AMARO NUNES DUARTE NETO

**PATOGENIA DO ENVOLVIMENTO ESPLÊNICO NA
LEPTOSPIROSE GRAVE COM SÍNDROME DE
CHOQUE SÉPTICO**

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

**Programa de Patologia
Orientadora: Profª Drª Maria Irma Seixas
Duarte**

**São Paulo
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Duarte Neto, Amaro Nunes

Patogenia do envolvimento esplênico na leptospirose grave com síndrome de
choque séptico / Amaro Nunes Duarte Neto. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientadora: Maria Irma Seixas Duarte.

Descritores: 1.Leptospirose 2.Imunologia 3.Células NK 4.Linfócitos TCD4+
5.Citocinas 6.Baço

USP/FM/DBD-451/10

Agradecimentos

A todos do DPMT... Ufa!!!!. Finalmente temos aqui o produto final: a tese. Foram vários momentos dentro da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis até chegar aqui. Desde o embrião que foi a reunião anátomo-clínica da residência em infectologia do HC-FMUSP em 2003, passando pela empolgação da redação e aprovação do projeto de pesquisa da tese e em seguida, a realidade ao conciliar o trabalho como médico assistente nas instituições da FMUSP com os créditos e finalmente, os experimentos, os resultados, a conclusão e a formatação do estudo. Os momentos de pós-plantão... Ah! Não podemos esquecer as incursões gastronômicas para acabar com o stress... Em todos esses momentos vocês estiveram ao meu lado e aprendi muito com cada um de vocês. Tenho certeza que ficou plantada uma grande semente de parceria no trabalho e de uma terna e forte amizade, que floresce e só dá bons frutos a colher. E tenho certeza que este sentimento é recíproco em cada um de vocês. Muito obrigado à professora Maria Irma Seixas Duarte. Muitas coisas eu aprendi com você durante esses anos: uma nova consciência sobre o processo de adoecer, sobre a medicina, sobre o que é a arte e a ciência da anatomia patológica. Não posso deixar de dizer que foi através desse período de convívio que hoje valorizo (e priorizo no meu raciocínio como médico) a interação hospedeiro-parasita em doenças infecciosas. Confesso que antes de

trabalhar com você, eu não tinha o conceito do quanto se poderia amar o paciente e a doença, observando-os pelo microscópio. Meus agradecimentos eternos à Dra Carla Pagliari, cuja participação e co-autoria tornaram possível este trabalho. Carlinha, muito obrigado pelos seus ensinamentos em imunohistoquímica. Obrigado Mônica Kauffman pelas aulas de PCR. Ainda vamos conseguir extrair DNA de pedra, hein Mônica? Agradeço à Cleusa Takakura pelos auxílios nas fotografias, formatação do estudo e na reforma da casa. Cleusinha, ainda vou fazer um estágio com você em microscopia eletrônica, OK? Obrigado Rosana Cardoso: você me ajudou durante todo esse processo, desde a RAC de 2003, à inscrição na pós, passando pelas reuniões, capítulos, qualificação e defesa. Agradeço a Elaine Raniero pela ajuda na formatação do texto e a sempre disposição em me ajudar. Obrigado Felipe Stegun pela valorosa contribuição nos gráficos. A todos do DPMT, existe em mim uma grande expectativa de muito mais no porvir.

À minha amiga e colega de trabalho Suzana Maria Vieira pela grande ajuda na estatística desta tese. Conhecemo-nos no internato, durante o estágio de clínica médica no Hospital Barão de Lucena, Recife, em 1998. E o mundo girou, girou, girou e nos reencontramos aqui, trabalhando juntos no PSM do ICHC e neste estudo. Muito obrigado!

Muito obrigado às secretárias, técnicas de laboratório e médicos patologistas do serviço de Anatomia Patológica do Hospital

Universitário da Universidade de São Paulo, chefiado pela Profa. Dra. Maria Cláudia Zerbini, que me disponibilizaram várias amostras de baços incluídos neste estudo. Um agradecimento especial aos amigos Dra. Angélica Simões, Dra. Cristiane Rúbia, Dra. Fabiana Lima, Dr. Leonardo Testagrossa e às secretárias Zuleide da Silva e Rosa Maria Zanardi.

Meus agradecimentos às técnicas do laboratório de histologia, do Departamento de Patologia da FMUSP: Cássia, Kelly, Welluma, Celina, Paula, e Keila

Ao Prof. Dr. Pasqualucci e ao Sr. Newton do SVOC pela grande gentileza em me fornecer dados e informações do arquivo de necrópsias do serviço.

Agradeço à equipe médica, de enfermagem e fisioterapia da Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, serviço chefiado pelo Prof. Dr. Francisco Soriano, onde muito dos questionamentos sobre leptospirose grave formaram-se, a partir da observação de casos internados nesta unidade. Muito obrigado ao grande colega de trabalho e amigo Dr. Maurício Seckler não só pela ajuda em momentos burocráticos intrincados, mas também pelos créditos e qualidades que sempre conferiu a mim.

Muito obrigado as funcionárias do Serviço de Arquivo Médico do Hospital das Clínicas (Clarice, Sandra e Claudete) e do Hospital Universitário da USP (Lurdes e Marli).

Agradeço aos meus amigos e colegas de trabalho do Pronto Socorro do Instituto Central do Hospital das Clínicas (disciplina de Emergências Clínicas da FMUSP): Carlos Mineiro, Glaura Alvarenga, Maria Cecília Damasceno, Murilo Chiamorela, Flávia Azevedo e Rodrigo Brandão.

Às Sras. Deryn Pompéia e Marta Audísio, muito obrigado não só por seus ensinamentos e revisões do inglês e francês/espanhol, mas também por terem sido minhas amigas e fazerem parte de todo esse período de busca e aquisição de conhecimento que foi o doutorado.

Aos que fizeram parte e possibilitaram meu estágio no Instituto Pasteur de Paris, durante o doutorado. Meus agradecimentos à Catherine Werts, que me chamou a atenção para a leptospirose grave, inspirando-me com seus estudos fundamentais sobre o tema e que me recebeu gentilmente em seu laboratório. Com a Dra. Werts tive treinamento com animais experimentais, com FACS, com cultura celular, além de receber conselhos valiosíssimos que os guardo até hoje. Obrigado pela sua expectativa em ver meus resultados e pela amizade que ainda mantemos via e-mail. Obrigado aos médicos e amigos Elaine e João Neves e Mariana e Julio Croda pela grande ajuda em Paris e pela eterna disposição em cooperar. MUITÍSSIMO obrigado à Sra. Edite Bénard por me transmitir seus conhecimentos de língua e cultura francesa, pelo seu exemplo de competência e perseverança

profissional e pelos conselhos dados no início desta tese.

Agradecimentos ao Departamento de Clínica Médica, na pessoa da Profa. Dra. Maria do Patrocínio, e a todos os médicos assistentes do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas – FMUSP.

Aos meus amigos de sempre, alguns colegas de faculdade na FCM-UPE, outros colegas de trabalho desde o início da residência médica no Hospital das Clínicas, outros me repassando seus conhecimentos e experiências: todos na expectativa do resultado final desta tese. Meus agradecimentos a Anna Christina Cordeiro, Cíntia Cordeiro, Alina Lucena, Adriana Velozo, Anuska Lins, Selina e Artur Medeiros, Patrícia Bonassi, Patrícia Branquinho, Paolo Biselli, Willy Akira, Amanda Francisco, Carla Petrini, Carla Valeri, Édson Abdalla, Luci Kimura, Joana Barradas, Wagner Issao, Luiz Gonzaga, Tatiana Goldbaum e Danilo Noritomi.

Às minhas irmãs e sobrinhos sempre na torcida pelo sucesso desta tese.

À minha mãe **Maria Nóbia Nunes Rodrigues**
À professora **Rita de Cássia Moura**, da disciplina de Biofísica do ICB-
UPE, à Dra. **Maria das Neves Dantas Barros**, médica cardiologista do
PROCAPE – HUOC/UPE e a todos os professores da **Disciplina de**
Medicina Preventiva e Social da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade de Pernambuco. Sem o encontro com esses mestres
durante a graduação em medicina, eu não teria aprendido o valor da
pesquisa científica como parte da formação médica.
A todos **os pacientes** com leptospirose grave que acompanhei durante
estes anos de atividade profissional: o sofrimento daqueles sempre
representou para mim uma forte convocatória para o estudo de
doenças negligenciáveis, que espero, saia um dia do âmbito da
bancada para o campo das ações de intervenção e prevenção.

Epígrafe

Passagem da noite

É noite. Sinto que é noite
não porque a sombra descesse
(bem me importa a face negra)
mas porque dentro de mim,
no fundo de mim, o grito
se calou, fez-se o desânimo.
Sinto que nós somos noite,
que palpitamos no escuro
e em noite nos dissolvemos.
Sinto que é noite no vento,
noite nas águas, na pedra.
E que adianta uma lâmpada?
E que adianta uma voz?
É noite no meu amigo.
É noite no submarino.
É noite na roça grande.
É noite, não é morte, é noite
de sono espesso e sem praia.
Não é dor, nem paz, é noite,
é perfeitamente a noite.
Mas salve, olhar de alegria!
E salve, dia que surge!
Os corpos saltam do sono,
o mundo se recompõe.
Que gozo na bicicleta!
Existir: seja como for.
A fraterna entrega do pão.
Amar: mesmo nas canções.
De novo andar: as distâncias,
as cores, posse das ruas.
Tudo que à noite perdemos
se nos confia outra vez.
Obrigado, coisas fiéis!
Saber que ainda há florestas,
sinos, palavras; que a terra
prossegue o seu giro, e o tempo
não murchou; não nos diluímos.
Chupar o gosto do dia!
Clara manhã, obrigado,
o essencial é viver!

