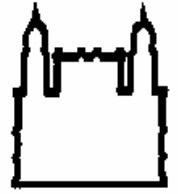




UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**O USO DA TALIDOMIDA COMO TERAPIA
ADJUVANTE NA LEPTOSPIROSE
EXPERIMENTAL**

Luciane Marieta Soares

Salvador-Bahia-Brasil

2013

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**O USO DA TALIDOMIDA COMO TERAPIA
ADJUVANTE NA LEPTOSPIROSE
EXPERIMENTAL**

Luciane Marieta Soares

Orientador: Dr. Daniel Abensur Athanzio

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Curso de Pós Graduação em Patologia
Humana, como pré-requisito obrigatório para
obtenção do grau de Mestre

Salvador-Bahia-Brasil

2013

O USO DA TALIDOMIDA COMO TERAPIA ADJUVANTE NA LEPTOSPIROSE EXPERIMENTAL

LUCIANE MARIETA SOARES

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr^a Theolis Costa Barbosa Bessa

Pesquisadora CPqGM-FIOCRUZ

Dr^a Deborah Bittencourt Mothé Fraga

Professora Adjunta, EMV, UFBA

Pesquisadora Colaboradora CPqGM-FIOCRUZ

Dr^o Daniel Abensur Athanzio

Professor Adjunto, Faculdade de medicina, UFBA

Pesquisador Colaborador LPBM- CPqGM-FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela presença constante nela. A minha mãe “guerreira” por não ter poupado esforços em busca de uma educação de qualidade e pelo seu amor incondicional que me acompanhou durante toda esta jornada. A minha avó e avô (in memoriam) pelos ensinamentos referentes à vida e “aquele carinho” que só eles sabem dar. Aos demais familiares por acreditarem no meu potencial e me estimularem a permanecer nesta jornada.

Aos amigos do CPqGM pelo apoio, amizade, convívio, aprendizado e por se tornarem uma FAMÍLIA a parte, em especial: Rômulo, Eder, Júlio, Kleverton, Grazelele, Katrine, Andréia e Vinícius.

Aos colegas do LPBM/CPqGM pelo trabalho em uma equipe de compromisso e respeito, onde as greves de ônibus, os feriados e dias santos não se tornaram barreiras para a realização dos nossos experimentos e cumprimento de prazos, em especial: Cleiton, Everton, Adenizar, Maurício, Úrsula, Júlio, Andréia e Taís.

Aos meus mais que orientadores científicos, meus espelhos, Daniel Athanazio e Flávia McBride por me ensinarem tudo o que hoje sei e me estimularem a aprender e a querer sempre mais. A Mitermayer Galvão e Alan McBride por todo o apoio na jornada científica. Aos professores do Curso de Patologia/CPqGM pelos ensinamentos. Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Fiocruz) pela estrutura e recursos disponíveis para realização desse trabalho. A Dra Euzenir Nunes Sarno por conceder a talidomida usada nos experimentos. E aos professores que compõe essa banca que gentilmente aceitaram avaliar este trabalho.

SOARES, Luciane Marieta. O Uso da Talidomida Como Terapia Adjuvante na Leptospirose Experimental. 50 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013

RESUMO

Introdução. A leptospirose é uma zoonose de importância global, causada por leptospiros patogênicas. Seu tratamento é limitado quando iniciado após quatro dias do surgimento de sintomas, portanto, novas terapias adjuvantes são necessárias. **Objetivo.** Testar a droga imunomoduladora talidomida como terapia adjuvante à ampicilina no modelo de tratamento tardio da leptospirose experimental em hamsters. **Métodos.** 60 hamsters foram infectados via intraperitoneal por *Leptospira interrogans* cepa L1-130, e foram separados em grupos: nenhum tratamento (NONE), talidomida (TAL), ampicilina (AMP) e ambos (AMP-TAL). A talidomida foi administrada via sonda orogástrica na dosagem de 50 mg/Kg diluída em óleo de linhaça (2ml/Kg) por três dias. Já a ampicilina por via intramuscular: 100mg/Kg/bid por seis dias. Foram realizados dois desenhos experimentais. Experimento 1: o tratamento foi iniciado 48h após o início dos sinais clínicos da doença. Experimento 2: o tratamento foi iniciado imediatamente após a detecção do primeiro óbito entre os animais infectados. **Resultados.** Experimento 1: todos os hamsters dos grupos AMP e AMP-TAL sobreviveram (n=8) enquanto todos os animais dos grupos NONE (n=6) e TAL (n=8) morreram. Os hamsters dos grupos AMP e AMP-TAL não mostraram lesões renais, pulmonares ou hepáticas. Baixa carga de leptospiros foi detectada nos órgãos alvo. Experimento 2: o desfecho letal foi observado em 6/6 hamsters no grupo NONE, 8/8 do grupo TAL, 6/8 do AMP e 6/8 do AMP-TAL. A talidomida usada como adjuvante não prolongou a sobrevivência dos animais tratados com ampicilina. No entanto, o grupo TAL apresentou sobrevivência mais longa que o grupo que não recebeu tratamento algum. Os animais tratados apresentaram maior frequência de destrabeculação de hepatócitos. **Conclusão:** Esse estudo abre novas perspectivas no desenvolvimento de um tratamento tardio na leptospirose, contudo observou-se que a talidomida utilizada como terapia adjuvante não teve impacto na sobrevivência de hamsters como modelo de início tardio de terapia antimicrobiana.

Palavras chave: 1. Leptospirose ;2. *Leptospira*; 3. Talidomida; 4. Modelos animais.

SOARES, Luciane Marieta. The Use of Thalidomide as Adjuvant Therapy in Experimental Leptospirosis. 50 f. il. Dissertation (Master's Degree) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013

ABSTRACT

Background. Leptospirosis is a zoonosis of global importance, caused by pathogenic leptospira. His treatment is limited when started after four days of onset of symptoms, increasing the risk of morbidity and mortality, so new adjuvant therapies are needed. **Objectives.** To test the immunomodulatory drug, thalidomide, as an adjuvant therapy to antibiotics in experimental leptospirosis. **Methods.** Hamsters were infected by *Leptospira interrogans* strain L1-130, and groups were assigned based on no treatment (NONE), thalidomide only (TAL), ampicillin only (AMP) or both (AMP-TAL). Thalidomide was administered via a gastric tube: 50 mg/kg in linseed oil and 2 ml/kg for three days. Ampicillin was administered intramuscularly at the rate of 100 mg/kg/bid for six days. Treatment was started two days after the onset of symptoms (experiment 1) and immediately after detection of the first death (experiment 2). **Results.** Experiment 1: all hamsters from the groups AMP and AMP-TAL survived (n=8), while all hamsters from groups NONE (n=6) and TAL (n=8) died. The AMP and the AMP-TAL groups showed no renal, lung or liver pathology and absent or very low leptospiral burden in target organs. Experiment 2: lethal outcome was observed in 6/6 hamsters in the NONE group, 8/8 in the TAL group, and 6/8 in the AMP group and the AMP-TAL group. Thalidomide showed no survival benefit when compared to hamsters treated with ampicillin alone. The TAL group, however, had a longer interval between infection and death when compared to the NONE group. Treated animals had a higher frequency of liver plate disarray. The TAL, AMP and AMP-TAL groups had very low tissue leptospiral counts. **Conclusion:** This study may open new perspectives to assist the development of a delayed treatment in leptospirosis, however it was observed that thalidomide used as adjuvant therapy had no impact on the survival of hamsters as late onset of antimicrobial therapy model.

Key-words: 1. Leptospirosis; 2. *Leptospira*; 3. Thalidomide 4. Animal disease models.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva de sobrevivência de hamsters infectados: Experimento 01.

Figura 2: Carga de leptospiros nos órgãos alvo de hamsters infectados: Experimento 01

Figura 3: Curva de sobrevivência de hamsters infectados: Experimento 02.

Figura 4: Carga de leptospiros nos órgãos alvo de hamsters infectados: Experimento 02

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lesões nos órgãos alvo de hamsters infectados: Experimento 01

Tabela 2: Lesões nos órgãos alvo de hamsters infectados: Experimento 02

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Ampicilina
AMP-TAL	Ampicilina e Talidomida
bFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
DST	Doença Sexualmente Transmissível
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EMJH	EllinghausenMccullough Harris
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
NF-kB	Fator Nuclear- kB
NONE	Nenhum Tratamento
PTX3	Pentraxina Longa
TAL	Talidomida
Th1	T Helper tipo 1
Th2	T Helper tipo 2
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VEFG	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A LEPTOSPIROSE	12
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO	12
1.3 RESERVATÓRIO.....	13
1.4 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	13
1.5 TRATAMENTO.....	13
1.6 MODELOS EXPERIMENTAIS	14
1.7 RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA EM PACIENTES COM LEPTOSPIROSE.....	15
1.8 TALIDOMIDA.....	16
2 JUTIFICATIVA	19
3 HIPÓTESE.....	20
4 OBJETIVOS.....	20
4.1 OBJETIVO GERAL.....	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5 DESENHO EXPERIMENTAL.....	21
5.1 SINAIS E SINTOMAS: EXPERIMENTO 01	22
5.2 DIA DO PRIMEIRO ÓBITO: EXPERIMENTO 02.....	23
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
6.1 BACTÉRIAS.....	24
6.2 ANIMAIS.....	24

6.3 DETECCAO DE LEPTOSPIRAS NOS TECIDOS.....	25
6.4 EXAME MACROSCÓPICO E HISTOPATOLOGIA.....	25
6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
7 RESULTADOS	28
7.1 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE HAMSTERS INFECTADOS:	
EXPERIMENTO 01.....	28
7.2 LESÕES NOS ÓRGÃOS ALVO DE HAMSTERS INFECTADOS:	
EXPERIMENTO 01	29
7.3 CARGA DE LEPTOSPIRAS NOS ÓRGÃOS ALVO DE HAMSTERS INFECTADOS:	
EXPERIMENTO 01.....	30
7.4 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE HAMSTERS INFECTADOS:	
EXPERIMENTO 02.....	31
7.5 LESÕES NOS ÓRGÃOS DE HAMSTERS INFECTADOS ALVO:	
EXPERIMENTO 02.....	32
7.6 CARGA DE LESPTOSPIRAS NOS ÓRGÃOS ALVO DE HAMSTERS INFECTADOS:	
EXPERIMENTO 02.....	33
8 DISCUSSÃO.....	35
9 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXOS.....	48
ANEXO1 :CÓPIA DA APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	49
ANEXO 2: ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO.....	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEPTOSPIROSE: ASPECTOS GERAIS

A leptospirose é uma zoonose de importância global, causada por leptospiras patogênicas transmitidas pelo contato direto com a urina de animais portadores, ou indiretamente pela exposição à água contaminada. A transmissão 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 saneamento precário (McBRIDE et al., 2005). Nos países desenvolvidos, a incidência parece aumentar associada à prática de esportes aquáticos e atividades recreacionais com contato com vida silvestre ou lagos (McBRIDE et al., 2005). As espiroquetas do gênero *Leptospira* spp. têm como hospedeiros uma ampla variedade de mamíferos, que podem desenvolver uma doença aguda letal ou tornar-se reservatórios. A infecção humana frequentemente tem curso assintomático e muitos pacientes apresentam quadros febris brandos e inespecíficos. A tríade clássica descrita por Weil em 1886 de icterícia, insuficiência renal e diátese hemorrágica ocorre em apenas 5-15% dos pacientes. Recentemente, foi observado aumento de relatos de casos de leptospirose com doença pulmonar grave, frequentemente acompanhada por hemorragia pulmonar, em diferentes regiões do mundo sendo que, em algumas delas, já é a principal causa de óbito nos pacientes com leptospirose grave (MEDEIROS et al., 2010). Em várias séries, a taxa de óbitos atinge mais de 50% dos pacientes acometidos pela forma pulmonar hemorrágica da leptospirose

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

O agente etiológico da leptospirose é uma espiroqueta, que compartilha sua forma espiralada com outras espiroquetas como *Borrelia burgdorferi* e *Treponema pallidum*. Pertencem ao filo *Spirochaetes* e ao gênero *Leptospira* (LEVETT, 2001). Elas são bactérias Gram-negativas, com dupla-membrana (interna associada com a parede celular de peptidoglicano e a externa por fosfolípidios e lipopolissacarídeos (LPS) os quais auxiliam na classificação sorológica da leptospira nos sorovares (VINH et al., 1986). As leptospiras necessitam de temperatura entre 28°C e 30°C e pH de 7,2 a 7,6 para melhor crescimento. Em cultura, crescem entre 4 a 15 semanas de forma fastidiosa, necessitando de meio enriquecido com albumina bovina e ácido graxos de cadeia longa, o qual é a sua principal fonte de energia. O meio mais utilizado para a cultura é o Ellinghausen-McCullough-johnson-Harris

(EMJH) (JOHNSON e FAINE, 1984; ELLINGHAUSEN e MCCULLOUGH, 1965). Estas bactérias são bastante sensíveis ao ressecamento e uso de desinfetantes, porém sobrevivem na água e em cultura por longos períodos.

