONRIER C.; BRANGER C.; MICHEL V.; RUVOEN-CLOUET N.; GANIERE J.P.; ANDRE-FONTAINE G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine.*, **19** (1):86-94, 2000.
  150. STERLING C.R. & THIERMANN A.B. Urban rats as chronic carriers of leptospirosis: an ultrastructural investigation. *Vet. Pathol.*, **18**(5):628-37, 1981.
  151. SUNBUL M.; ESEN S.; LEBLEBICIOGLU H.; HOKELEK M.; PEKBAY A.; EROGLU C. *Rattus norvegicus* acting as reservoir of *leptospira interrogans* in the Middle Black Sea region of Turkey, as evidenced by PCR and presence of serum antibodies to *Leptospira* strain. *Scand. J. Infect. Dis.*, **33** (12):896-8, 2001.
  152. TABEL H. & KARSTAD L. The renal carrier state of experimental *Leptospira pomona* infections in skunks (*Mephitis mephitis*). *Am. J. Epidemiol.*, **85**(1):9-16, 1967.
  153. TAJIKI H. & SALOMAO R. Association of plasma levels of tumor necrosis factor alpha with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis. *Clin. Infect. Dis.*, **23**(5):1177-8, 1996.

154. TAYLOR P.L.; HANSON L.E.; SIMON J. Serologic, pathologic, and immunologic features of experimentally induced leptospiral nephritis in dogs. **Am J Vet Res.**, **31**(6):1033-49, 1970.
155. THIERMANN A.B. Incidence of leptospirosis in the detroit rat population. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **26**(5 Pt 1):970-4, 1977.
156. THIERMANN A.B. Effect of cyclophosphamide treatment on clinical and serologic response of rats to infection with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. **Am. J. Vet. Res.**, **41**(10):1655-8, 1980.
157. THIERMANN AB. Canine leptospirosis in Detroit. **Am. J. Vet. Res.**, **41**(10):1659-61, 1980.
158. THIERMANN A.B. The Norway rat as a selective chronic carrier of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. **J. Wildl. Dis.**, **17**(1):39-43, 1981.
159. THOMAS D.D. & HIGBIE L.M. In vitro association of leptospires with host cells. **Infect. Immun.**, **58**(3):581-5, 1990.
160. TREVEJO R.T.; RIGAU-PEREZ J.G.; ASHFORD D.A.; MCCLURE E.M.; JARQUIN-GONZALEZ C.; AMADOR J.J.; DE LOS REYES J.O.; GONZALEZ A.; ZAKI S.R.; SHIEH W.J.; MCLEAN R.G.; NASCI R.S.; WEYANT R.S.; BOLIN C.A.; BRAGG S.L.; PERKINS B.A.; SPIEGEL R.A. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. **J. Infect. Dis.**, **178**(5):1457-63, 1998.
161. TRUCCOLO J.; SERAIS O.; MERIEN F.; PEROLAT P. Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. **FEMS Microbiol. Lett.**, **204**(2):317-21, 2001.
162. TRUCCOLO J.; CHARAVAY F.; MERIEN F.; PEROLAT P. Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **46**(3):848-53, 2002.
163. VAN GORP E.C.; SUHARTI C.; TEN CATE H.; DOLMANS W.M.; VAN DER MEER J.W.; TEN CATE J.W.; BRANDJES D.P. Infectious diseases and coagulation disorders. **J. Infect. Dis.**, **180**(1):176-86, 1999.
164. VERONESI R.; FOCACCIA R.; DIETZE R. **Doenças infecciosas e Parasitárias**. 8ª edição. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1991.
165. VIEGAS S.A.R.A.; TAVARES C.H.T.; OLIVEIRA E.M.D.; DIAS A.R.; MENDONÇA F.F.; SANTOS M.F.P. Investigação sorológica para leptospirose em cães errantes na cidade de Salvador. Bahia. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** **2**:21- 30, 2001.
166. VIJAYACHARI P.; SEHGAL S.C.; GORIS M.G.; TERPSTRA W.J.; HARTSKEERL R.A. *Leptospira interrogans* serovar Valbuzzi: a cause of severe pulmonary haemorrhages in the Andaman Islands. **J. Med. Microbiol.**, **52**(Pt 10):913-8, 2003.
167. VIJAYACHARI P.; AHMED N.; SUGUNAN A.P.; GHOSUNNISSA S.; RAO K.R.; HASNAIN S.E.; SEHGAL S.C. Use of fluorescent amplified fragment length polymorphism for molecular epidemiology of leptospirosis in India. **J. Clin. Microbiol.**, **42**(8):3575-80, 2004.
168. VINETZ J.M.; GLASS G.E.; FLEXNER C.E.; MUELLER P.; KASLOW D.C. Sporadic urban leptospirosis. **Ann. Intern. Med.**, **125**(10):794-8, 1996.
169. VINETZ JM. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, **14**(5):527-38, 2001.
170. WAKAMATSU A.; PAGANO L.S.; GAYOTTO L.C.; SANTOS R.T.; SAKATA E.E.; KANAMURA C.T.; CANDELORI I.; PESTANA C.B.; YASUDA P.H.; ALVES V.A. [High resolution light microscopy: adaptation of the method and

- its use in the study of experimental leptospirosis in guinea pigs], *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo.*, **45**(2):47-52, 1990.
171. WATT G.; PADRE L.P.; TUAZON M.; CALUBAQUIB C. Skeletal and cardiac muscle involvement in severe, late leptospirosis. *J. Infect. Dis.*, **162**(1):266-9, 1990.
172. WERTS C.; TAPPING R.I.; MATHISON J.C.; CHUANG T.H.; KRAVCHENKO V.; SAINT GIRONS I.; HAAKE D.A.; GODOWSKI P.J.; HAYASHI F.; OZINSKY A.; UNDERHILL D.M.; KIRSCHNING C.J.; WAGNER H.; ADEREM A.; TOBIAS P.S.; ULEVITCH R.J. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol.*, **2**(4): 346-352, 2001.
173. WHYTE P.B.; RATCLIFF R.M.; CARGILL C.; DOBSON K.J. Protection of pregnant swine by vaccination against *Leptospira* infection. *Aust. Vet. J.*, **59** (2):41-5, 1982.
174. WILLIAMS R.D.; MORTER R.L.; FREEMAN M.J.; LAVIGNETTE A.M. Experimental chronic uveitis. Ophthalmic signs following equine leptospirosis. *Invest. Ophthalmol.*, **10**(12):948-54, 1971.
175. YANG C.W.; 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.*, **13**(8):2037-45, 2002.
176. YASUDA P.H.; HOSHINO-SHIMIZU S.; YAMASHIRO E.H.; DE BRITO T. Experimental leptospirosis (*L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae) of the guinea pig: leptospiral antigen, gamma globulin and complement C3 detection in the kidney. *Exp. Pathol.*, **29**(1):35-43, 1986.
177. YOUNES-IBRAHIM M.; BUFFIN-MEYER B.; CHEVAL L.; BURTH P.; CASTRO-FARIA M.V.; BARLET-BAS C.; MARSY S.; DOUCET A. Na,K-ATPase: a molecular target for *Leptospira interrogans* endotoxin. *Braz. J. Med. Bio.l Res.*, **30**(2):213-23, 1997.
178. YUKAWA M.; KAMATA H.; OHBA S.; KADOI K.; MOCHIZUKI K. Effect of immune serum, an antibiotic, and a corticosteroid used alone or in combination on experimental leptospirosis in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J. Basic. Microbiol.*, **34**(1):49-55, 1994.