Carlos Drummond de Andrade

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journal Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO.....	08
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
3.1 O agente da leptospirose.....	12
3.2 Fatores de virulência das leptospiras patogênicas.....	16
3.3 Epidemiologia da leptospirose.....	21
3.4 Patogenia e quadro clínico da leptospirose.....	27
3.5 Panorama da síndrome de hemorragia pulmonar grave da Leptospirose no Brasil e no mundo.....	36
3.6 Indicadores de mau prognóstico da leptospirose grave.....	39
3.7 A resposta imune do hospedeiro na leptospirose.....	41
3.8 Imunidade inata.....	42
3.9 Complexo de histocompatibilidade e leptospirose.....	54
3.10 Imunidade humoral na leptospirose.....	56
3.11 Citocinas e imunidade celular adaptativa na leptospirose.....	60
3.12 A apoptose na leptospirose.....	68
3.13 Diagnóstico da leptospirose.....	69
3.14 Terapia para a leptospirose grave e novas intervenções.....	72
3.15 A sepse bacteriana.....	77
3.16 O choque séptico como manifestação clínica da leptospirose grave.....	81
3.17 O baço na leptospirose.....	85
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	88
4.1 Casuística.....	88

4.1.1 Casos de leptospirose.....	89
4.1.2 Controles.....	89
4.2 Dados demográficos e laboratoriais.....	90
4.2.1 Processamento do material.....	90
4.2.2 Método imunohistoquímico.....	90
4.2.3 Método de imunohistoquímica para citocinas.....	94
4.2.4 Método de imunohistoquímica para detecção de antígenos de leptospiros.....	95
4.3 Análise histológica e imunohistoquímica.....	95
4.3.1 Análise semi-quantitativa.....	95
4.3.2 Análise quantitativa.....	96
4.3.3 Análise estatística.....	97
5. COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA.....	98
6. RESULTADOS.....	99
6.1 Casuística.....	99
6.1.1 Grupo de leptospirose com choque e hemorragia pulmonar.....	99
6.1.2 Grupo controle com sepse por bactérias gram-positivas/gram-negativas.....	101
6.1.3 Grupo controle com esplenectomia por trauma.....	102
6.2 Análise histológica das alterações esplênicas encontradas na leptospirose com choque, comparadas com casos controles de sepse e trauma.....	103
6.3 Análise da resposta imune <i>in situ</i> no baço de pacientes com leptospirose e choque, comparada com casos controles de sepse e trauma.....	111
6.3.1 Resposta imune celular inata e adquirida.....	111
6.3.2 Expressão de citocinas <i>in situ</i> no baço.....	128
7. DISCUSSÃO.....	147
8. CONCLUSÃO.....	179
9. ANEXOS.....	181
10. REFERÊNCIAS.....	192

LISTA DE ABREVIATURAS

1. ANA-1: *murine macrophage cell line*
2. ARDS: *acute respiratory distress syndrom*
3. Caspase: *cysteine aspartic acid-specific proteases*
4. CD: *cluster of differentiation*
5. CIVD: *coagulação intravascular disseminada*
6. ELAM: *endothelial leucocyte adhesion molecule-1*
7. ELISA: *enzyme linked immuno*
8. EUA: *Estados Unidos da América*
9. eNOS: *endothelial nitric oxide synthase*
10. FADD: *Fas-associated death domain*
11. FTS: *serum thymic factor*
12. HLA: *class II human leukocyte antigen (HLA) molecules*
13. IC_{95%}: *intervalo de confiança de 95%*
14. ICAM-1: *intercellular adhesion molecule 1*
15. IFN- γ : *interferon gamma*
16. GLP: *glicoproteína*
17. IH: *Imunohistoquímica*
18. IL-1: *interleucina 1*
19. IL-4: *interleucina 4*
20. IL-6: *interleucina 6*
21. IL-8: *interleucina 8*
22. IL-10: *interleucina 10*
23. IL-12: *interleucina 12*
24. iNOS: *inducible nitric oxide synthase*
25. IP-10: *Interferon-gamma inducible protein-10*
26. LAMP-1: *late-endosomal/lysosomal marker*
27. LPS: *lipopolissacarídeo*
28. LPHS: *leptospirosis pulmonary hemorrhagic syndrom*
29. MAPK: *mitogen activated protein kinase*
30. MAT: *microscopic agglutination*
31. Myd88: *Myeloid differentiation primary response gene (88)*
32. CCL2/MCP-1: *monocyte chemoattractant protein-1*
33. MHC II: *major histocompatibility complex class II*
34. Mig: *monokine induced by IFN-gamma*
35. NF κ B: *nuclear transcription factor kappa B*
36. NKCC2: *Na⁺ - K⁺ -CL⁻ co-transporter 2*
37. OMP: *outer membrane protein*
38. OMS: *Organização Mundial de Saúde*
39. OR: *Odds ratio*

- 40. PAMP: *Pathogen-associated molecular pattern*, padrão molecular associado à patógeno
- 41. PARP: *poly(ADP-ribose) polymerase*
- 42. PCR: *protein chain reaction*
- 43. PB: polpa branca do baço
- 44. PBMC: *peripheral blood mononuclear cells*
- 45. PV: polpa vermelha do baço
- 46. RNAm: RNA mensageiro
- 47. ROS: *reactive oxygen species*
- 48. RT-PCR: *real time protein chain reaction*
- 49. SPFL: *Severe pulmonary form of leptospirosis*
- 50. Sph2: *sphingomyelinase 2*
- 51. SPHS: *Severe Pulmonary Hemorrhage Syndrom*
- 52. siRNA: *small interfering RNA*
- 53. SNC: sistema nervoso central
- 54. TGF- β 1: *transforming growth factor- β 1*
- 55. TLR1: *Toll-like receptor 1*
- 56. TLR2: *Toll-like receptor 2*
- 57. TLR4: *Toll-like receptor 4*
- 58. TNF- α : *tumor necrosis factor alpha*
- 59. VCAM: Vascular cell adhesion molecule, *molécula de adesão de celular vascular*

Duarte Neto AN. Patogenia do envolvimento esplênico na leptospirose grave com síndrome de choque séptico [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2010. 159p.

A leptospirose é a zoonose mais comum, distribuída em todas as regiões do mundo e causada por bactérias virulentas do gênero *Leptospira spp.* A apresentação clínica da leptospirose varia de uma doença febril inespecífica a quadros graves com insuficiência renal aguda, icterícia, hemorragias graves, choque cardiovascular e falência de múltiplos órgãos. Pouco se sabe sobre a resposta imune do hospedeiro e os mecanismos patogênicos associados com a leptospirose grave com hemorragia pulmonar e choque cardiovascular. O baço tem sido estudado e considerado nos últimos anos como um órgão essencial na fisiopatologia da sepse/choque séptico, uma vez que nele ocorre perda de células da imunidade, secundária à apoptose.

Objetivos: descrever os achados histológicos e a resposta imune *in situ* do baço de pacientes falecidos por leptospirose com hemorragia pulmonar e choque refratário, comparando-os com dois grupos controles, um formado por pacientes falecidos por choque séptico causado por bactérias Gram-positivas/-negativas e um segundo, formado por vítimas de trauma. **Metodologia:** retrospectivamente, 11 baços de pacientes com leptospirose grave e 10 baços de pacientes com choque séptico foram obtidos por necrópsia e comparados com 12 baços de vítimas de trauma abdominal fechado (controles normais), obtidos por esplenectomia. Os achados histológicos da polpa vermelha e da polpa branca esplênica foram analisados por meio de escore semi-quantitativo. A reação de imunohistoquímica (IH) foi empregada para a marcação de células NK, S100+, CD68+, TCD4+, TCD8+ e CD20+, bem como para células expressando caspase-3, TNF α , IFN γ , IL-1, IL-2r, IL-6, IL-12, IL-10, IL-4 e TGF β . A contagem de células marcadas foi realizada utilizando-se graticulo sobre 10 campos da polpa vermelha e 10 campos da polpa branca, escolhidos aleatoriamente. IH também foi realizada nos baços dos casos de leptospirose para a detecção de antígenos de *Leptospira spp.*

Resultados: os baços de pacientes do grupo leptospirose e do grupo choque séptico demonstraram similaridades na análise histológica, divergindo do grupo trauma, com as seguintes alterações: congestão difusa da polpa vermelha com infiltração moderada a intensa de plasmócitos e polimorfonucleares e folículos da polpa branca com atrofia. A IH para antígenos de *Leptospira* foi positiva em oito (72,7%) amostras de baços do grupo leptospirose. Pela análise quantitativa das células marcadas pela IH, os seguintes resultados foram estatisticamente significantes: alta contagem de células S100+ no grupo leptospirose; alta densidade de células CD68+ no grupo choque séptico; baixa quantidade de células NK e TCD4+ nos grupos leptospirose e choque séptico; baixa quantidade de células TCD8+ nos casos de choque séptico e alta contagem de células CD20+ nos grupos leptospirose e choque séptico. Quanto às células expressando

citocinas, encontrou-se alta quantidade de TNF α nos pacientes do grupo leptospirose e grande número de células positivas para IL-10 nos grupos leptospirose e choque séptico. A expressão de IL-6, IFN γ , IL-1 e IL-2r foi insignificante nos baços dos três grupos estudados. Células expressando IL-12 foram encontradas apenas na polpa vermelha de casos de leptospirose. **Conclusões:** Semelhantes clinicamente aos casos de choque séptico, pacientes com leptospirose grave com choque apresentam disfunção endotelial difusa no baço, esplenite aguda e sinais de comprometimento da imunidade inata e adaptativa *in situ* no baço, caracterizado por uma baixa densidade de células NK, de células TCD4+ e baixa expressão de IL-6, IL-1, IL-2r, IFN γ e IL-12, com alta expressão de IL-10. Estes resultados sugerem que um estado de imunossupressão pontua a resposta imune do hospedeiro no estágio terminal da leptospirose grave com hemorragia pulmonar e choque cardiovascular. A presença de antígenos de *Leptospira* nos baços de casos de leptospirose sugere que o agente etiológico contribui diretamente para a patogênese das lesões.