1.3 RESERVATÓRIOS

Os reservatórios naturais das leptospiras patogênicas são os animais silvestres, em especial roedores, e os animais domésticos (bovinos, suínos, e caninos) que podem atuar como hospedeiros de manutenção ou acidentais na transmissão de diferentes sorovares de *Leptospiras* (LEVETT, 2003).

1.4 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

No Brasil, a leptospirose ocorre de forma endêmica em grandes centros urbanos como Salvador, São Paulo e Recife, e sua incidência é aumentada com a elevação dos índices pluviométricos e inundações (SARKAR et al., 2002; KO et al., 1999; ROMERO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2009). Em Salvador, Bahia, epidemias de leptospirose estão associadas com altos índices de letalidade em humanos (maior que 15%), e ocorrem principalmente em áreas com falta de saneamento básico e em períodos de chuva intensa (KO et al., 1999). A identificação dos fatores de risco permite a adoção de medidas preventivas, pois os mecanismos relacionados ao desenvolvimento da forma severa ou quadro leve da doença nos humanos ainda é pouco esclarecida (KATZ et al., 2003).

1.5 TRATAMENTO

O tratamento de eleição para a leptospirose é o uso de antimicrobiano (WHO, 2003). Estudos mostram que a penicilina G cristalina é a droga preferencial, podendo ser substituída eventualmente pela doxiciclina, ampicilina e tetraciclina (BRASIL, 2009). Para os pacientes alérgicos a penicilina ou que apresentem lesões renais e icterícia, fica sugerido o uso de cloranfenicol (WHO, 2003) Cabe ressaltar que pacientes em gestação, com insuficiência renal ou hepática e crianças menores de 9 anos não devem fazer o uso da doxiciclina e tetraciclina (BRASIL, 2009). Em casos graves e de diagnóstico o tratamento com antibiótico é mantido, contudo talvez se faça necessário a reposição hidroeletrólítica,

assistência cardiorrespiratória, transfusões de sangue e derivados, nutrição enteral ou parenteral e proteção gástrica, além do acompanhamento do volume urinário e da função renal (BRASIL, 2009).

Com o objetivo de avaliar o papel dos antibióticos (ampicilina, doxiciclina e oflaxacin) no tratamento da leptospirose foi realizado um estudo com 18 hamster da linhagem Golden Syrian, infectados de forma subcutânea com leptospiras virulentas na concentração de 10⁸ e observou-se que neste modelo animal o tratamento foi benéfico, pois houve uma redução da concentração de leptospira nos órgãos alvo (rim, fígado, baço, pulmão e coração) e sangue, no entanto o tratamento foi iniciado com 4 dias após infecção (TRUCCOLO, 2002)

Pesquisas mostram que para melhor eficácia sobre o curso da doença, o tratamento, deve ser realizado de forma precoce (até quatro/ cinco dias após o início dos sinais e sintomas). Um estudo randomizado realizado na cidade de Salvador em 253 pacientes com a forma grave da leptospirose que fizeram o uso da penicilina (n=125) cinco dias após o início dos sinais e sintomas (fase tardia) mostrou que o uso do fármaco não foi benéfico pois dos 23 pacientes com falência renal e respiratória que faleceram 15 fizeram o uso da penicilina; cabe ressaltar que o dado não demonstrou significância estatística (COSTA et al, 2003).

A leptospirose é iniciada com sinais brandos e inespecíficos que podem ser facilmente confundidos com algumas doenças como resfriados, dengue e hepatites (KO et al., 1999; McBRIDE et al., 2005). Somado a este fator os testes confirmatórios rápidos ainda não são uma realidade no serviço de vigilância. Logo o risco do paciente buscar auxílio profissional durante um período superior a cinco dias de sinais e sintomas é alto, dificultando o bom prognóstico do mesmo. Desta forma, a busca de tratamento adjuvante à antibioticoterapia para estes pacientes com diagnóstico tardio é um campo importante na pesquisa atual em leptospirose

1.6 MODELOS EXPERIMENTAIS

Dentre os roedores ratos, cobaias, gerbils e hamsters são os animais comumente utilizados como modelos nas pesquisas em leptospirose, sendo os ratos considerados modelos resistentes à infecção aguda, mas que podem desenvolver a infecção persistente como observado na infecção experimental com leptospiras patogênicas realizada no *Rattus norvegicus*, o qual permaneceu assintomático, mas portador renal. (ATHANAZIO et

al., 2008). O mesmo foi constatado por Nally et al. (2005) que desafiaram ratos contra o sorovar Copenhageni e os mesmos mantiveram-se sem sintomas contudo, *Leptospiras intactas* forma encontradas nos túbulos renais e nas amostras de urina (NALLY et al., 2005).

Os cobaias, gerbils e hamsters são os modelos experimentais que mimetizam com maior precisão o modelo de doença aguda letal onde alterações como degeneração tubular renal, icterícia, necrose hepática e hemorragia pulmonar presentes no homem, também são observados nessas espécies (FAINE, 1999)

1.7 RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA EM PACIENTES COM LEPTOSPIROSE

Muitas manifestações da leptospirose são tradicionalmente explicadas por uma suposta capacidade das leptospiras de induzir um quadro de vasculite sistêmica, no entanto, não existe literatura científica suficiente para dar base a esta concepção. A inflamação da parede dos vasos pode ser resultante da invasão direta de microorganismos ou mediada imunologicamente por autoanticorpos, depósitos de imunocomplexos ou células. Nenhuma dessas vias foi descrita em lesões vasculares na leptospirose. Como discutido anteriormente, a lesão endotelial difusa nos alvéolos pulmonares é um achado frequente (AREAN et al., 1962; NICODEMO et al., 1997; SALKADE et al., 2005). Num estudo ultraestrutural de vasos sanguíneos no modelo de cobaias, a lesão mais característica foi a tumefação de células endoteliais com conseqüente aumento da permeabilidade capilar (DE BRITO et al., 1979). Desta forma, é provável que a maioria das manifestações da doença esteja relacionada à lesão aguda endotelial, similar ao que ocorre na sepsé, e não a uma vasculite sistêmica.

Uma resposta inflamatória sistêmica é provavelmente uma característica da leptospirose embora poucos estudos tenham sido realizados com esse foco. Numa série de 18 pacientes em São Paulo, os níveis séricos de TNF- α foram associados com mortalidade. Neste estudo, apenas quatro pacientes apresentaram níveis detectáveis da citocina no soro por ELISA e três deles evoluíram para o óbito. Apenas pacientes com TNF- α detectável

apresentaram manifestações de doença renal, hepática, pulmonar e hemorragias (TAJIKI e SALOMÃO, 1996). Do ponto de vista hemodinâmico, 6/10 (60%) de casos graves numa série de pacientes tailandeses apresentaram quadro típico da sepse grave, que inclui alto débito cardíaco e queda da resistência vascular periférica (SIRIWANIJ et al., 2005). Mais recentemente, marcadores pro-inflamatórios séricos como pentraxina longa (PTX3) e interleucinas 6 e 8, numa série de 52 pacientes da Indonésia, foram identificados como importantes preditores de óbito (WAGENAAR et al., 2009).

Como já demonstrado por alguns dos autores descritos acima existe uma correlação entre a leptospirose grave e a sepse grave além de uma associação entre os níveis elevados de TNF- α com letalidade. Sendo assim, optou-se por utilizar neste estudo uma droga imunomoduladora com poder de atuação sobre os níveis de TNF- α . A droga de escolha foi a talidomida.

1.8 A TALIDOMIDA

A talidomida foi sintetizada pela primeira vez em 1954 pelos laboratórios Chemie Grunenthal, na Alemanha, com o nome molecular de *alpha-phtalyglutamic-acid-imida*. Conhecida pelos seus efeitos sedativos e hipnóticos, foi utilizada no tratamento de enjoos/vômitos do primeiro trimestre de gravidez, sendo uma das drogas mais vendidas nos anos 50, sem aparente toxicidade (SINGALA et al., 2001). Entretanto, no início dos anos 60, a talidomida foi identificada como responsável pelo nascimento de milhares de crianças com deformações congênitas (LIMA et al., 2001). Apesar de ter sido retirada do mercado na Alemanha e Inglaterra no final de 1961, foi no período entre 1962 e 1965, que a talidomida foi banida de quase todo o mundo, mas esse medicamento só foi de fato retirado do mercado brasileiro em 1965 (OLIVEIRA et al., 1999).

A talidomida, em pH fisiológico, existe como mistura racêmica de isômeros S(-) e R(+) permeáveis a célula e passíveis de rápida inter conversão, estando o primeiro associado

aos efeitos teratogênicos, e o segundo, às propriedades sedativas do fármaco. Os mecanismos precisos responsáveis pela atividade clínica da talidomida ainda não foram totalmente elucidados. Foram propostos pelo menos quatro mecanismos distintos e potencialmente complementares: 1) efeitos antitumorais antiproliferativos/pró-apoptóticos diretos, que incluem a inibição da atividade de transcrição do NF-kB e seus genes-alvo antiapoptóticos; 2) ação indireta dirigida contra células tumorais por anular a proteção proporcionada pelas interações com células do estroma da medula óssea; 3) inibição da produção, liberação e sinalização de citocinas, resultando em efeitos antiangiogênicos; e 4) efeitos imunomoduladores, incluindo o aumento da citotoxicidade mediada por células destruidoras naturais contra células tumorais, contribuindo para uma resposta imune antitumoral potencializada (BRUNTON et al., 2007).

Hipóteses para os seus mecanismos de ação incluem uma diminuição dos níveis do fator de necrose tumoral (TNF), a inibição da interleucina 12 e co-estimulação de linfócitos CD8 (TORANO et al., 1999). Efeitos antiangiogênicos da talidomida foram demonstrados em estudos realizados em córnea de coelhos, provavelmente por bloquear a ação de potentes fatores angiogênicos como o fator de crescimento fibroblástico (bFGF) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEFG) (RAJKUMAR et al., 2000). Relatos sugerem também que a talidomida tem um papel na regulação dos linfócitos auxiliares (Th2). Esta aumentaria a produção de Th2, das citocinas IL4 e IL5 e inibiria a produção dos linfócitos inflamatórios (Th1) e da citocina interferon-gama em células periféricas de sangue, estimuladas por antígenos e mitógenos (MARRIOTT et al., 1999).