Descritores: 1- leptospirose, 2- imunologia, 3 – células NK; 4 – linfócitos TCD4+ 5 – citocinas, 6- baço;

Duarte Neto AN. The pathogeny of the splenic lesion in severe leptospirosis with septic shock syndrom [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2010. 159p

Leptospirosis is the most common worldwide zoonosis caused by virulent bacteria from the genus *Leptospira* spp. The clinical presentation of leptospirosis ranges from unspecific febrile illness to severe forms with acute renal failure, jaundice, hemorrhages, shock and multi organ failure. Little is known about the hosts' immune response and the pathogenic mechanisms involved in severe leptospirosis. In recent years the spleen has been considered a pivotal organ in the pathophysiology of the sepsis/septic shock because immune cells are lost due to apoptosis in this organ

Objectives: describe and compare the splenic histological features and the immune response *in situ* in patients who died of pulmonary hemorrhage and shock caused by leptospirosis, with spleens from patients who suffered from Gram-positive/-negative septic shock and abdominal trauma.

Methodology: in retrospect, 11 spleen tissue samples from patients with leptospirosis and 10 spleens from patients with septic shock were obtained by necropsy, and compared with 12 spleens obtained by splenectomy from patients with abdominal trauma. The histological features in the red pulp and white pulp were analyzed by a semi quantitative score. Immunohistochemistry (IH) methods for NK, S100+, CD68+, TCD4+, TCD8+, CD20+ cells, caspase-3, TNF α , IFN γ , IL-1, IL-2r, IL-6, IL-12, IL-10, IL-4 and TGF β were carried out and the stained cells were counted using a grid scale in ten fields of red pulp and white pulp chosen randomly. Also, IH was performed for *Leptospira* antigens in the leptospirosis patients.

Results: the trauma group was totally different from the leptospirosis and septic shock patients which demonstrated strong similarities in the histological analysis: diffuse congestion in the red pulp with a moderate to intense infiltration of plasma cells, and polymorph nuclear cells, and follicles with marked atrophy. The *Leptospira* antigen was positive in eight (72,7%) spleen tissue samples from the leptospirosis group. By the IH methods and quantitative analysis, the following results reached statistical significance: high account of S100+ cells in the leptospirosis group; high density of CD68+ cells in the septic group; low density of NK and TCD4+ cells in the leptospirosis and septic groups; low quantities of TCD8+ cells in the septic group; high density of CD20+ cells in the leptospirosis and septic groups; high expression of TNF α in the leptospirosis group and a strong expression of IL-10 in the leptospirosis and sepsis groups. The expression of IL-6, IFN γ , IL-1 and IL-2r was insignificant in all groups. IL-12 was only expressed in the red pulp of leptospirosis cases.

Conclusion: similar to patients with septic shock, cases of severe leptospirosis (with pulmonary hemorrhage and shock) are associated with a splenic diffuse endothelial dysfunction, splenitis and signs of splenic disturbance in the innate and adaptative immunity *in situ*, characterized by an low density of NK cells, TCD4+ cells and low

expression of IL-6, IL-1, IL-2r, IFN γ and IL-12 with a high expression of IL-10. These results suggest that an immunosuppressive state develops in the hosts' immune response at the terminal stage of severe leptospirosis with pulmonary hemorrhage and shock. Also, the presence of leptospiral antigens in the spleen of the leptospirosis patients suggests the ethyological agent contributes directly to the pathogenesis of the lesions.

Descriptors: 1- leptospirosis, 2- immunology, 3 – NK cells, 4 – TCD4+ cells, 5 – cytokines, 6- spleen

1. Introdução

A leptospirose é a zoonose de maior incidência no mundo causada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira*, também considerada como doença ocupacional e doença infecciosa reemergente, ocorrendo de forma endêmica e epidêmica em países em desenvolvimento de clima tropical e subtropical (Levett, 2001; Bharti et al., 2003; Ko et al.; 2009). A leptospirose foi descrita em 1886, pelo médico alemão Adolf Weil, como uma síndrome infecciosa aguda, com icterícia, esplenomegalia e nefrite, a qual recebeu o epônimo de doença de Weil (Weil, 1886). A descoberta do agente causador da leptospirose ocorreu em 1916 separadamente por grupos de pesquisadores japoneses e alemães (Inada et al., 1916).

As bactérias do gênero *Leptospira* são espiroquetas de 0,1 μ a 6-20 μ m de comprimento, aeróbias obrigatórias de crescimento lento em meio artificial de cultura, móveis, com extremidades em gancho, cuja visualização é feita pela microscopia de campo escuro (Faine et al., 1999; Levett, 2001). A *Leptospira* pode sobreviver por longos períodos em solos úmidos e em reservatórios de água (Ristow e al., 2008). Na última década, o genoma de 4 cepas de leptospirosas foi seqüenciado: a cepa *L. interrogans* serovar Lai, na China (Ren et al., 2003), a cepa *L. interrogans* serovar

Copenhageni FioCruz 120 no Brasil (Nascimento et al., 2004), a *L. biflexa* (Picardeau et al., 2008) e a *L. borgpetersenii* (Bulach et al., 2006).

As leptospiplas podem ser classificadas em serovars pela aglutinação de anticorpos do soro contra o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana celular, através técnica da microaglutinação (MAT). Atualmente, existem 268 serovars da *L. interrogans* e mais de 60 serovars da *L. biflexa* (Ko et al., 2009).

Virtualmente, todos os mamíferos podem se infectar com as leptospiplas, sendo a suscetibilidade à doença e a resistência variável com a espécie. O homem é considerado suscetível à leptospirose e a adquire através do contato direto com secreções e fluidos corpóreos de animais contaminados, ou por meio indireto, através do contato com a água ou o solo contaminado por leptospiplas (Levett, 2001). O *Rattus norvegicus* é o principal transmissor urbano da leptospirose e não apresenta sinais de doença, por ser resistente (Thiermann, 1981; Athanazio et al., 2008b).

A real incidência de leptospirose no mundo não é apenas estimada por falhas nos sistemas de notificação e grande número de subdiagnósticos pela baixa suspeita clínica (Bharti et al., 2003; Ko et al., 2009). O Brasil é considerado pela comunidade médica mundial, ao lado do Peru, Nicarágua, Índia, China, Malásia, Tailândia, Ilhas Unidas e outros países asiáticos, como regiões onde a leptospirose é uma doença reemergente, pelo aumento do número de casos e ocorrência de formas graves como a hemorragia pulmonar (Spichler et al., 2008; Ko et al., 2009).

No Brasil, a leptospirose é uma doença de notificação compulsória com 35.403 casos registrados no período de 1985 a 1997, sendo as regiões sudeste e sul as mais afetadas (Fundação Nacional de Saúde, MS, 1998). Os problemas causados pela urbanização desorganizada nas grandes cidades brasileiras como enchentes, más condições sanitárias, pobreza e superinfestação de ratos favorecem a ocorrência de leptospirose na forma endêmica e epidêmica (Ko et al., 1999; Dias et al., 2007). Dados mais recentes da cidade de São Paulo, obtidos pela ficha de notificação compulsória, demonstram uma incidência de leptospirose de 1,7 a 2,7/100.000 habitantes de 2004 a 2006, sendo a sexta causa de morte entre as doenças notificáveis da capital com taxa de mortalidade global de 11 a 19% (Spichler et al, 2008). No país é em São Paulo onde se registra o maior número de casos de doença de Weil com SPHS e choque, sendo a *causa mortis* em 76% dos casos fatais de doença de Weil com uma taxa de mortalidade de 46% (Spichler et al., 2007).

Pouco se sabe a respeito da resposta imune específica do hospedeiro contra as leptospirosas patogênicas, tanto na suscetibilidade quanto na resistência à infecção. Durante décadas, considerou-se a imunidade humoral como a única responsável pela imunidade anti-leptospirosas, porém nos últimos anos alguns avanços foram alcançados nos campos da imunidade inata e também da imunidade adaptativa (Adler & Faine, 1976; Pereira et al., 1998; Werts et al., 2001; Barbosa et al., 2009).

Os principais achados anatomopatológicos da leptospirose são: hepatopatia colestática, com destrabeculação de hepatócitos (Arean,

1962); nefrite intersticial e necrose tubular aguda (Arian, 1962); hemorragia pulmonar maciça com necrose do revestimento alveolar e formação de membranas hialinas (Nicodemo et al., 1997) e miosite (Uip et al., 1992). A disfunção difusa do endotélio vascular é a lesão básica da leptospirose, causando congestão vascular e hemorragias em diversos órgãos, levando a disfunção orgânica e manifestações clínicas (De Brito et al., 1979; Yasuda et al., 1986). No entanto, não se sabe ainda qual a principal toxina da *Leptospira* responsável pela lesão endotelial. No entanto, estudos experimentais demonstram que o peptidoglicano (PG) da parede celular (Cinco & Banfi, 1983; Dobrina et al. 1995) e a lipoproteína recombinante LIC10365 (Vieira et al., 2007) da *Leptospira* podem ativar células endoteliais.

O quadro clínico da leptospirose humana é muito variável, podendo manifestar-se como uma doença aguda febril inespecífica (a maioria dos casos) ou quadros mais graves (5-15% dos casos) com icterícia, insuficiência renal, choque cardiovascular, insuficiência respiratória (com ou sem SPHS) e disfunção de múltiplos órgãos (Levett, 2001; Barthi et al., 2003). Indicadores de mau prognóstico da leptospirose, associados de forma independente com desfecho letal, são bem descritos na literatura em diversas regiões endêmicas da doença (Sehgal et al., 1995; Yersin et al., 2000; Covic et al., 2003). Em São Paulo, foram determinados como fatores de risco para o óbito intra-hospitalar, a creatinina sérica elevada (maior que 265,2 $\mu\text{mol/l}$), potássio sérico elevado (maior que 4 $\mu\text{mol/l}$) oligúria, plaquetopenia, idade acima de 35 anos e insuficiência respiratória e choque (Marotto et al., 1999; Spichler et al, 2008).

A Incidência do choque na leptospirose grave é variável no mundo, sendo escassos os relatos de choque em países onde a doença não é endêmica, mas freqüente em países como Índia (até 40% dos casos) (Singh et al., 1999), Tailândia (até 70% dos casos) (Panaphut et al., 2003) e Brasil, onde pode ocorrer em até 70-100% dos casos graves (Marotto et al., 1999; Andrade et al., 2007). À semelhança das infecções graves por bactérias Gram-negativas/-positivas, o paciente com leptospirose grave preenche os mesmos critérios diagnósticos de sepse/choque séptico (febre, taquicardia, taquipnéia, hipotensão e leucocitose) (Bone et al., 1992). Do ponto de vista clínico, certos achados característicos da leptospirose como rabdomiólise, plaquetopenia sem CIVD e hemorragia pulmonar associados a insuficiência renal, icterícia e dados epidemiológicos ajudam a fazer o diagnóstico diferencial com outras síndromes infecciosas (Vinetz, 2003).

A fisiopatogenia do choque na leptospirose é ainda pouco compreendida. Estudos de patologia da leptospirose humana e experimental demonstram que há disfunção endotelial nesta doença semelhante à sepse, exceto pela ausência de necrose de células endoteliais (Arian, 1962; De Brito et al., 1979). Pacientes com leptospirose grave e choque apresentam altos níveis sanguíneos de óxido nítrico no sangue (Avdeeva & Bondarenko, 2006; Maciel et al., 2006) e expressão aumentada de iNOS em vários órgãos, acompanhando áreas de necrose e hemorragia, inclusive no pulmão (Chen et al., 2007), sugerindo a participação do óxido nítrico na inflamação sistêmica e na disfunção do endotélio vascular de órgãos afetados. Poucos são os dados disponíveis sobre a resposta imune humana nestes casos,

mas foi demonstrado que a leptospirose grave associa-se a níveis aumentados de TNF α no soro e a uma relação IL-10/ TNF α sérica baixa (Tajiki & Salomão, 1996a, Tajiki et al., 1996b).

Sabe-se que sepse é uma infecção sistêmica acompanhada de resposta inflamatória intravascular generalizada. O choque séptico é definido como a sepse grave acompanhada de hipotensão não responsiva à reposição intravenosa de fluidos, necessitando de drogas vasoativas, com sinais de disfunção orgânica grave (Bone et al., 1992). Na sepse/choque séptico por bactérias Gram-positivas/negativas ocorre um estado pró-inflamatório exacerbado que pode evoluir para uma condição de imunossupressão ao longo da evolução do quadro (Hotchkiss & Karl, 2003). Através de estudos em humanos e em animais experimentais demonstrou-se que ocorre aumento da produção de citocinas Th2 e baixa produção de citocinas Th1 por células mononucleares do sangue periférico, anergia a antígenos de hipersensibilidade, linfopenia por intensa apoptose de linfócitos, ativação de células regulatórias, diminuição de células NK, baixa expressão de MHC II, reativação de vírus como citomegalovírus e *Herpes simplex* e predisposição a infecções nosocomiais. Em estudos de necrópsias em indivíduos que faleceram por choque séptico, ocorrem eventos patogênicos cruciais no baço como a perda de células B, células T CD4+ e células dendríticas por apoptose (Hotchkiss et al., 2001).

Poucos estudos são disponíveis na literatura sobre as alterações esplênicas na leptospirose. Na leptospirose humana durante a fase aguda da doença, já foi demonstrado, que a cultura de PBMC de

pacientes com doença de Weil apresenta diminuição de células TCD3+ e TCD4+ com baixa proliferação destas após estímulo com mitógenos, recuperando-se na convalescência (Kanashiro-Yamashiro et al., 1991). Também, camundongos infectados por *L. interrogans* virulenta com depletação de células TCD4+ e/ou TCD8+, por meio de anticorpos monoclonais, apresentam lesões histológicas nos rins e pulmões mais graves (Pereira et al., 1998). Estes dados sugerem que a imunidade celular adaptativa, além da imunidade humoral, tem uma importância crucial na manutenção da homeostase do organismo durante a fase aguda da leptospirose, prevenindo lesões, e que casos graves apresentam um comprometimento da função de células imunes, embora ainda pouco elucidado.

Considerando-se os dados acima e fazendo um paralelo com o que ocorre no choque séptico por bactérias Gram-positivas/-negativas, poderia ser inferido que casos graves de leptospirose apresentariam imunossupressão aguda com deficiência da resposta imune. Esta hipótese pode ser testada através da análise das alterações esplênicas na vigência da leptospirose grave com critérios definidos de choque séptico. A avaliação da resposta imune *in situ* do baço contribuirá certamente para o avanço do conhecimento no campo da imunidade da leptospirose humana.

2. Objetivos

Como objetivo geral, pretende-se, através do estudo do baço, analisar se o estado da imunidade tecidual na leptospirose grave humana com choque cardiovascular compartilha um perfil de imunossupressão semelhante ao que ocorre no choque séptico causado por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Como objetivos específicos propõem-se:

1. Descrever as alterações histológicas esplênicas de pacientes com leptospirose grave e choque cardiovascular, comparando-as com as alterações encontradas em pacientes com choque séptico causado por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e com as de pacientes sem quadro infeccioso agudo.
2. Caracterizar por meio do método imuno-histoquímico o *status* da imunidade *in situ* (quantificação de células NK, macrófagos, células dendríticas, linfócitos e seus subtipos, expressão de citocinas pró-inflamatórias e de perfil Th1 e Th2) em amostras de baços de pacientes com leptospirose grave com choque cardiovascular. Far-se-á uma comparação desse status imunológico com o encontrado em pacientes com choque séptico causado por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e em pacientes sem quadro infeccioso agudo.

3. Caracterizar a apoptose de linfócitos *in situ*, nas amostras de baços, por meio da caspase 3, em indivíduos falecidos por leptospirose grave com choque cardiovascular comparando-os com pacientes com choque séptico causado por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e em pacientes sem quadro infeccioso agudo.

3. Revisão da literatura

A leptospirose é uma zoonose, também considerada como doença ocupacional, causada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira*, presente em todas as regiões do mundo, de forma endêmica e epidêmica (Levett et al., 2001; Bharti et al., 2003).

Em 1886, Adolf Weil caracterizou a leptospirose como uma síndrome infecciosa aguda com icterícia, esplenomegalia e nefrite, distinguindo-a de outras condições heterogêneas que causavam icterícia febril (Weil, 1886). A esta síndrome denominou-se doença de Weil.

A primeira visualização de leptospirosas foi feita por Stimson em 1907, em rins de paciente morto por suposta febre amarela, utilizando a coloração de Levaditi (Stimson, 1907). Em seguida, os investigadores alemães Hubener & Reiter (1915) e Uhlenhuth & Frommer (1916) isolaram leptospirosas dos rins de pacientes com doença de Weil. Em 1916, um grupo de pesquisadores japoneses formado por Inada e Ido isolaram a *Leptospira interrogans icterohaemorrhagiae* de paciente, demonstraram a transmissão da doença entre cobaias e desenvolveram a primeira vacina com bactérias inativadas, que conferiu proteção contra a infecção em animais experimentais (Inada et al., 1916).

Logo após a descoberta do agente da doença de Weil, várias outras síndromes infecciosas foram reconhecidas como secundárias à infecção por leptospiros: *manukayami* ou febre japonesa de sete dias (*Leptospira heptomadis*), *akiyami* ou febre da colheita (*Leptospira grypotyphosa*) e recentemente, a febre hemorrágica das ilhas Andaman, causada pela *L. interrogans* serogrupo Grippotyphosa (Vijayachari et al., 2008; Sehgal et al., 1995; Roy et al., 2003).

Muito do conhecimento microbiológico básico sobre leptospiros e leptospirose foi estabelecido até meados da década de 20, quando vários tipos de leptospiros foram reconhecidos. Inada e Ido também caracterizaram neste período a leptospirose como zoonose e os ratos como carreadores e vetores. Nos anos subsequentes, outros animais selvagens e domésticos foram identificados como carreadores (Inada et al., 1916; Ido et al., 1917; Vijayachari et al., 2008).

Os achados anatomopatológicos da leptospirose foram descritos no início da década de 1910 por Herscheimer (1916), Beitzke (1916) e Pick (1917) através de relatos de poucos casos. No entanto, décadas após, Areal (1962) descreve com grande propriedade a anatomia macroscópica e microscópica da leptospirose de 33 necrópsias de casos ocorridos em Porto Rico, apresentando dados detalhados dos casos.

As primeiras descrições de leptospiros em ratos e de casos de leptospirose no Brasil foram feitas por Aragão (1917) e Bentes (1917) no Rio de Janeiro.

No momento, o conhecimento sobre leptospirosas avança rapidamente através do campo da biologia molecular, em posição de prioridade para importantes grupos de pesquisa no Brasil e no mundo (Nascimento et al., 2004; Picardeau et al., 2008). Segundo Ko et al (2009), vivenciamos “o amanhecer da era genética molecular para um patógeno causador de uma zoonose emergente”.