A reutilização da talidomida começou em 1965 quando Sheskin, um médico israelense relatou que os pacientes com lesões inflamatórias, associadas à hanseníase, experimentavam notável melhora clínica (SINGALA et al., 2001). Depois de se abrir novamente o campo na terapêutica, renasceu o interesse da pesquisa quanto aos seus mecanismos de ação e efeitos indesejáveis (SINGALA et al., 2001).

No Brasil, foi mantida a proibição para uso da talidomida em mulheres em idade fértil (OLIVEIRA et al., 1999). A portaria 63 da secretaria de vigilância sanitária do ministério da saúde, em 06 de julho de 1994 limita as indicações da talidomida às seguintes condições clínicas, no âmbito de programas oficiais: hanseníase (reação hansênica tipo eritema nodoso ou tipo II); DST/Aids (úlceras aftosas idiopáticas nos pacientes portadores de HIV/Aids); doenças crônico-degenerativas como o lúpus eritematoso e a doença enxerto-versus-hospedeiro (OLIVEIRA et al., 1999).

Em estudos prévios, a atividade imunomodulatória reconhecida da talidomida provou ter efeito sobre a sobrevivência de animais de laboratório em modelos experimentais de sepse.(GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2003, 2005)

2 JUSTIFICATIVA

As leptospiroses são sensíveis aos antibióticos largamente disponíveis tais como penicilina, no entanto, o atraso no início do tratamento específico (após quatro dias de sintomas) reduz o efeito da terapia antimicrobiana sobre a sobrevivência e o tempo de doença (WHO, 2003). Desta forma, para os pacientes que chegam a estágios avançados da infecção com quadros graves e complicados, é fundamental a busca de novas terapias adjuvantes à antibioticoterapia. A terapia imunomoduladora é alvo de interesse na leptospirose visto que estudos recentes chamam atenção para o papel de uma resposta inflamatória sistêmica como base das formas graves da doença. A talidomida é uma droga reconhecidamente imunomoduladora e inibidora da produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e apresenta resultados encorajadores em modelos experimentais de sepse. A talidomida ainda não foi avaliada como terapia adjuvante à antibioticoterapia na leptospirose. Recentemente, desenvolvemos um modelo experimental que permite a avaliação de terapias adjuvantes à ampicilina no modelo de hamsters (SPICHLER et al., 2007).

3 HIPÓTESE

A talidomida atuará como terapia adjuvante à antibioticoterapia no modelo experimental de tratamento tardio na leptospirose.

4 OBJETIVO GERAL

4.1 GERAL:

Investigar o impacto do uso da talidomida como terapia adjuvante no tratamento da leptospirose experimental.

4.2 ESPECÍFICOS:

1. Investigar o impacto do uso da talidomida como terapia adjuvante à ampicilina sobre a sobrevida na leptospirose experimental.
2. Investigar o impacto do uso da talidomida como terapia adjuvante à ampicilina sobre as lesões de órgão alvo na leptospirose experimental.
2. Investigar o impacto do uso da talidomida como terapia adjuvante à ampicilina sobre a carga de leptospiras em órgãos alvo na leptospirose experimental.

5 DESENHO EXPERIMENTAL

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) da linhagem Golden Syrian foram divididos em quatro grupos separados segundo os tratamentos adotados: nenhum tratamento (NONE), talidomida apenas (TAL), ampicilina apenas (AMP) e ambos (AMP-TAL).

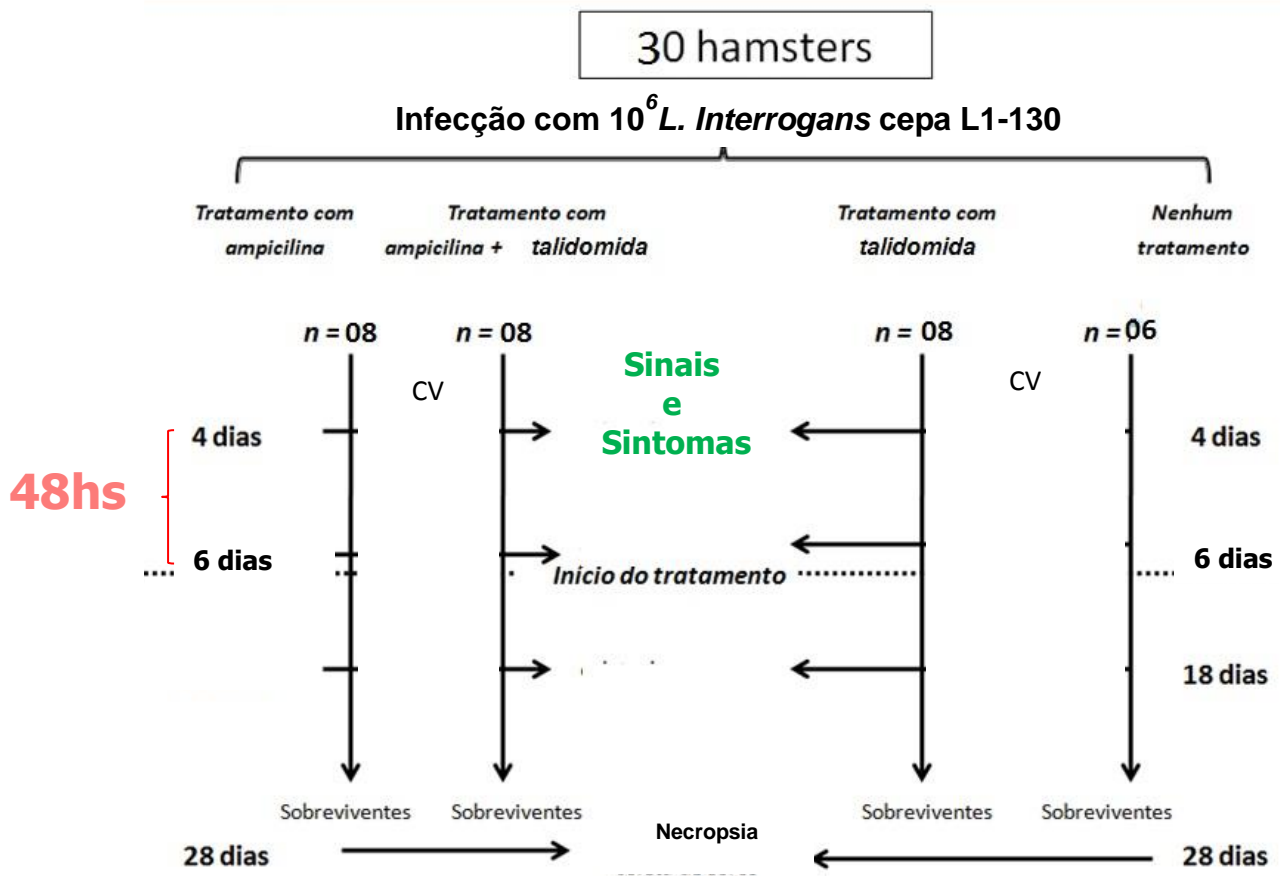
A talidomida (Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Brasil) foi obtida como cápsulas para uso oral, as quais foram moídas e administrada por sonda orogástrica na dosagem de 50 mg/Kg diluída em óleo de linhaça (2ml/Kg) por três dias. A ampicilina (Ariston, São Paulo, Brasil) foi administrada por via intramuscular na dosagem de 100mg/Kg duas vezes ao dia por seis dias.

No experimento 01 o tratamento foi iniciado 48h após o início dos sinais clínicos de doença (alopecia, prostração e fotofobia na maioria dos animais infectados). No segundo experimento o tratamento foi iniciado imediatamente após a detecção do primeiro óbito entre os animais infectados.

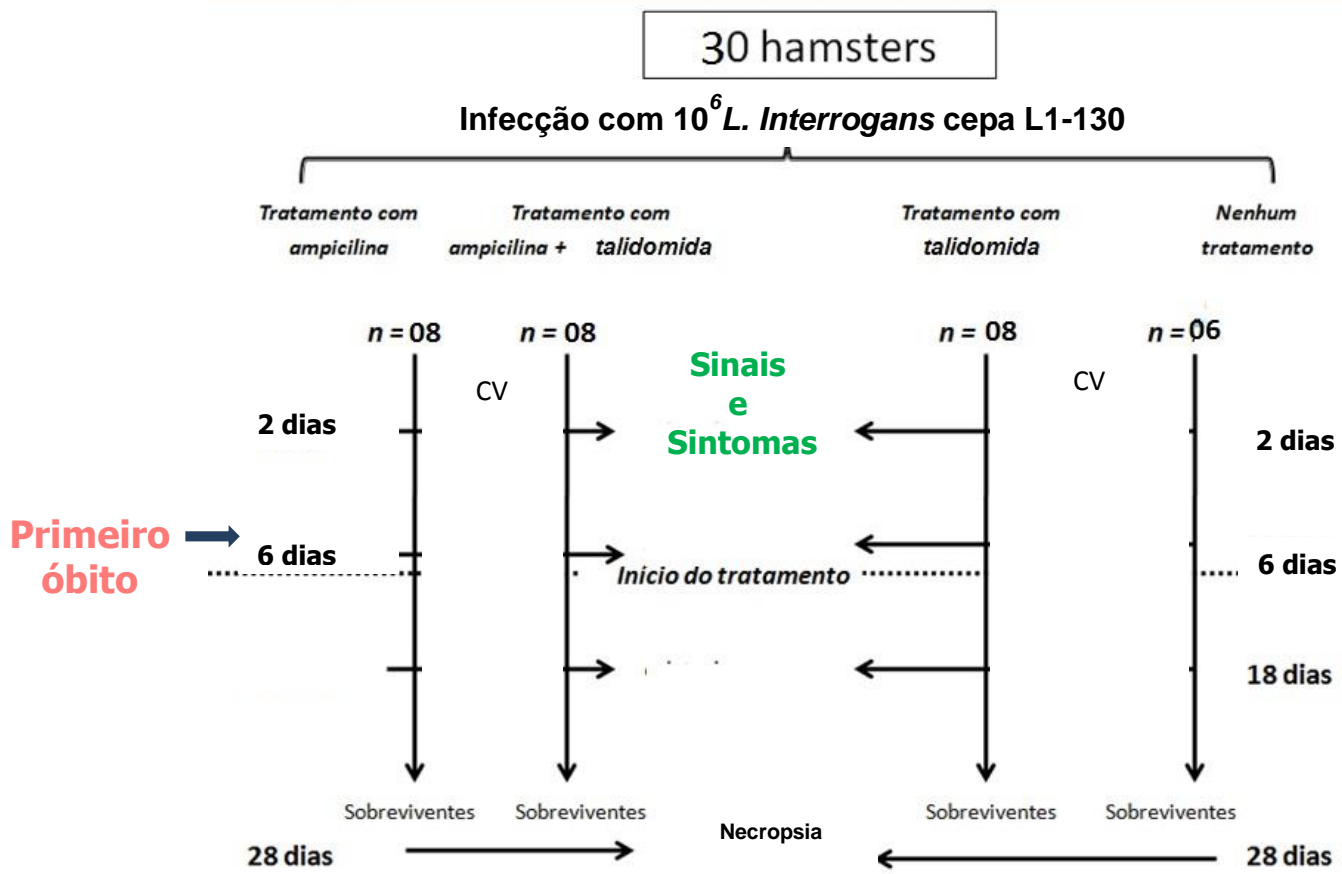
As duas abordagens tinham como objetivo simular a realidade da prática clínica em que os pacientes geralmente recebem o diagnóstico após vários dias de sintomas, situação em que o tratamento antimicrobiano tem sua eficácia limitada.

O presente estudo, em sua versão atual, foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (Cadastro no CEUA-CPqGM: 11/2010) em 27/09/2010 (Anexo 1).