3.1. O agente da Leptospirose

A *Leptospira* é uma bactéria espiralada, fina, de 0,1 μ a 6-20 μ m de comprimento, altamente móvel, com membrana citoplasmática, parede celular e uma membrana externa que contém grande quantidade de porinas que permitem a troca de solutos entre o espaço periplasmático e o meio externo (Faine et al., 1999). A visualização da *Leptospira* é feita pela microscopia de campo escuro e a característica morfológica essencial desta é a forma em gancho de suas extremidades, distinguindo-a de outras espiroquetas (Faine et al., 1999, Levett, 2001; Bharti et al., 2003).

A motilidade da *Leptospira* deve-se à presença de dois eixos axiais flagelares do citoesqueleto da bactéria, localizados abaixo da membrana externa celular, cada um inserido em uma das extremidades da bactéria e que se estendem em direção ao centro (Hovind-Hougen, 1976). Periodicamente, os eixos contraem-se, levando à rotação do flagelo e assim,

movimentação da bactéria, que pode ser de três tipos: rotação em torno de um eixo central, movimento progressivo em direção a uma das extremidades e movimento circular (Li et al., 2000; Charon & Goldstein, 2002).

O gênero *Leptospira* spp. é aeróbio obrigatório, de crescimento lento em meio artificial de cultura, com características na estrutura de sua membrana externa comuns tanto às bactérias Gram-negativas (membrana celular dupla), quanto às bactérias Gram-positivas (moléculas de peptidoglicanos inseridas na membrana celular). Leptospiras são catalase e oxidase positivas (Faine et al., 1999).

A *Leptospira* pode sobreviver por longos períodos de tempo em meios de pH neutro ou levemente alcalinos, como solos úmidos e em reservatórios, devido a sua capacidade de agregação celular e formação de biofilme (Ristow et al, 2008; Trueba et al., 2004). No entanto, as leptospiras não resistem ao calor, desidratação e à água salgada (Bharti et al., 2003).

A classificação taxonômica das leptospiras está em constante revisão, devido aos avanços em biologia molecular. Atualmente, as leptospiras estão classificadas na divisão Gracillicutes, classe Scotobacteria, ordem Spirochetales e família Leptospiraceae, dividida em três gêneros: *Leptospira*, *Leptonema* e *Turneria*. A análise filogenética das espécies de *Leptospira* categoriza-as em quatro grupos quanto à virulência: patogênicas (*L. borgpetersenii*, *L. weillii*, *L. alexanderi*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. alstoni*), saprófitas (não patogênicas),

intermediárias (patogenicidade incerta) e as novas espécies (de virulência ainda desconhecida) (Paster et al., 1991; Levett, 2008; Slack et al, 2008).

O gênero *Leptospira* possui 20 espécies determinadas por hibridização de DNA que compartilham homologia de pelo menos 70% do DNA e com um máximo de 5% de pares de bases diferentes (Levett, 2008; Slack et al, 2008). Novas espécies têm sido determinadas, todas ainda com nomeação provisória (Levett, 2008; Slack et al., 2008).

O LPS das leptospiros apresenta heterogeneidade antigênica nos carboidratos de sua estrutura, entre diversas cepas, que permite estabelecer uma relação entre elas (Levett, 2001). Assim, as espécies do gênero *Leptospira* também são classificadas em serovars, pela aglutinação de anticorpos do soro contra o LPS da parede celular, através do teste de microaglutinação (MAT). Atualmente, existem 268 serovars da *L. interrogans* e mais de 60 serovars da *L. biflexa*. Muitos serovars são representados por uma única cepa de *Leptospira*. Serovars relacionados antigenicamente são reunidos em sorogrupos. A classificação sorológica tem importância para a identificação das cepas de leptospiros prevalentes em uma região, para a identificação de carreadores e para a composição de painéis de antígenos utilizados no diagnóstico sorológico da leptospirose (Levett, 2001). No entanto, a classificação em serovars e sorogrupos não fazem parte da taxonomia oficial, uma vez que um serovar pode conter diferentes espécies de leptospiros ou ainda, bactérias relacionadas geneticamente não pertencerem a um mesmo sorogrupo. Ao denominar-se a espécie de leptospira de acordo com a taxonomia oficial, em geral, acrescenta-se o

nome do serovar, do sorogrupo e da cepa isolada. No Brasil, os serovars mais freqüentes causadores de doença humana são copenhageni e icterohaemorrhagiae. (Ko et al., 1999; Pereira et al., 2000; Romero et al., 2003; Romero & Yasuda, 2006). Em São Paulo, o serogrupo mais comum determinado pelo método da PCR é o Icterohaemorrhagiae, correspondendo a 97,5% de amostras isoladas de pacientes (Romero & Yasuda, 2006)

Um grande avanço científico no campo da leptospirose na última década, sem dúvida alguma, foi o seqüenciamento do genoma de quatro cepas de leptospiros. O genoma da cepa *L. interrogans* serovar Lai foi seqüenciado na China em 2003 (Ren et al., 2003). O Brasil deu importante contribuição neste campo, quando a cepa *L. interrogans* serovar Copenhageni FioCruz 120 teve o genoma seqüenciado no Instituto Butantã de São Paulo em 2004 (Nascimento et al. 2004a e 2004b). Seguiu-se o sequenciamento do genoma da *L. borgpetersenii* em 2006 nos EUA (Bulach et al., 2006) e o da *L. biflexa* em 2008 na França (Picardeau et al., 2008). De acordo com estes estudos, o genoma da leptospira é composto de dois cromossomos: o cromossomo CI de maior tamanho, variando de 4.277.185 bp a 4.332.241 bp, e o cromossomo CII de menor tamanho, variando de 350.181 bp a 358.943 bp (Nascimento et al., 2004a e 2004b). A maioria dos genes (77% - 81%) que compõem o genoma da *Leptospira* não possui ortólogos nos genomas de outras espiroquetas, indicando um grande distanciamento das leptospiros dos demais membros do *phylum* durante o processo evolutivo (Paster et al., 1991; Xue et al., 2009). O estudo dos genes que codificam proteínas imunogênicas e virulentas tem sido o eixo

principal de diversas pesquisas para a compreensão da patogenia da leptospirose e para o desenvolvimento de vacinas.

3.2. Fatores de virulência das leptospiros patogênicas

As leptospiros patogênicas apresentam diversas proteínas de superfície, que mediam as interações entre a bactéria com a matriz extracelular e com células do hospedeiro: proteínas que permitem adesão e invasão à célula hospedeira, proteínas que permitem motilidade no tecido conjuntivo, proteínas secretadas como enzimas de degradação (colagenase, hemolisinas, fosfolipase e esfingomielinase) e proteínas formadoras de poros. Não há nas leptospiros proteínas de secreção do tipo III e tipo IV, como as utilizadas por bactérias Gram-negativas para a introdução de proteínas nas células hospedeiras (Ko et al., 2009).

A produção de proteínas de virulência nas leptospiros é extremamente variável, dependente de vários fatores. As cepas patogênicas têm maior expressão destas proteínas do que cepas saprófitas, inativadas ou atenuadas. Também, as sob condições de temperatura e osmolaridade *in vivo*, a expressão de proteínas de virulência é maior que *in vitro* (Haake et al., 2000; Nally et al., 2001 e Nally et al., 2005; Ristow et al., 2007). Como exemplo, Lig A, Qlp42, LipL32, LenA, LenB e Loa 22 estão super-expressas durante a infecção, enquanto a LipL36 é apenas expressa em culturas. Igualmente, cepas patogênicas cultivadas podem perder a virulência em

longo prazo, após vários repiques, por mudanças das moléculas de superfície, principalmente a LPS (Faine et al., 1999). No entanto, a infectividade das leptospiros não se correlaciona com a perda da virulência, uma vez que tanto em modelos *in vitro* como *in vivo*, cepas patogênicas virulentas e avirulentas infectam células-alvos (polimorfonucleares, fibroblastos e células epiteliais) (Haake et al., 1991; Merien et al., 1997; Liu et al., 2007).

O LPS da *Leptospira* é o principal determinante antigênico e representa a estrutura onde ocorrem amplas variações entre os diferentes serovars. O LPS tem uma composição semelhante ao de outras bactérias Gram-negativas, porém com uma atividade endotóxica baixa (Vinh et al., 1986; Shimizu et al., 1987a e 1987b). O antígeno-O do LPS é codificado pelo locus *rfb*, onde o 3'-terminal é altamente conservado entre os serovars e o 5'-terminal apresenta grandes variações genéticas (Bulach et al., 2000).

Para colonizar o hospedeiro, após a invasão da barreira cutâneo-mucosa, as leptospiros disseminam-se pela corrente sanguínea, atingindo os órgãos. Neste momento, ocorre a adesão às células teciduais, com disseminação dentro dos tecidos, através de junções intercelulares (Haake et al., 1994), e principalmente através de células. Apesar de ser um mecanismo ainda pouco conhecido, estudos *in vitro* demonstraram que leptospiros são bactérias intracelulares facultativas, observadas ocasionalmente em fagossomas e com capacidade de atravessar rapidamente o citoplasma das células (Thomas & Higbie, 1990; Merien et al., 1997; Barochi et al., 2002; Liu et al., 2007). A colonização intracelular

transitória sugere um mecanismo de evasão de leptospiros ao sistema imune do hospedeiro.

Quanto à adesão intercelular de leptospiros, avanços têm sido feitos recentemente, com pesquisas desenvolvidas inclusive no Brasil. Barbosa et al (2006) demonstraram que a proteína Lsa24, uma adesina da membrana externa das leptospiros, codificada pelo gene *LIC12906*, liga-se fortemente à laminina, componente da matriz extracelular. Hauk et al. (2008) determinaram que a porção C terminal da LipL32 é reconhecida por anticorpos IgM na fase aguda e na convalescência da doença, e que esta porção C terminal liga-se a componentes da matriz extracelular (colágeno tipo IV e fibronectina). A proteína de superfície Lsa63, codificada pelo gene *LIC10314*, liga-se fortemente à laminina e ao colágeno tipo IV. Esta proteína é expressa em leptospiros patogênicos e é imunogênica, uma vez que é reconhecida por anticorpos no soro de pacientes na convalescência, sugerindo que a mesma está envolvida em mecanismos de lesão da leptospirose (Vieira et al., 2010). Vários genes (*mce*, *invA*, *atsE* e *mviN*) da *L. interrogans* são relacionados com adesão e invasão, porém a função das proteínas relacionadas a estes genes ainda não é esclarecida (Ren et al., 2003).

Algumas proteínas de superfície externa (OMP) são de grande interesse para o estudo da patogenia da doença e como alvos de vacinas contra a leptospirose. No entanto, há a necessidade de maiores estudos, sobretudo os que empregam metodologias de manipulação genética. Entre

as OMPs, destacam-se: Loa 22, LipL32, proteínas da família Lig (LigA, LigB e LigC) e glicolipoproteínas.

A Loa22 é altamente expressa na superfície das leptospiiras durante a infecção, contém peptidoglicanos em sua estrutura, é reconhecida por anticorpos do soro de indivíduos com leptospirose aguda e, até o momento, o gene que a codifica (*loa22*) é o único que preenche o postulado molecular de Koch. Ristow et al (2007) determinaram a ruptura do gene *loa22* na cepa de *L. interrogans*, com perda de virulência em modelo de infecção com cobaias. Com a reintrodução deste gene, houve recuperação da virulência da cepa. Foi determinado recentemente que a Loa22 tem efeito tóxico sobre macrófagos de camundongos (células ANA-1), induzindo alterações no metabolismo celular e apoptose (Zhang, 2008a). Também, a Loa 22 atua sobre células NRK52E (células de túbulo renal de rato) em cultura, produzindo neste efeito citotóxico dose-dependente, com aumento da expressão de TLR2, induzindo a produção de NO pela óxido nítrico sintetase, além de secreção de MCP-1 (Zhang et al., 2010).

A LipL32 é a mais abundante proteína da superfície externa de leptospiiras patogênicas, é imunogênica, altamente expressa durante infecção aguda e liga-se *in vitro* à matriz extracelular. No entanto, cepas mutantes do gene codificador da LipL32 conservam a capacidade de causar doença aguda e colonização (Haake et al., 2000; Haake, 2000). As proteínas da família Lig (*Leptospiral immunoglobulin-like proteins*) são expressas apenas em leptospiiras patogênicas, são imunogênicas, ligam-se à matriz extracelular e mediam a adesão da leptospira à célula hospedeira, porém,

mutantes para os genes que codificam estas proteínas mantêm a virulência e a capacidade de colonização (Croda et al. 2008).

Outras proteínas potencialmente virulentas, além das OMPs, são alvos de estudos na atualidade, para clarificação da sua interação com o hospedeiro e a real importância destas na patogênese da doença. Como exemplos: proteínas responsáveis pelos movimentos rotacional e translacional das leptospiros, como a codificada pelo gene *flaB*; a hemoxigenase, que é responsável pela degradação do anel tetrapirrólico da molécula heme, codificada pelo gene *hemO*; proteínas metiladas de quimiotaxia (como a hemoglobina) e proteínas que são toxinas, como proteases, collagenases (Nascimento et al., 2004a). Outras toxinas como a hemolisina e a esfingomielinase (Sph2) agem formando poros nas células do hospedeiro provocando hemólise, porém ainda é desconhecido o papel delas na patogenia da leptospirose com manifestações hemorrágicas graves (Lee et al., 2002). A Sph2 além de seu efeito hemolítico em hemácias, também exerce efeito citotóxico *in vitro* sobre linfócitos e macrófagos de camundongos, induzindo-os a secretarem IL-6 e IL-1 β . Em células hepáticas humanas (células L-02), a Sph2 induz, além de citotoxicidade, a apoptose celular (Zhang et al., 2008b).

Em resumo, no momento, frente à grande redundância de proteínas imunogênicas descritas na *Leptospira*, a grande tarefa é determinar qual (ou quais) dentre elas poderia ser considerada a principal toxina virulenta, expressa *in vivo*, e realmente implicada nos mecanismos de

patogenicidade da leptospirose, sendo o alvo para o desenvolvimento de vacinas.

3.3. Epidemiologia da leptospirose

A leptospirose é transmitida ao homem por meio do contato direto com secreções e fluidos corpóreos de animais contaminados, ou por meio indireto, através do contato com a água ou o solo contaminado por leptospiros (Levett, 2001; Bharti et al., 2003). A *Leptospira* é mantida no ambiente através de animais carreadores que apresentam colonização persistente dos túbulos renais proximais, eliminando a bactéria por longos períodos sem apresentar sintomas de doença (Faine, 1962). O *Rattus norvegicus*, principal transmissor urbano da leptospirose, pode carrear leptospiros nos túbulos renais por mais de sete meses após a infecção (Thiermann, 1981). No Brasil, foi demonstrado recentemente que este carreador alberga a *L. interrogans* serovar copenhageni cepa FioCruz L1-130 por pelo menos quatro meses (Athanzio et al., 2008b). A prevalência de um serovar de *Leptospira* em uma região, causando doença humana, depende de vários fatores: a espécie de animal reservatório presente no local, as condições climáticas e geográficas do ambiente, a forma de ocupação e práticas de agricultura (Barthi et al, 2003). Uma mesma espécie de mamífero pode carrear diferentes serovars, dependendo da região geográfica do mundo onde é seu *habitat* (Faine, 1962; Barthi et al., 2003).

A leptospirose apresenta larga distribuição no mundo, atingindo os cinco continentes. O maior número de casos da doença ocorre nas regiões tropicais e subtropicais em desenvolvimento com alto índice pluviométrico. Em países temperados desenvolvidos, a leptospirose ocorre na forma ocupacional e em surtos associados à prática esportiva em água e solos contaminados (Levett, 2001; Barthi et al., 2003; Lingappa et al., 2004; Ko et al., 2009).

A real incidência de leptospirose no mundo não é precisamente determinada, seja por falhas nos sistemas públicos de vigilância e prevenção, seja pela baixa suspeita clínica de leptospirose devido ao alto número de casos subclínicos, e por semelhanças com outras doenças infecciosas que ocorrem concomitantemente (por exemplo: dengue) (Flannery et al., 2001). De acordo com relatos atuais da Organização Mundial de Saúde (OMS), anualmente são registrados mais de 500.000 casos de leptospirose grave por ano, com taxa de incidência que varia de 0,1 - 1 por 100.000 habitantes por ano em áreas de clima temperados a 10-100 por 100000 habitantes em áreas tropicais úmidas e durante surtos. A taxa de mortalidade global excede 10% entre os casos graves (citado em Levett, 2001).

O Brasil é considerado pela comunidade médica mundial, ao lado do Peru, Nicarágua, Índia, China, Malásia, Tailândia, Ilhas Unidas e outros países asiáticos, como região onde a leptospirose é uma doença reemergente, graças ao aumento do número de casos nos últimos anos e ocorrência de formas graves como a hemorragia pulmonar. Esta forma é

nomeada por alguns autores como LPHS (*Leptospirosis associated pulmonary haemorrhage syndrom*) (Gouveia et al., 2008; Ko et al. 2009), SPFL (*Severe pulmonary form of leptospirosis*) (Nally et al., 2004; Silva et al., 2002) ou SPHS (*Severe pulmonary haemorrhage syndrom*) (Croda et al., 2009). Neste estudo, utilizaremos a abreviação SPHS para referirmo-nos à hemorragia pulmonar da leptospirose.

A leptospirose é doença de notificação compulsória no Brasil, com 35.403 casos registrados entre 1985 a 1997, sendo as regiões sudeste e sul as mais afetadas (39,1% e 28,4% dos casos, respectivamente) com taxa de mortalidade de 12,5% no período (Fundação Nacional de Saúde, MS, 1998). A desigualdade social, o grande número de favelas com más condições sanitárias, a superinfestação de ratos e os alagamentos e enchentes durante períodos chuvosos compõem o quadro sócio-ambiental desequilibrado das grandes cidades brasileiras, que favorece a ocorrência de leptospirose na forma endêmica e epidêmica (Ko et al., 1999; Barcellos & Sabroza, 2001; Dias et al., 2007). A leptospirose funciona como um alerta para a sociedade de que há um colapso da saúde em geral, com ações preventivas insuficientes tanto de higiene sanitária como no âmbito médico-assistencial (Barcellos & Sabroza, 2000; Reis et al., 2008).

Vários avanços sobre a epidemiologia da leptospirose foram feitos no Brasil nos últimos anos, através de estudos baseados em coorte populacional, no uso de sistemas georreferenciados, na ficha de notificação compulsória e no atestado de óbito, fornecendo novos *insights* sobre a

transmissão da leptospirose, sobre os riscos de adoecimento e sobre a apresentação e evolução clínica da doença.