5.1 SINAIS E SINTOMAS: EXPERIMENTO 01



5.2 DIA DO PRIMEIRO OBITO: EXPERIMENTO 02



6 MATERIAS E MÉTODOS

6.1 BACTÉRIAS

A cepa utilizada nos experimentos foi a *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 com número baixo de passagem *in vitro* (quatro passagens em hamsters prévias e menos de 15 passagens *in vitro*). As cepas de leptospiros foram cultivadas em meio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Difco Laboratories, Detroit, EUA) a 29°C e seu crescimento foi acompanhado com contagem em câmara de Petroff-Hausser (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA). Para o preparo do inóculo a cepa foi descongelada com virulência recuperada após quatro passagens em hamsters e passada 15 vezes *in vitro* (cepa de baixa passagem). Em experimentos preliminares a dose letal 50% desta cepa nas mesmas condições foi estimada em 164 organismos e o inóculo definido no estudo (10^6 leptospiros) foi invariavelmente letal para hamsters com óbitos concentrados entre os dias 10 e 14 após a infecção experimental.

6.2 ANIMAIS

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) da linhagem Golden Syrian, fêmeas de nove semanas, 50-55g, num total de 60 animais foram inoculados com a dose letal de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1-130 de baixa passagem (15 passagens *in vitro* antes da infecção experimental).

O cálculo amostral foi realizado para um total de 234 animais, conforme pode ser visto na liberação do CEUA-CPqGM, (anexo 01) contudo devido a problemas de fornecimento e instalação o número total ficou reduzido a 60 animais, sendo 30 utilizados em cada experimento. Como o objetivo principal era avaliar o tratamento os grupos tratados foram mantidos homogêneos (08 animais cada um) sendo que apenas o grupo controle sofreu redução (06 animais) finalizando o total dos 30 animais disponibilizados

6.3 DETECÇÃO DE LEPTOSPIRAS NOS TECIDOS

A presença de leptospiras nos tecidos dos animais avaliados foi detectada em *imprints* pela técnica de imunofluorescência indireta realizada conforme protocolo previamente descrito por nosso grupo (CHAGAS- JUNIOR et al., 2009).

Os *imprints* foram obtidos pela impressão da superfície do corte de órgãos (rim, fígado, pulmão e coração) em lâminas de vidro previamente preparadas com poly-L-lisina (0,01%, Sigma), imediatamente após eutanásia dos animais. Em seguida, as lâminas foram deixadas à temperatura ambiente até a secagem das impressões e posteriormente foram fixadas em acetona por 3 min. As áreas das impressões foram delimitadas com esmalte ou caneta hidrofóbica, antes de iniciar o procedimento de imunofluorescência.

As lâminas foram lavadas três vezes com PBS 1x por 5 min e em seguida incubados duas vezes com tampão de bloqueio (PBS, 0,4% BSA) por 20 min em câmara úmida, onde foram realizadas as etapas seguintes. Após três lavagens com PBS 1x, os cortes foram incubados com anticorpo anti-*L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae cepa L1-130 produzido em coelho, diluído 1:200 em tampão de bloqueio, a 37°C, por 1 h. Em seguida, os cortes foram lavados três vezes com PBS 1x e incubados com anticorpo anti-IgG de coelho marcado com FITC (Jackson Immuno Research), diluído 1:500 em tampão de bloqueio, por 1 h, a 37°. Por fim, os cortes foram lavados três vezes com PBS 1x e as lâminas montadas com anti-fade e analisadas em microscópio de fluorescência. A contagem foi realizada em dez campos tendo-se como sentido da direita para a esquerda e de cima para baixo. Após foi calculado a mediana.

6.4 EXAME MACROSCÓPICO E HISTOPATOLOGIA

Os animais foram acompanhados por 28 dias. Os hamsters que ficaram moribundos foram eutanasiados e necropsiados imediatamente. Os sobreviventes foram acompanhados até o 28º dia quando foram submetidos à eutanásia e necropsia. À necropsia, os pulmões foram

examinados para detecção macroscópica de hemorragia pulmonar, a presença de lesões pulmonares macroscópicas foram consideradas para fins de análise. Em todos os casos, o exame microscópico dos pulmões foi realizado para confirmar a presença de hemorragia alveolar maciça.

Um rim, um pulmão e parte do fígado foram fixados em formalina a 4% e embebidos em parafina para obtenção de secções de 4 a 5 μm de espessura utilizadas para histologia convencional (coloração de rotina por hematoxilina-eosina). A estimativa semi-quantitativa do grau das lesões nos órgãos alvo seguiu os critérios previamente utilizados pelo nosso grupo (BANDEIRA et al., 2011) Anexo 3 – 1º artigo.

As lesões estudadas foram as seguintes: hemorragia pulmonar macroscópica (confirmada pela histologia), lesão aguda do epitélio tubular renal (tumefação do epitélio tubular proximal), nefrite intersticial, regeneração do epitélio tubular, hemorragia intraglomerular e destrabeculação de hepatócitos. A nefrite intersticial grau 1 foi definida pela presença de infiltrado rico em macrófagos e linfócitos restrito a áreas periarteriais e periglomerulares, em até um foco por campo de 100x; a nefrite grau 2 foi definida pela presença de infiltrado que se estende a outras áreas do parênquima renal ou ocorre com frequência de 2 focos por campo de 100x; e a nefrite grau 3 foi definida pela presença de mais de três focos por campo de 100x. As demais lesões foram graduados pelo mesmo critério para determinação de multifocalidade sendo consideradas apenas a presença ou ausência destas lesões.

6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação de valores semiquantitativos ou quantitativos entre os grupos analisados foi feita utilizando testes não paramétricos. Para avaliar a curva de sobrevida utilizou-se o Kaplan-Meier para analisar cada grupo separadamente e o Long-rank Test para a análise de todos os grupos. Em relação as lesões nos órgãos alvo o teste estatístico utilizado foi o exato

de Fisher. Para correlacionar as cargas de leptospiros nos órgãos alvo foi utilizada o teste de Kruskal-wallis.

Diferenças entre os grupos individuais foram consideradas significantes quando o valor de p foi menor que 5% ($p < 0,05$). Todos os procedimentos estatísticos foram feitos utilizando o pacote estatístico GraphPad Prism versão 4.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) e o Statistical Package for Social Sciences – SPSS versão 13 (SPSS, Chicago, Illinois).

7 RESULTADOS

7.1 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE HAMSTERS INFECTADOS: EXPERIMENTO 01

No primeiro experimento o início dos sinais e sintomas ocorreram 48 horas após a infecção, com tratamento iniciado ao sexto dia pós-infecção. O desfecho letal ocorreu em 6/6 e 8/8 dos grupos NONE e TAL, respectivamente. Nenhum óbito foi constatado nos animais dos grupos AMP ou AMP-TAL. A mediana (percentil 25 – percentil 75) de dias para o óbito foi de 10 (10 – 10,8) e 11 (10,8 – 13,5) nos grupos NONE e TAL, respectivamente. A diferença entre as curvas de todos os grupos analisados foram significantes (log-rank Mantel-Cox test, $p < 0,0001$). A comparação direta entre as curvas do grupo NONE e TAL não mostrou significância ($p > 0,05$). As curvas de sobrevivência do primeiro experimento são mostradas na figura 1.

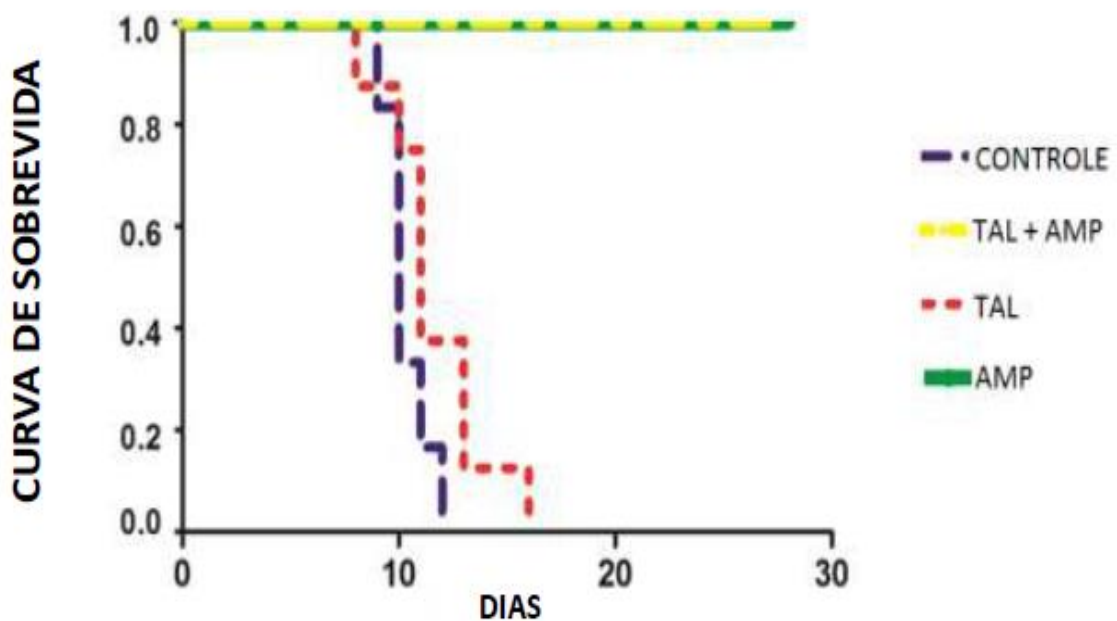


Figura 1: Curva de Sobrevivência de hamsters infectados com 10^6 *Leptospira interrogans* cepa L1.130 e tratados com ampicilina e/ou talidomida isoladas ou combinadas, 48 horas após a detecção dos sinais e sintomas clínicos.

7.2 LESÃO DE ÓRGÃOS ALVO DE HAMSTERS INFECTADOS: EXPERIMENTO 01

A frequência de hemorragia pulmonar detectada à macroscopia foi de 6/6 (100%) e 5/8 (63%) nos grupos NONE e TAL, respectivamente. A diferença de frequência entre estes dois grupos não foi significativa (teste exato de Fisher, $p > 0,05$), contudo quando comparado o grupo NONE com o s demais que passaram por algum tratamento (TAL, AMP e AMP + TAL) a diferença de frequência foi significativa (teste exato de Fisher, $p < 0,05$). Nenhum dos animais eutanasiados (examinados à necropsia no 28º dia pós-infecção), dos grupos AMP e AMP + TAL, apresentou hemorragia pulmonar macroscópica. A tabela 1 exhibe também os achados patológicos de outros órgãos alvo da infecção por leptospiras (rim e fígado).

Tabela 1: Identificação das lesões nos órgãos alvo de hamsters infectados com ⁶ *Leptospirainterrogans* cepa L1.130 e tratados com ampicilina e/ou talidomida isoladas ou combinadas, 48 horas após a detecção dos sinais e sintomas clínicos

	<i>Rim</i>		<i>Fígado</i>		<i>Pulmões</i>	
	<i>n/N(%)</i>		<i>n/N(%)</i>		<i>n/N(%)</i>	
	Lesão tubular aguda*	Nefrite intersticial	Regeneração tubular	Hemorragia glomerular	Destrabeculação de hepatócitos*	Hemorragiapulmonar macroscópica*
NONE	4/5(80)	0/5	1/5(20)	3/5(60)	4/5(80)	6/6 (100)
TAL	4/7(57)	1/7(14)	2/7(29)	3/7(43)	3/7(43)	5/8 (62)
AMP	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
AMP + TAL	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8

Animais que morreram de leptospirose aguda letal (grupos NONE e TAL) apresentavam lesões tubulares agudas (tumefação de células epiteliais tubulares proximais), nefrite intersticial, regeneração do epitélio tubular e hemorragia glomerular; além de detrabeculação dos hepatócitos. Essas lesões não foram detectadas nos animais dos grupos AMP e AMP-TAL, examinados ao 28º dia. Dentre as lesões detectadas apenas a lesão tubular aguda e a detrabeculação de hepatócitos foram estatisticamente significantes (teste exato de Fisher, $p < 0,05$) quando comparado o grupo NONE com os grupos TAL, AMP e AMP + TAL (Tabela 1).

7.3 CARGA DE LEPTOSPIRAS NOS ÓRGÃOS ALVO DE HAMSTERS INFECTADOS: EXPERIMENTO 01

A imunofluorescência em imprint de tecidos detectou leptospiros nas amostras de rim de 6/6 (100%), 8/8 (100%), 1/8 (13%) e 0/8 hamsters dos grupos NONE, TAL, AMP e AMP-TAL, respectivamente. A mediana (percentil 25 – percentil 75) da contagem de leptospiros em dez campos microscópicos de 400x foi de 28 (3-881), 13 (2-131), 0 (0-0) e 0 (0-0) nos grupos NONE, TAL, AMP e AMP-TAL, respectivamente. A diferença foi significativa quando comparado NONE com AMP e AMP-TAL, mas não entre os grupos NONE e TAL. Leptospiros foram detectadas nas amostras de fígado de 5/6 (83%), 2/8 (25%), 0/8 e 0/8 hamsters dos grupos NONE, TAL, AMP e AMP-TAL, respectivamente. A mediana (percentil 25 – percentil 75) da contagem de leptospiros foi de 13 (1-700), 0 (0-2), 0 (0-0) e 0 (0-0) nos grupos NONE, TAL, AMP e AMP-TAL, respectivamente. A diferença foi significativa quando comparado NONE com AMP e AMP-TAL, mas não entre os grupos NONE e TAL. Leptospiros foram detectadas nas amostras de pulmão de 4/6 (67%), 5/8 (63%), 0/8 e 0/8 hamsters dos grupos NONE, TAL, AMP e AMP-TAL, respectivamente. A mediana (percentil 25 – percentil 75) da contagem de leptospiros foi de 6 (0-200), 1 (1-11), 0 (0-0) e 0 (0-0) nos grupos NONE, TAL, AMP e AMP-TAL, respectivamente. A diferença foi significativa

quando comparado NONE com AMP e AMP-TAL, mas não entre os grupos NONE e TAL (Figura 2).

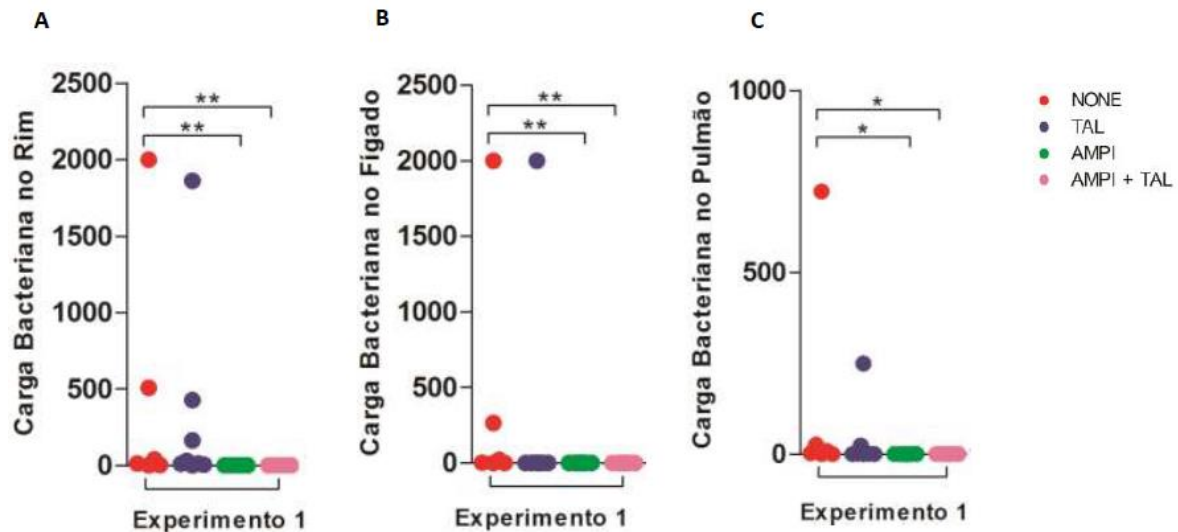


Figura 2: Determinação da carga de leptospiros nos órgãos alvo de hamsters infectados com ⁶ 10 *Leptospira interrogans* cepa L1.130 e tratados com ampicilina e/ou talidomida isoladas ou combinadas, 48 horas após a detecção dos sinais e sintomas clínicos. A presença da carga bacteriana nos rins (A), fígado (B) e pulmão (C) foi quantificada após contagem em microscopia eletrônica de campo. Cada ponto no gráfico representa um hamster e as barras representam a mediana. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (*, $p < 0,05$) e (**, $p < 0,001$).

7.4 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE HAMSTERS INFECTADOS: EXPERIMENTO 02

O tratamento se iniciou ao 6º dia pós-infecção, contudo adotou-se como medida para a busca de um tratamento tardio o primeiro óbito. O desfecho letal ocorreu em 6/6 (100%), 8/8 (100%), 6/8 (75%) e 6/8 (75%) dos grupos NONE, TAL, AMP e AMP-TAL, respectivamente. A mediana (percentil 25 – percentil 75) de dias para o óbito foi de 6,5 (6-7,8), 9 (8-9,3), 9 (9-9,8) e 9,5 (8,3-10) dos grupos NONE, TAL, AMP e AMP-TAL, respectivamente. As diferenças entre as curvas de sobrevivência foram significativas (log-rank Mantel-Cox test, $p < 0,0001$). A comparação direta entre as curvas do grupo NONE e TAL

mostrou significância ($p < 0,05$). As curvas de sobrevivência do segundo experimento são mostradas na figura 3.

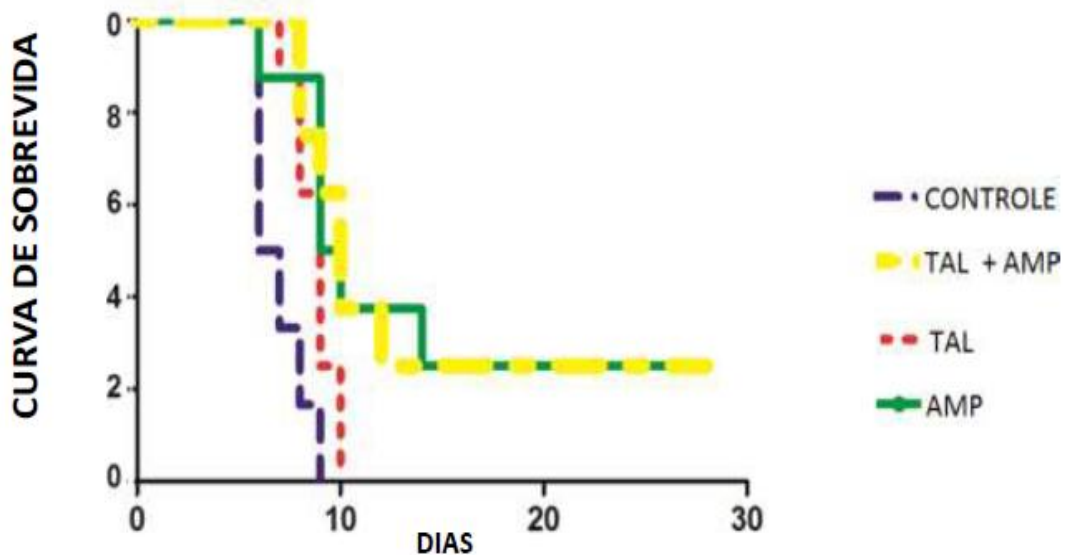


Figura 3: Curva de Sobrevivência de hamsters infectados com 10^6 *Leptospira interrogans* cepa L1.130 e tratados com ampicilina e/ou talidomida isoladas ou combinadas, a partir da detecção do primeiro óbito entre os animais infectados.

7.5 LESÃO DE ÓRGÃOS ALVO DE HAMSTERS INFECTADOS: EXPERIMENTO 02

A frequência de hemorragia pulmonar macroscópica foi detectada em todos os animais que sucumbiram da doença aguda. A diferença de frequência de hemorragia pulmonar, lesão tubular aguda, nefrite intersticial, regeneração tubular e hemorragia glomerular entre os grupos NONE, TAL, AMP e AMP-TAL não foi significativa (teste exato de Fisher $p > 0,05$). Já a diferença da frequência da detrabeculação dos hepatócitos foi significativa quando comparado o grupo NONE com os grupos TAL, AMP e AMP-TAL (teste exato de Fisher $p < 0,05$). Os animais sobreviventes não apresentaram lesões nas amostras de pulmão, fígado e rim (Tabela 2).

Tabela 2: Identificação das lesões nos órgãos alvo de hamsters infectados com 10⁶ *Leptospira interrogans* cepa L1.130 e tratados com ampicilina e/ou talidomida isoladas ou combinadas, a partir da detecção do primeiro óbito entre os animais infectados.

	<i>Rim</i>				<i>Fígado</i>	<i>Pulmões</i>
	<i>n/N(%)</i>				<i>n/N(%)</i>	<i>n/N(%)</i>
Lesão	Nefrite	Regeneração	Hemorragia	Destrabeculação	Hemorragiapulmonar	
tubular	intersticial	tubular	glomerular	de	macroscópica*	
aguda*				hepatócitos*		
NONE	6/6(100)	0/6	0	1/6(17)	5/6(83)	6/6 (100)
TAL	5/8(63)	0/8	3/8(38)	1/8 (13)	0/8	8/8 (100)
AMP	3/8 (38)	0/8	4/8 (50)	0/8	1/8 (13)	6/8 (75)
AMP	4/8 (50)	0/8	3/8 (38)	0/8	1/8 (13)	6/8 (75)
+ TAL						

7.6 CARGA DE LEPTOSPIRAS NOS ÓRGÃOS ALVO DE HAMSTERS INFECTADOS: EXPERIMENTO 02

A imunofluorescência em imprint de tecidos detectou leptospiras nas amostras de rim de 6/6 (100%), 4/8 (50%), 5/8 (63%) e 2/8 (25%) hamsters dos grupos NONE, TAL, AMP e AMP-TAL, respectivamente. A mediana (percentil 25 – percentil 75) da contagem de leptospiras nas amostras de rim em dez campos microscópicos de 400x foi de 234 (13-1250), 1 (0-5), 2 (0-20) e 0 (0-1) nos grupos NONE, TAL, AMP e AMP-TAL, respectivamente. A diferença foi significativa entre os grupos NONE e AMPI + TAL e também NONE e TAL. Leptospiras foram detectadas nas amostras de fígado de 5/6 (83%), 2/8 (25%), 3/8 (38%) e 0/8 hamsters dos grupos NONE, TAL, AMP e AMP-TAL, respectivamente. A mediana (percentil 25 – percentil 75) da contagem de leptospiras nas amostras de fígado foi de 14

(4-1213), 0 (0-1), 0 (0-2) e 0 (0-0) nos grupos NONE, TAL, AMP e AMP-TAL, respectivamente. A diferença foi significativa entre os grupos NONE e AMPI + TAL, NONE e AMPI e também entre os grupos NONE e TAL. Leptospiras foram detectadas nas amostras de pulmão de 4/6 (67%), 0/8, 1/8 (13%) e 0/8 hamsters dos grupos NONE, TAL, AMP e AMP-TAL, respectivamente. A mediana (percentil 25 – percentil 75) da contagem de leptospiras nas amostras de pulmão foi de 11 (0-311), 0 (0-0), 0 (0-0) e 0 (0-0) nos grupos NONE, TAL, AMP e AMP-TAL, respectivamente. A diferença foi significativa entre os grupos NONE e AMPI + TAL, NONE e AMPI e também entre os grupos NONE e TAL (Figura 4).