Estudos recentes efetuados em favela urbana no Brasil indicam que a prevenção da leptospirose, deve abranger melhorias sociais além de melhorias das condições sanitárias. Em Salvador, onde 6-7% da população reside em favelas, uma importante coorte localizada na favela Pau-da-lima, tem fornecido dados importantes sobre a epidemiologia da leptospirose no Brasil. A soroprevalência nessa comunidade pelo MAT foi de 15,4% (Reis et al., 2008) e os fatores preditivos associados com a aquisição de anticorpos anti-*Leptospira* foram: ausência de coleta de lixo; morar próximo (< de 20m) de esgotos abertos, de acúmulo de lixo sólido e de áreas de enchentes; ver ratos (*Rattus norvegicus*) e criar galinhas no peridomicílio; residir na mesma casa de um caso sintomático de leptospirose; ser da raça negra; ter baixo nível educacional e ter baixa renda familiar (Maciel et al., 2008; Reis et al., 2008). Um dos mais importantes e intrigantes resultados encontrados nesta coorte é a presença de um “gradiente” sócio-econômico dentro da favela que produz diferenças entre os moradores do lugar quanto ao risco de infecção por leptospira: entre os que têm uma renda per capita de U\$ 1,0/por dia, o risco de infecção é 11% menor que aqueles com uma renda menor (Reis et al., 2008).

No nosso meio, é comum pacientes com leptospirose não referirem exposição ao meio contaminado, favorecendo a baixa suspeita clínica da doença e assim, levando ao erro diagnóstico. No Rio de Janeiro, durante as epidemias de leptospirose ocorridas após as inundações de

1996, apenas 22% de 1.500 casos referiam contato com roedores e 30% referiam contato com água de enchentes. Se esta discordância entre os eventos (casos de leptospirose *versus* más condições sanitárias e alagamentos) era conseqüente a um viés de informação, do tipo *recall exposure* ou revelava uma mudança real no padrão de exposição ambiental nas áreas endêmicas, os estudos do tipo inquérito populacional mostraram-se falhos em esclarecê-la. O emprego de métodos de geoprocessamento em estudos epidemiológicos recentes conduzidos na cidade do Rio de Janeiro trouxe luz a esta questão. Casos de leptospirose ocorreram em áreas consideradas de “menor risco”, a centenas de metros de distância das áreas de enchentes, de favelas e de acúmulo de lixo. No Rio de Janeiro, as favelas estão entremeadas em áreas de boas condições sanitárias, ocorrendo um contínuo processo enzoótico por meio de ratos e cães que eliminam leptospirosas para o ambiente por vários meses após as enchentes, possibilitando assim, a transmissão da leptospirose para uma população susceptível, residente em áreas de melhores condições sociais (Barcellos & Sabroza, 2000; Tassinari et al., 2004). Segundo Barcellos & Sabroza (2001), áreas distantes até 500 metros de focos de acúmulo de lixo sólido têm uma taxa de incidência de leptospirose significativamente aumentada em relação à média da cidade do Rio de Janeiro. Estes dados sugerem que as medidas preventivas para leptospirose, após as inundações e enchentes, devem ser ampliadas para além das áreas de “maior risco”, nos grandes centros urbanos brasileiros.

Estudos recentes, realizados em São Paulo, descrevem o panorama da SPHS, na cidade onde se registra o maior número de casos de doença de Weil com hemorragia pulmonar maciça. No Estado de São Paulo, 9.335 casos de leptospirose ocorreram entre 1969 e 1997, representando uma área endêmica para a doença, com epidemias durante o verão. A maioria dos casos está concentrada na capital (68%), afetando principalmente adultos entre 20-39 anos de idade (32,4% dos casos) e do sexo masculino (87% dos casos), com incidência média anual de 0,53/100.000 habitantes e incidência máxima de 1,13 casos/100.000 habitantes no período (Romero et al., 2003). Dados mais atuais (2004 a 2006), obtidos a partir da ficha de notificação compulsória da cidade de São Paulo, demonstram uma incidência anual de leptospirose de 1,7 a 2,7/100.000 habitantes, sendo a sexta causa de morte entre as doenças notificáveis da capital, com taxa de mortalidade global de 11 a 19%. A insuficiência respiratória (com ou sem SPHS) é a *causa mortis* em 76% dos casos fatais de doença de Weil com uma taxa de mortalidade de 46%. Digno ressaltar que a necropsia foi responsável pela confirmação de 30% dos casos fatais de leptospirose na cidade de São Paulo (Spichler et al., 2007). Outros estudos epidemiológicos realizados em São Paulo determinaram os fatores associados a um desfecho desfavorável para pacientes hospitalizados por leptospirose com insuficiência respiratória e SPHS e serão discutidos adiante (Marotto et al., 1999; Spichler et al., 2008).

3.4. Patogenia e quadro clínico da leptospirose

A leptospirose humana é uma doença aguda febril de apresentação clínica muito variável, desde quadros oligossintomáticos leves a quadros mais graves, por vezes fulminantes (Ko et al., 2009). Os casos graves de leptospirose (5-15% de todos os casos) podem apresentar hepatopatia colestática e insuficiência renal (doença de Weil), hemorragias graves como a SPHS, hipotensão grave semelhante ao choque séptico e disfunção de múltiplos órgãos (Levett, 2001; Barthi et al., 2003).

O período de incubação da leptospirose é de sete a quatorze dias em média, porém períodos mais curtos podem ocorrer em casos de alta carga bacteriana infectante. A média de duração de sintomas antes de procurar o hospital é de quatro a dez dias (Panaphut et al., 2003; Raptis et al., 2006; Watt et al, 1988). Em São Paulo, foi demonstrado que o tempo decorrido entre início dos sintomas e hospitalização pode ser mais curto nos casos graves com SPHS (cinco dias entre os com SPHS x seis dias entre os sem SPHS) (Spichler et al., 2008).

Na fase inicial da doença ocorre a leptospiremia, com disseminação sistêmica de bactérias para órgãos-alvos, podendo isolar-se microorganismos no sangue, humor aquoso e líquido cefalorraquidiano. Neste período, pode haver febre baixa, cefaléia e mialgias que se resolvem em poucos dias, ou que evoluem para um segundo momento da doença,

denominado de “fase imune” da leptospirose, na segunda semana de sintomas. Esta fase caracteriza-se por recorrência da febre, pelo aparecimento de anticorpos IgM e por manifestações clínicas como meningite asséptica, encefalite, neurites, uveíte, plaquetopenia, bloqueio cardíaco, nefrite, hepatopatia colestática e hemorragias graves. As leptospirosas desaparecem da corrente sanguínea, mas podem ser ainda recuperadas no humor aquoso, rins e urina (Levett, 2001, Bharti et al., 2003, Ko et al., 2009).

O principal achado patológico na leptospirose é uma lesão vascular difusa, responsável pela disfunção de órgãos e pelas manifestações clínicas. Estudos de patologia humana e de animais experimentais mostraram sangramentos em diversos órgãos, com capilares do fígado, baço, rins e pulmões gravemente afetados. De Brito et al.(1979), em um estudo clássico sobre a disfunção endotelial na leptospirose, demonstraram que cobaias infectadas por *L. interrogans* apresentam inicialmente, edema do endotélio, dilatação do retículo endoplasmático, aumento de volume das mitocôndrias e abertura das junções endoteliais, levando ao extravasamento de sangue e de células inflamatórias. Tardamente, ocorre necrose tecidual próxima a leptospirosas intactas ou fragmentadas (De Brito et al, 1979; Yasuda et al., 1986).

Até o momento, nenhuma toxina específica da *Leptospira* foi caracterizada como a principal causadora da lesão endotelial na leptospirose. Sabe-se que o peptidoglicano (PG) da parede celular da *Leptospira* induz ativação do complemento, adesão de células

polimorfonucleares às células endoteliais, fagocitose por leucócitos, mitogênese em linfócitos e induzem a secreção de TNF- α em PBMC (Cinco & Banfi, 1983; Cinco et al., 1996; Dobrina et al., 1995). Recentemente, foi demonstrado que a forma recombinante da lipoproteína de membrana externa codificada pelo gene *LIC10365* induz aumento de expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e E-selectina em células endoteliais de veias do cordão umbilical humano. Esta proteína LIC10365r foi identificada em tecidos lesados de animais infectados por *L. interrogans*, através da imunohistoquímica (Vieira et al., 2007). Outra proteína, a Lp95, codificada pelo gene *LIC12690*, é, até o momento, a primeira OMP de leptospiros capaz de mediar o processo de adesão das leptospiros patogênicas e ativar células de cordão umbilical humano. A Lp95 induz aumento da expressão de E-selectina nas células endoteliais e liga-se à laminina e fibronectina da matriz extracelular, além de ser expressa nos túbulos renais, na infecção experimental (Atzingen et al., 2009).

No fígado, a *Leptospira* invade os sinusóides hepáticos, o espaço de Disse, os hepatócitos e o espaço entre as células parenquimatosas. Ocorrem alterações ultra-estruturais nos hepatócitos e nos canículos biliares responsáveis pela destrabeculação, colestase e liberação de bilirrubina conjugada para a circulação sistêmica, causando icterícia. A necrose de hepatócitos não é significativa, refletindo-se em um aumento discreto das transaminases. As células de Kupffer apresentam ingurgitamento, com fagocitose de leptospiros e hemácias. Os sinusóides estão congestionados com hemorragias focais e edema intersticial. Inflamação

mononuclear está presente nos espaços porta e no parênquima, em menor grau (Arean, 1962; De Brito, 1967; Alves et al., 1992). A apoptose de hepatócitos (corpúsculos de Councilman) é descrita em modelo experimental de leptospirose de cobaias e foi interpretada como sendo um mecanismo de evasão da bactéria (Merien, 1998). A função hepática costumeiramente retorna ao normal nos que sobrevivem após a fase aguda da leptospirose grave.