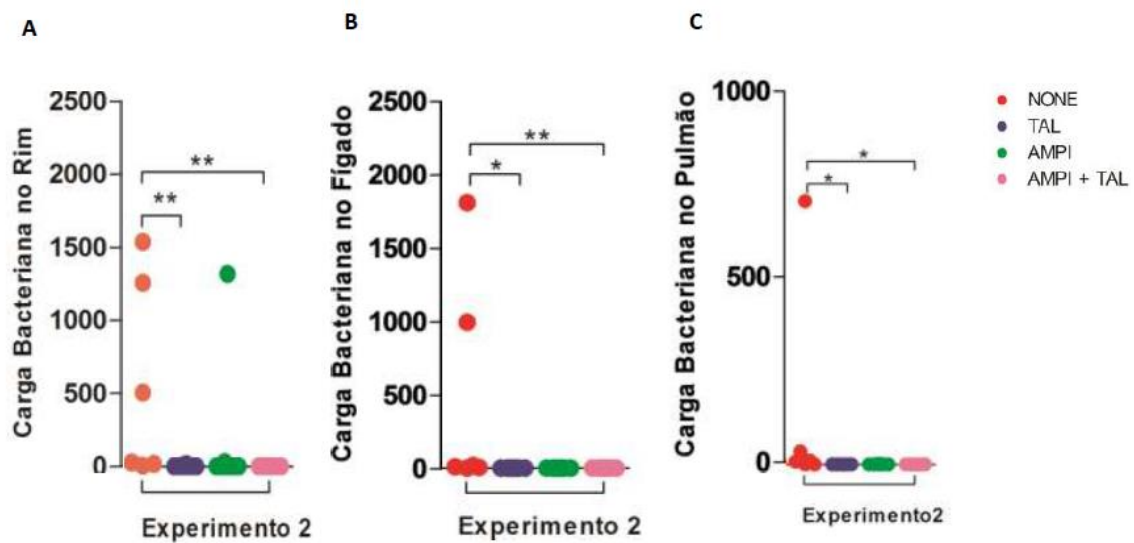


Figura 4: Determinação da carga de leptospiras nos órgãos alvo de hamsters infectados com ⁶ *Leptospira interrogans* cepa L1.130 e tratados com ampicilina e/ou talidomida isoladas ou combinadas, a partir da detecção do primeiro óbito entre os animais infectados. A presença da carga bacteriana nos rins (A), fígado (B) e pulmão (C) foi quantificada após contagem em microscopia eletrônica de campo. Cada ponto no gráfico representa um hamster e as barras representam a mediana. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (*, $p < 0,05$) (**, $p < 0,001$).

8 DISCUSSÃO

O manejo de leptospirosas *in vitro* e o uso de cepas de leptospirosas em modelos experimentais de infecção é sempre uma tarefa desafiadora e podem ser resultantes de consideráveis mudanças na virulência da bactéria e/ou no desfecho da infecção experimental como mínimas variações nas condições de passagens *in vitro*, descongelamento de cepas ou de manutenção de animais no biotério. Nesse contexto, é difícil estabelecer um modelo experimental de início tardio do tratamento padrão atual (antibiótico) para avaliação conjugada com terapias adjuvantes, pois mais variáveis são adicionadas no modelo já reconhecido por ser intrinsecamente sujeito a variabilidade. Mesmo que estas considerações de variabilidade de comportamento das cepas e da infecção experimental, a princípio, representem considerável limitação para desenvolvimento do projeto, novas terapias para leptospirose são urgentes para reduzir a alta letalidade da doença clínica.

As estratégias apresentadas neste trabalho são as que buscam mimetizar a condição clínica de início tardio da terapia antimicrobiana, visto que muitos pacientes demoram em buscar atendimento médico ou o próprio médico ou o médico retarda o diagnóstico específico para a confirmação da suspeita, além de quatro dias após o início dos sintomas, quando o tratamento já tem efeitos limitados. Esse atraso pode ser decorrente de que na fase clínica inicial, a leptospirose pode ser facilmente confundida com infecções inespecíficas lembrando quadros de dengue não complicada ou qualquer doença febril aguda auto-limitada (McBRIDE et al., 2005).

Tendo como base o diagnóstico tardio e a associação entre a leptospirose grave com uma resposta inflamatória sistêmica e desta última com níveis elevados de TNF- α indicando mau prognóstico para o curso da leptospirose (TAJIKI e SALOMÃO, 1996), objetivou-se a utilização de uma droga com potencial de imunomodulação como terapia adjuvante na leptospirose experimental, já que a mesma também foi pouco explorada como terapia adjuvante na leptospirose.

Yukawa et al. (1994), testaram os efeitos da terapia isolada ou combinada de penicilina e esteroides administrados por via subcutânea no modelo de gerbils. Em contraste com o modelo aqui apresentado, o referido estudo não reproduziu o contexto clínico comum de antibioticoterapia tardia. Na realidade, o estudo avaliou as combinações de tratamento iniciados três, dois, um dia antes da infecção ou no momento da infecção. Além disso, como esperado, gerbils submetidos ao pré-tratamento imunossupressor com esteroides apresentaram sobrevida mais curta. De modo semelhante, um estudo experimental mais recente com o objetivo de comparar o tratamento com os antibióticos ampicilina, ofloxacina e doxiciclina em hamsters definiu o início do tratamento arbitrariamente como o terceiro dia pós infecção, o que aparentemente é cedo demais para o desenvolvimento de manifestações clínicas em qualquer modelo de leptospirose experimental (TRUCCOLO et al., 2002).

O trabalho que sugeriu o efeito benéfico da talidomida no modelo experimental de sepse foi sugerido em um estudo que foi a referência importante para o presente trabalho onde a imunomodulação foi realizada a partir de um pré-tratamento com talidomida trinta minutos antes da infecção intraperitoneal por uma cepa multirresistente de *P. aeruginosa* (GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2005). Neste caso a utilização precoce pode ser justificada devido ao fato da doença (sepse experimental) ter evolução mais curta que a leptospirose (com óbitos ocorrendo entre 20 e 180 dias após a infecção). Neste estudo objetivando avaliar o impacto da imunomodulação com talidomida no desfecho da infecção, óbito ocorreu 6º dia após a infecção. Desta forma, o desenvolvimento de uma estratégia para início tardio do tratamento era imperativo.

É interessante que, mesmo na ausência de dados experimentais que subsidiem o benefício da imunomodulação no desfecho clínico da leptospirose, alguns estudos clínicos de intervenção já foram realizados usando estratégias de imunomodulação como alternativa terapêutica. Existem relatos esparsos de benefício clínico do uso de metilprednisolona em altas doses para pacientes com formas graves de envolvimento pulmonar (TRIVEDI et al., 2001; THUNGA et al., 2012; COURTIN et al., 1994). Um relato do Sri Lanka descreve a experiência da introdução (a partir de 2008) de pulsoterapia com metilprednisolona como

terapia padrão para pacientes admitidos com leptospirose grave. A letalidade caiu de 17/78 (22%) para 16/148 (11%) (KULARATNE et al., 2011). Por outro lado, o único ensaio clínico controlado, prospectivo e randomizado foi realizado na Tailândia, onde desmopressina e pulsoterapia com dexametasona foram avaliadas como terapias adjuvantes em 68 pacientes com envolvimento pulmonar grave associado à leptospirose, sem haver demonstração de benefício (NIWATTAYAKUL et al., 2010). Em estudos menores, Trived et al. (2001) já sugeriram benefício sobre a sobrevida de pacientes com leptospirose não só de pulsoterapia com esteroides, mas também de outras terapias imunossupressoras tais como ciclofosfamida e plasmaferese seguida de ciclofosfamida (TRIVEDI et al., 2009; TRIVEDI et al., 2010).

No experimento 1, a análise do efeito da talidomida sobre a sobrevida dos animais quando usado em combinação com ampicilina foi comprometida porque todos os animais do grupo AMP e AMP-TAL sobreviveram. A alta frequência de sobreviventes nos grupos tratados com antibióticos não era esperada, visto que em estudos preliminares os hamsters infectados com esta cepa (na mesma passagem in vitro e mesmo inoculo) têm alta taxa de óbitos concentrados entre os 10 e 14º dia de infecção. No entanto, é sabido que alguma variação na virulência de cepas mantidas in vitro é comum na prática da leptospirose experimental. Por alguma variação de condições não detectada, uma perda de virulência da cepa resultou que, no experimento 1, o início do tratamento no 6º dia tenha sido um momento precoce demais para simular o início tardio de terapia antimicrobiana. Essa compreensão vem do conhecimento prévio de que quando a ampicilina é utilizada na fase precoce do tratamento ela é eficaz (BRASIL, 2009). O que foi observado com a curva de sobrevida neste primeiro experimento onde todos os animais que foram tratados com ampicilina isolado ou combinado com a talidomida sobreviveram, enquanto os demais culminaram com o óbito. Assim, a alta frequência de sobreviventes dificultou a avaliação do efeito da talidomida em combinação com ampicilina (um dos objetivos deste estudo).

Uma tendência, embora não significativa, de sobrevida mais longa em hamsters tratados com talidomida foi observada quando comparada à sobrevida de animais não tratados. Contudo, o tratamento imunomodulador com talidomida isolada não apresentou

efeito sobre a carga de leptospiras nos tecidos e apenas animais que desenvolveram doença aguda letal apresentaram hemorragia pulmonar, lesões renais e detrabeculação de hepatócitos, como já demonstrado em outros estudos na literatura (SPICHLER et al., 2007; SILVA et al., 2007; MARINHO et al., 2008).

O segundo experimento foi o que melhor reproduziu o tratamento tardio (ou subótimo) com ampicilina, fármaco aconselhado pela OMS durante a fase precoce, pois a taxa de desfecho letal foi a mesma (6/8, 75%) nos grupos AMP e AMP-TAL, e as curvas de sobrevida não diferiram entre os dois grupos. Tendo como base a ideia de ter conseguido mimetizar um período tardio para o tratamento da leptospirose, os achados relacionados à talidomida associada à ampicilina ou isolada passam a ter maior validade.

Em relação a curva de sobrevida, os animais tratados apenas com talidomida mostraram curva de sobrevida mais longa do que os animais não tratados com diferença estatística significativa.

Como óbitos foram observados em todos os grupos, as lesões nos órgãos alvo também foram detectadas em todos os grupos. Apenas a frequência de detrabeculação de hepatócitos foi diferente entre os grupos (tabela 2). A detrabeculação de hepatócitos é um achado típico da doença aguda letal e pode resolver e já não estar presente em casos de infecções, mesmo letais, com curso mais prolongado. A observação de que as lesões em órgãos alvo variam em função do tempo e da evolução da doença (aguda versus convalescente) é bem documentada tanto na leptospirose humana quanto na doença experimental (AREAN et al., 1962; MARINHO et al., 2008).

Comparando apenas o grupo NONE nos experimentos 1 e 2, a mediana de dias para o óbito foi de 10 (10 – 10.8) e 6.5 (6 – 7.8) (log-rank Mantel-Cox, $p < 0.0001$), respectivamente. Esta diferença infere que a cepa, mesmo mantida em condições estritas de descongelamento e passagens in vitro, apresentou-se mais virulenta no segundo experimento. Além disso, apesar

de ambos os experimentos terem o tratamento iniciado ao sexto dia após a infecção, no primeiro experimento, onde julgamos a cepa menos virulenta isso representou um tratamento precoce, enquanto no experimento dois (cepa mais virulenta) obtivemos um tratamento em fase tardia (imediatamente após o primeiro óbito entre os infectados). A maior virulência da cepa no experimento 2 além de tornar o tratamento planejado mais tardio em comparação com o do experimento anterior, permitiu a observação de desfechos letais.

Comparando os desfechos clínicos nos dois experimentos, é razoável afirmar que a estratégias de aguardar o primeiro óbito para iniciar o tratamento é uma alternativa viável para reproduzir o tratamento tardio com antibióticos na leptospirose experimental. Essa abordagem dispensa a realização de experimentos pilotos para avaliação de possíveis pontos ideais para início do tratamento, sempre sujeitas a variações de um experimento para o outro como atestado pelo nosso próprio grupo em recente avaliação de outro potencial tratamento adjuvante: o azul de metileno (SANTOS et al., 2010), Anexo 3 – 3º artigo.

A carga de leptospiras no experimento 2 foi consistentemente maior no grupo não tratado (NONE) quando comparado com todos os grupos submetidos a algum tratamento, incluindo mesmo o grupo tratado apenas com talidomida (TAL). Diferenças na contagem de leptospiras foram significantes entre os grupos NONE e TAL para as amostras de rim e pulmão. Uma conclusão óbvia destes achados é que a imunomodulação por curto período não resulta em maior carga de leptospiras nos órgãos alvo. Por outro lado, é intrigante a observação de baixas cargas de leptospiras no grupo TAL. Em pelo menos algumas doenças infecciosas, notadamente micobacterioses e diarreia por microsporídeos, o uso de talidomida demonstrou associar-se com benefício clínico embora nenhuma ação de efeito direto sobre a redução do número de bactérias tenha sido demonstrada (SILVA et al., 2007; RIDOUX e DRANCOURT, 1999).

Alternativamente, o tratamento imunomodulador pode explicar este achado simplesmente por associar-se a um maior intervalo de sobrevivência. Assim, as diferenças na carga de bactérias pode refletir o tempo de ação das defesas naturais do hospedeiro, que

depuram as leptospiras em função do tempo podendo justificar o achado de que animais que morrem mais tarde tendem a apresentar menor carga de leptospiras nos tecidos.

Trucollo et al., (2001), demonstraram que após atingir o limiar de 10^4 leptospiras/ml no sangue, os pacientes com leptospirose evoluem para o óbito a despeito de vigoroso tratamento antimicrobiano e de suporte. Este achado sugere que, a partir de um nível crítico de leptospiremia, mecanismos imunes/inflamatórios são desencadeados e estão associados com complicações (TADESSE e SHANNON, 2005). Como resultado, a leptospirose pode ser fatal mesmo quando a carga de leptospiras está caindo nos órgãos-alvo.

Durante a execução do experimento algumas limitações foram encontradas como por exemplo dificuldade em definir o dia ótimo para iniciar o tratamento e em manter a padronização, mediante tantas particularidades inerentes a cepa (descongelamento, repique) e ao animal, mesmo sendo o modelo utilizado o ideal. Outro fator preponderante foi a reforma do biotério, realizada durante a execução dos experimentos no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, o que diminuiu o fornecimento de animais e dificultou a repetição do estudo, em especial tomando como base o desenho experimental 2 (modelo tardio). Cabe ressaltar, também, que a oferta reduzida de hamsters trouxe algumas mudanças nos objetivos iniciais da pesquisa como a dosagem de TNF- α , a qual seria feita de forma seriada e em pontos específicos, aumentando a exigência do número de animais por grupo.

9 CONCLUSÃO

Como conclusão, este trabalho relata que a estratégia de aguardar o primeiro óbito para um desenho de estudo com modelo de início tardio de tratamento na leptospirose experimental em hamsters é válida. Este modelo é uma ferramenta útil para avaliação de terapias adjuvantes, ou seja, que pode ser adicionado ao tratamento padrão atual com antimicrobianos. Neste estudo, a talidomida mostrou efeito limitado sobre o desfecho da infecção e, portanto, os dados aqui apresentados não embasam a utilização da talidomida como terapia adjuvante em pacientes com leptospirose. Contudo, novos experimentos com um número maior de animais precisam ser realizados antes de invalidar a talidomida como terapia adjuvante na leptospirose. A descrição do modelo neste trabalho objetiva estimular a busca por outras potenciais terapias que possam reduzir a letalidade da leptospirose grave em pacientes.

REFERÊNCIAS

- AREAN, V. M. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). **Am. J. Pathol.**, v. 40, p. 393-423, 1962.
- ATHANAZIO, D. A; SILVA, E. F; SANTOS, C. S; ROCHA, G.M; VANNIER-SANTOS, M. A; McBRIDE, A. J. A; KO, A. I; REIS, M. G. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Tropica**, v. 105, n. 2, p. 176–80, 2008.
- BANDEIRA, M.; SANTOS, C.S. .; AZEVEDO, E.C.; SOARES, L.M.; MACEDO, J.O.; MARCHI, S.; SOLVA, C.L.R.; CHAGAS-JUNIOR, A.; MCBRIDE, A. J.A.; MCBRIDE, F.W.C.; REIS, M.G.; ATHANAZIO, D.A. Attenuated Nephritis in Inducible Nitric Oxide Synthase Knockout C57BL/6 Mice and Pulmonary Hemorrhage in CB17 SCID and Recombination Activating Gene 1 Knockout C57BL/6 Mice Infected with *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**, v 79, n 7, p.2940, July 2011
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7ª edição, Brasília, p. 495-506, 2009
- BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. Talidomida. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S., *et al.* (Eds.). **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11º ed. McGraw Hill, 2007.
- CHAGAS-JUNIOR, A. D; MCBRIDE, A.J. A; ATHANAZIO, D. A; FIGUEIRA, C. P; MEDEIROS, M.A; REIS, M. G; KO, A. I; MCBRIDE, F. W. C. An imprint method for detecting leptospires in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, n. Pt 12, p. 1637, 2009.
- COURTIN, J. P; CARRÉ, P.; POUBEAU, P; DI FRANCIA, M; JARLET, E; MICHAULT, A; AMAT, C; ARVIN BEROD, C. A. Diffuse alveolar hemorrhage and myositis in icterohemorrhagic leptospirosis. Rapid control by a single bolus of corticoids. **Rev. Mal. Respir.**, v. 11, n. 6, p. 601-3, 1994.
- DE BRITO, T.; BOHM, G. M.; YASUDA, P. H. Vascular damage in acute experimental leptospirosis of the guinea-pig. **J. Pathol**, v. 128, n. 4, p. 177-82, 1979.
- ELLINGHAUSEN, H. C., JR. & W. G. MCCULLOUGH. Nutrition of *Leptospira Pomona* and Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation of Oleic Albumin Complex and a Medium of Bovine Albumin and Polysorbate 80. **Am. J. Vet. Res.**, v.26, Jan, p.45-51. 1965.
- FAINE, S; ADLER, B; BOLIN, *Cet al.* **Leptospira and Leptospirosis Second Edition**. [s.l.: s.n.], 1999.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J; BOLANOS, N.; LAOUTARIS, G.; PAPADAKIS, V.; KOUSSOULAS, V.; PERREA, D.; KARAYANNACOS, P. E.; GIAMARELLOU, H. Effective Immunomodulatory Treatment of Escherichia coli Experimental Sepsis with Thalidomide. **Antimicrob. Agents Chem.**, v. 47, n. 8, p. 2445–2449, 2003.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J; BOLANOS, N.; LAOUTARIS, G.; PAPADAKIS, V.; KOUSSOULAS, V.; PERREA, D.; KARAYANNACOS, P. E.; GIAMARELLOU, H. Immunomodulatory intervention in sepsis by multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa with thalidomide: an experimental study. **Infect. Dis.**, v. 5, p. 51, 2005.

JOHNSON, R. C.; S. FAINE. *Leptospira*, vol. 1. Williams e Wilkins, Baltimore In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), **Bergey's Man. Syst. Bacteriol. Med.**, p. 62–67. 1984

KATZ, A. R., ANSDELL, V.E.; EFFLER, P.V.; MIDDLETONAND, C.R.; SASAKI, D.M.. Comparison of serology and isolates for the identification of infecting leptospiral serogroups in Hawaii, 1979-1998. **Trop. Med. Int. Health.** v.8, n.7, Jul, p.639-42. 2003.

KO A. I., GALVAO Reis M., RIBEIRO D. C. M., JOHNSON W. D., JR., RILEY L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, 354:820-5. 1999

KULARATNE, S. A; BUDAGODA, B.D.; DE ALWIS, V.K.; WICKRAMASINGHE, W.M.; BANDARA, J.M.; PATHIRAGE, L.P.; GAMLATH, G.R; WIJETHUNGA, T.J.; JAYALATH, W.A.; JAYASINGHE, C.; PINTO, V.; SOMARATNE, P.; KUMARASIRI, P.V. High efficacy of bolus methylprednisolone in severe leptospirosis: a descriptive study in Sri Lanka. **Postgrad. Med. J.**, v. 87, n. 1023, p. 13-7, Jan 2011.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol Rev.**, v.14, n.2, Apr, p.296-326. 2001

LEVETT, P. N. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. **Clin. Infect. Dis.**, v.36, n.4, Feb 15, p.447-52. 2003.

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Renascimento de um fármaco: talidomida. **Química Nova**, v. 5, 2001.

MARINHO, M. Leptospire: fatores epidemiológicos, fisiopatológicos e imunopatogênicos. **Vet. e Zootec.**, v. 15, n. 3, p.428-434, dez 2008.

MARRIOTT, J. B.; MULLER, G.; DALGLEISH, A. G. Thalidomide as an emerging immunotherapeutic agent. **Immunol. Today**, v. 20, n. 12, p. 538-40, Dec 1999.

MCBRIDE, Alan Ja; ATHANAZIO, Daniel a; REIS, Mitermayer G; KO, Albert I. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 18, n. 5, p. 376–386, 2005.

- MEDEIROS, F. R.; SPICHLER, A.; ATHANAZIO, D.A. Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 155–62, 2010.
- 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.
- 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.**, v. 56, n. 2, p. 181-7, 1997.
- NIWATTAYAKUL, K; KAEWTASI, S; CHUEASUWANCHAI, S; SUTTINONT, C; PHINDA, K; CHIERAKUL, W; SILPASAKORN, S; SUPUTTAMONGKOL, Y. An open randomized controlled trial of desmopressin and pulse dexamethasone as adjunct therapy in patients with pulmonary involvement associated with severe leptospirosis. **Clin. Microbiol. and Infect. Dis.**, v. 16, n. 8, p. 1212, 2010.
- OLIVEIRA, M. A.; BERMUDEZ, J. A. Z.; SOUZA, A. C. M. Talidomida no Brasil: Vigilância com responsabilidade compartilhada? **Cad. S. Publ.**, v. 15, n. 1, p. 99-112, 1999.
- OLIVEIRA, D. S. C; GUIMARÃES, M. J. B; PORTUGAL, J. L; MEDEIROS, Z. The socio-demographic, environmental and reservoir factors associated with leptospirosis in an urban area of northeastern Brazil. **Am. Trop. Med. Parasitol.**, v.103, n.2, Mar, p.149-57. 2009.
- RAJKUMAR, S.V. FONSECA, R.; DISPENZIERI, A.; LACY, M.Q.; LUST, J.A.; WITZIG, T.E.; KYLE, R.A.; GERTZ, M.A.; GREIPP, P.R. Thalidomide in the treatment of relapsed multiple myeloma. **Mayo. Clin. Proc.**, v. 75, n. 9, p. 897-901, Sep 2000.
- RIDOUX, O.; DRANCOURT, M. Lack of In Vitro Antimicrosporidian Activity of Thalidomide Lack of In Vitro Antimicrosporidian Activity of Thalidomide **Antimicrob. Agents Chem.**, v. 43, n. 9, p. 2305–2307, 1999.
- ROMERO, M.H; SÁNCHEZ, J.A; HAYEK, C.L. Prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* en población urbana humana y canina del Departamento del Tolima. **Rev. Salud. Públic.** v.12, n.2, p. 268-275, 2010
- SALKADE, H.P; DIVATE, S.; DESHPANDE, J.R.; KAWISHWAR V.; CHATURVEDI R.; KANDALKAR B.M.; VAIDEESWAR P. A study of sutopsy findings in 62 cases of leptospirosis in a metropolitan city in India. **J. Postgrad. Med.**, v. 51, n. 3, p. 169-73, Jul-Sep 2005.

- SANTOS, C. S; MACEDO, J. O; BANDEIRA, M.; CHAGAS-JUNIOR, A. D; McBRIDE, A. J A.; McBRIDE, F. W. C; REIS, M. G; ATHANAZIO, D.A. Different outcomes of experimental leptospiral infection in mouse strains with distinct genotypes. **J. Med. Microbiol.**, v. 59, n. Pt 9, p. 1101–6, 2010.
- SARKAR, U.; NASCIMENTO, S. F.; BARBOSA, R. et al. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, n. 5, p. 605-10, 2002.
- SILVA, E. F., M. A. MEDEIROS, *et al.* The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v.25, n.33, Aug 14, p.6277-86. 2007.
- SINGALA, C.; NELLE, H.; HALABE, J. El resurgimiento de la Talidomida. **Faculd. Med. UNAM México**, v. 5, 2001.
- SIRIWANIJ, T.; SUTTINONT, C.; TANTAWICHIE, T.; CHUSIL, S.; KANJANABUCH, T.; SITPRIJA, V. Haemodynamics in leptospirosis: effects of plasmapheresis and continuous venovenous haemofiltration. **Nephrology (Carlton)**, v. 10, n. 1, p. 1-6, Feb 2005.
- SPICHLER, A.; KO A.I.; SILVA, E.F.; DE BRITO, T.; SILVA, A.M.; ATHANAZIO, D.; SILVA, C.; SEGURO, A. Reversal of renal tubule transporter downregulation during severe leptospirosis with antimicrobial therapy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, n. 6, p. 1111-9, Dec 2007.
- TADESSE, A; SHANNON, E J. Effects of Thalidomide on Intracellular Mycobacterium leprae in Normal and Activated Macrophages. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 12, n. 1, 2005.
- TAJIKI, H; SALOMÃO, R; , Mortality Among. Association of Plasma Levels of Tumor Necrosis Factor alpha with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 23, n. 5, p. 1177-8, Nov 1996.. v. 23, p. 1177–1178, 1996.
- THUNGA, G; JHON, J; GNANA, K; KHERA, K; KHAN, S; PANDEY, S; MAHARAJ, S. Role of high-dose corticosteroid for the treatment of leptospirosis-induced pulmonary hemorrhage. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 52, n. 1, p. 114-6, Jan 2012.
- TORANO, J. S.; VERBON, A.; GUCHELAAR, H. J. Quantitative determination of thalidomide in human serum with high-performance liquid chromatography using protein precipitation with trichloroacetic acid and ultraviolet detection. **J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.**, v. 734, n. 2, p. 203-10, Nov 12 1999.

TRIVEDI, S. V; CHAVDA, E. K.; WADIA, P. Z.; SHETH, V; BHAGADE, P. N; TRIVEDI, S. O; CLERK, A. M; MEVAWALA, D. M. The role of glucocorticoid pulse therapy in pulmonary involvement in leptospirosis. **J. Assoc. Physic. India**, v. 49, p. 901-3, Sep 2001.

TRIVEDI, S. V; VASAVA, A. H; PATEL, T.C; BHATIA, L.C. Cyclophosphamide in pulmonary alveolar hemorrhage due to leptospirosis. **Indian J. Critic. Car. Med.**, v. 13, n. 2, p. 79–84, 2009 .

TRIVEDI, S.V; VASAVA, A. H; BHATIA, L. C; PATEL, T. C; PATEL, N. K; PATEL, N. T. Plasma exchange with immunosuppression in pulmonary alveolar haemorrhage due to leptospirosis. **Indian J. Med. Res.**, v. 131, n. March, p. 429–33, 2010.

TRUCCOLO, J.; CHARAVAY, F.; MERIEN, F.; PEROLAT, P. Quantitative PCR Assay To Evaluate Ampicillin , Ofloxacin , and Doxycycline for Treatment of Experimental Leptospirosis. **Antimicrob. Agents Chem.**, v. 46, n. 3, p. 848-853., 2002.

VINH, T.; ADLER,B.;FAINE,S. VINH, T. B. ADLER. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. **J. Gen. Microbiol.**, v.132, n.1, Jan, p.103-9. 1986.

WAGENAAR, J.F P; GORIS, M. G ; GASEM, M H.; ISBANDRIO, B.; MOALI, F.; MANTOVANI, A.; BOER, K. R; HARTSKEERL, R. A; GARLANDA, C.; GORP, E. C. M. Long pentraxin PTX3 is associated with mortality and disease severity in severe Leptospirosis. **J. Infect.**, v. 58, n. 6, p. 425–32, 2009.

W.H.O. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.** Malta: 2003.

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.**, v. 34, n. 1, p. 49-55, 1994.

ANEXOS

ANEXO 1: Cópia da aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Ministério da Saúde

FIOCRUZ**Fundação Oswaldo Cruz****Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: 011/2010

PROJETO: “O uso da talidomida como terapia adjuvante na leptospirose experimental”

COORDENADOR: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Hamster (<i>Golden Syrius</i>)	234

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-CPqGM) em 27/09/2010, e tem validade até 27/09/2011.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM-FIOCRUZ at 09/27/2010, being valid until 09/27/2011.

Salvador, 13 de outubro de 2010.

Dr. Manoel Barral Netto

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

ANEXO 2: Artigos publicados na área de leptospirose experimental durante o período do mestrado

Attenuated nephritis in inducible nitric oxide synthase knockout C57BL/6 mice and pulmonary hemorrhage in CB17 SCID and recombination activating gene 1 knockout C57BL/6 mice infected with *Leptospira interrogans*.

Bandeira M, Santos CS, de Azevedo EC, Soares LM, Macedo JO, Marchi S, da Silva CL, Chagas-Junior AD, McBride AJ, McBride FW, Reis MG, Athanazio DA.

Infect Immun. 2011 Jul;79(7):2936-40. doi: 10.1128/IAI.05099-11.

Este estudo teve dois objetivos principais: 1) investigar a frequência de hemorragia pulmonar em camundongos imunodeficientes, incapazes de produzir linfócitos B e T funcionais, infectados por leptospirosas patogênicas; e 2) avaliar o efeito da deficiência genética da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) na frequência e gravidade da nefrite intersticial no modelo murino de infecção por leptospirosas patogênicas. Os animais usados foram camundongos C57BL/6 selvagens e *iNOS*-KO da mesma linhagem; e os dois modelos de imunodeficiência: camundongos CB 17 SCID e C57BL/6 *Rag1*-KO, com as linhagens BALB/c e C57BL/6 selvagens como controles. Camundongos C57BL/6 selvagens e *iNOS*-KO sobreviveram sem sinais de doença após a infecção por leptospirosas patogênicas. A frequência e gravidade da nefrite intersticial foi menor nos animais *iNOS*-KO. Nos experimentos com animais imunodeficientes, todos os camundongos selvagens sobreviveram sem sinais de doença após a infecção por leptospirosas patogênicas, enquanto todos os animais *Rag1*-KO e SCID morreram por leptospirose aguda. Hemorragia pulmonar foi detectada em 57% e 94% dos camundongos *Rag1*-KO, e 83% e 100% dos camundongos SCID, quando usados os inóculos de 10^7 e 10^6 leptospirosas, respectivamente. Nenhum camundongo selvagem desenvolveu hemorragia pulmonar. Como conclusão, a ausência do gene *iNOS* funcional tem efeito mínimo sobre o desfecho da infecção por leptospirosas patogênicas no modelo murino, exceto pela menor susceptibilidade a nefrite intersticial. A ausência de linfócitos B e T funcionais não impede a ocorrência de hemorragia pulmonar no modelo murino. Esse achado fornece evidência de que a hemorragia pulmonar na leptospirose não está relacionado com autoimunidade.

Detection and quantification of *Leptospira interrogans* in hamster and rat kidney samples: immunofluorescent imprints versus real-time PCR.

Chagas-Junior AD, da Silva CL, Soares LM, Santos CS, Silva CD, Athanazio DA, dos Reis MG, McBride FW, McBride AJ.

PLoS One. 2012;7(2):e32712. doi: 10.1371/journal.pone.0032712

Uma das principais limitações no manejo clínico da leptospirose e nos estudos experimentais com infecção por leptospiros patogênicas é a baixa performance dos métodos disponíveis para detecção direta de leptospiros, em especial a microscopia de campo escuro e o isolamento em meio de cultura. Nosso grupo validou previamente o uso de imunofluorescência em imprins de tecidos (IIT) como uma alternativa de detecção direta de leptospiros nos tecidos, abolindo a necessidade de realização de imunofluorescência em cortes congelados de amostras. Neste estudo, comparamos o ensaio de PCR em tempo real (qPCR) usando como alvo o gene lipL32 com a IIT para detecção e quantificação de leptospiros em amostras de rins de ratos e hamsters experimentalmente infectados. Ratos reproduziram o estado de portador crônico (examinados no 28º dia pós-infecção) enquanto hamsters reproduziram a infecção aguda letal (examinados no 8º dia pós-infecção). Nas duas situações, qPCR e IIT apresentaram capacidade equivalente de detecção de leptospiros e as quantificações obtidas apresentaram correlação positiva moderada. O estudo conclui que IIT é uma alternativa viável para detecção direta e quantificação de leptospiros nos tecidos, em especial nas situações em que a realização de qPCR não é possível.

Ionic imbalance and lack of effect of adjuvant treatment with methylene blue in the hamster model of leptospirosis.

Santos CS, Azevedo EC, Soares LM, Carvalho MOS, Santos AC, Chagas Junior AD, da Silva CLR, Chagas UMR, Reis MG, Athanazio DA.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 108, p. 438-445, 2013.

A leptospirose humana usualmente cursa com hipocalcemia e hipomagnesemia, e os mecanismos postulados envolvem a produção renal de óxido nítrico. Nosso grupo previamente demonstrou a correlação positiva entre níveis séricos de óxido nítrico e marcador de gravidade de doença renal (creatinina sérica) na leptospirose humana grave. O azul de metileno é um inibidor da guanilato ciclase, portanto inibidor de efeitos a jusante de todas isoformas de Óxido Nítrico Sintase, e relatos recentes indicam o benefício do seu uso na sepsis experimental e clínica. Neste estudo, investigamos a ocorrência de alterações iônicas séricas em diferentes pontos de infecção (4, 8, 16 e 28 dias) no modelo de hamsters. Também determinamos o efeito do tratamento com azul de metileno quando administrado como terapia adjuvante combinada com início tardio de antibioticoterapia (ampicilina). Neste modelo, a hipocalcemia não foi reproduzida. Todos os grupos infectados desenvolveram níveis crescentes de potássio sérico. Além disso, hipermagnesemia (e não hipomagnesemia) foi observada. Estes achados podem estar relacionados à progressão acelerada da insuficiência renal. O início tardio do tratamento com ampicilina, azul de metileno ou ambos preveniu a elevação de creatinina sérica. No entanto, a terapia adjuvante com azul de metileno não apresentou sobre a sobrevivência dos animais.