O envolvimento renal na leptospirose é comum e é objeto de inúmeros estudos humanos e experimentais, que tentam elucidar a fisiopatogenia da lesão renal. No tecido renal ocorre dano funcional vascular com hemorragias, edema intersticial, necrose do epitélio tubular, ruptura da membrana basal do epitélio e infiltrado inflamatório mononuclear intersticial peritubular. Clinicamente, 16 a 40% dos casos têm manifestações clínicas, expressando-se pelo aumento da uréia e creatinina séricas e por alterações na urina tipo I (proteinúria, piúria estéril, hematúria, cilindros hialinos e granulares) (Covic et al., 2003). A uremia é progressiva, responsável por grande número de mortes, a menos que o tratamento dialítico seja instituído. Uma das peculiaridades da infecção por leptospiras é a indução de insuficiência renal não oligúrica, por vezes poliúrica, com hipocalemia e aumento da excreção renal de sódio e potássio (Lin et al., 1999; Abdulkader et al., 1996). Este quadro é decorrente de alterações na microcirculação e nos transportadores renais devido a ação de toxinas da bactéria ou pela reação inflamatória local. Na leptospirose, os túbulos proximais são preferencialmente afetados, tendo a maior concentração de antígenos

bacterianos no tecido renal. No entanto, distúrbios dos transportadores de sódio ocorrem ao longo de todo o néfron (Seguro et al., 1990, Yang et al., 2001, Yang, 2007; Wu et al., 2004). As alterações dos transportadores NHE3 de sódio dos túbulos proximais, dos co-transportadores NKCC2 no ramo ascendente da alça de Henle, da Na⁺/K⁺ ATPase são bem caracterizados na leptospirose (Younes-Ibrahim et al., 1997; Andrade et al., 2007b). Hipocalemia e poliúria são marcadores de bom prognóstico (Seguro et al., 1990). A oligúria e hipercalemia associam-se a um desfecho pior, pois refletem um quadro de necrose tubular aguda subjacente, decorrente de progressão de lesão renal por desidratação ou choque. A proporção de casos fatais conseqüentes à uremia vem caindo, devido à maior disponibilidade do tratamento dialítico, e ao aumento da mortalidade por complicações pulmonares (Marotto et al. 1999; Spichler et al., 2008)

O sistema nervoso central é comumente afetado na leptospirose, devido à meningite asséptica linfocítica, que ocorre em 5-24% dos casos sintomáticos, geralmente na fase imune da doença (Lecour et al., 1989; Sasaki et al., 1993). A *Leptospira* tem sido encontrada no parênquima cerebral de ratos, porém não se tem evidência que ocorra o mesmo em humanos (Vinetz, 1996). As manifestações clínicas relacionadas ao SNC (cefaléia, fotofobia, visão turva, rigidez nuchal, alteração do estado mental, convulsões e encefalite), ocorrem independentemente da presença de uremia, hepatite ou lesão pulmonar (Torre et al., 1994).

O acometimento ocular mais comum na leptospirose é a congestão conjuntival sem exsudação, de caráter auto limitado. Há raros

relatos de inflamação do trato uveal como irite, iridociclite, opacidade vítrea, papilite, panuveíte bilateral, corioretinite e coroidite, que se manifestam como visão turva, fotofobia e dor ocular. Estes sintomas habitualmente são observados na fase imune, associados a auto-anticorpos. No entanto, o quadro pode se manifestar meses depois (até 18 meses), quando os títulos de anticorpos aglutinantes são baixos, o que favorece o subdiagnóstico. Chu et al (1998) descreveram casos de manifestações oculares da leptospirose na Índia, onde 35% dos casos tiveram PCR positiva para *Leptospira* no humor aquoso, na vigência de microaglutinação e ELISA negativos. Neste estudo, 16% dos casos apresentaram lesões vasculares retinianas, devido a efeito direto de leptospirosas ou por um mecanismo auto-imune (Chu, 1998). Anticorpos contra as lipoproteínas LruA e LruB de leptospirosas foram recentemente detectados no soro de pacientes com uveíte crônica por leptospirose na Índia (Verma et al., 2008). Também, pacientes com uveíte de Fuchs e de Behçet apresentaram anticorpos que reagem cruzadamente contra as lipoproteínas LruA e LruB, sugerindo um distúrbio auto-imune comum entre essas doenças e a uveíte da leptospirose (Verma et al., 2008).

Queixas músculo-esqueléticas são freqüentes na leptospirose, caracterizadas por dores musculares intensas nas panturrilhas com rabdomiólise (Solbrig et al., 1987). As biópsias de músculo esquelético revelam-se hemorragias focais, aspectos degenerativos e necrose das fibras musculares com presença de antígenos de leptospirosas demonstrados por reação imunohistoquímica (Uip et al., 1992).

A trombocitopenia na leptospirose grave ocorre em torno de 50%-80% dos casos e associa-se com doença mais grave e insuficiência renal (Edwards et al., 1986), no entanto não se associa a alta mortalidade, mesmo em casos com insuficiência respiratória (Marotto et al., 1999). Estudos experimentais mostram evidências conflitantes de coagulação intravascular disseminada (CIVD), sendo presente em alguns modelos de cães e cobaias (da Silva et al., 1995; Higgins & Coussineau, 1977; Navarro & Kociba, 1982) e ausente em outros (Nally et al., 2004; Yang et al., 2006). Por muitos anos, a trombocitopenia da leptospirose humana não foi associada a CIVD, embora recentemente seja relatada uma incidência de 50% em 79 casos confirmados da doença na Tailândia. Nesta casuística, apenas a plaquetopenia associou-se independentemente a sangramentos (Chierakul et al., 2008).

O principal comprometimento cardíaco da leptospirose é a miocardite que se manifesta por arritmias sintomáticas, insuficiência cardíaca franca com choque e morte súbita. Alterações no eletrocardiograma podem ocorrer em até 68,2%, sendo a fibrilação atrial a mais comum, além de alterações de repolarização e bloqueio átrio-ventricular (Sacramento et al., 2002). Em vinte necrópsias de casos de leptospirose realizadas em São Paulo, De Brito et al. (1987) encontraram uma incidência de 50% de miocardite intersticial com acometimento do sistema de condução, 70% de arterite de coronárias principais e 57,8% de aortite. Em estudo recente de necrópsias realizado em Mumbai, Índia, com 44 casos de leptospirose falecidos por insuficiência respiratória, a miocardite intersticial foi encontrada

em 100% dos casos, lesões do epicárdio/endocárdio em 39%, dano em válvulas cardíacas em 36%, coronarite em 51% e aortite em 56% (Chakurkar et al., 2008).

As manifestações gastrointestinais são comuns na fase aguda da leptospirose, variando de dor abdominal, náuseas, vômitos e diarreia a hematêmese e hemorragia digestiva grave. Colecistite é rara, e pancreatite vem sendo descrita nos últimos anos (Spichler et al., 2005).

As alterações patológicas pulmonares vêm assumindo grande importância nos últimos 20 anos, pelo aumento do número de casos de SPHS. Poucos são os estudos de necrópsias ou de investigação da patogenia da SPHS, porém este tema tem sido objeto de pesquisas recentes no Brasil e em outras regiões do mundo onde a leptospirose é endêmica. Um estudo recente sobre necropsias de leptospirose foi realizado por Salkade et al (2005) em Mumbai, Índia e descreve 62 casos fatais da doença. Em todos os casos, a hemorragia esteve presente em diversos órgãos, com hemorragia pulmonar maciça em 77% dos casos, nefrite intersticial e/ou necrose tubular aguda em 72% dos casos e miocardite em 53% dos casos. O envolvimento concomitante renal e pulmonar ocorreu em 87% dos casos (Salkade et al., 2005). No pulmão da leptospirose, as alterações teciduais são predominantemente hemorrágicas, sobrepujando as inflamatórias. Ocorre disfunção difusa do endotélio vascular, com lesão capilar septal, que leva a hemorragia em focos ou maciça no parênquima pulmonar (alvéolos e interstício), brônquios e traquéia (Arean, 1962; Nicodemo et al., 1997; De Brito et al., 1979). Os vasos encontram-se

ingurgitados, com edema endotelial e com afluxo de leucócitos e plaquetas. O edema pulmonar ocorre e pode ser mais pronunciado quando há miocardite (Chakurkar et al., 2008). Os alvéolos podem demonstrar dano alveolar difuso e membranas hialinas. A troca alveolar deteriora progressivamente para insuficiência respiratória que pode piorar a lesão vascular e exacerbar a hemorragia. Leptospiras raramente são vistas (intactas ou fragmentadas) por meio de colorações de prata e reação de imuno-histoquímica. Recentemente, foi demonstrado em cobaias e humanos que um possível mecanismo auto-imune está presente na patogênese da SPHS, através da deposição linear de imunoglobulina (Nally et al., 2004; Croda et al., 2009) e complemento (Yang et al., 2005; Croda et al., 2009) ao longo da membrana basal do epitélio pulmonar e no espaço intra-alveolar. É possível que a SPHS esteja associada a leptospiremia intensa e grande carga de leptospiras no tecido pulmonar, como demonstrado em relato de caso de leptospirose grave ocorrido no Peru (Segura et al., 2005). Igualmente, Truccolo et al (2001) determinaram, pela PCR semi-quantitativa, o limiar crítico para desenvolver doença grave como hemorragia pulmonar e morte, que é ≥ 10.000 bactérias/ml. Porém, esta associação necessita de futuros estudos para sua confirmação.

3.5. Panorama da síndrome de hemorragia pulmonar grave da Leptospirose no Brasil e no mundo

Ao longo das últimas duas décadas, diversos autores vêm discutindo uma mudança no padrão de apresentação clínica da leptospirose, que chama a atenção da comunidade médica como uma causa importante de febre hemorrágica de alta letalidade.

A hemorragia pulmonar maciça secundária à leptospirose (SPHS) foi descrita primeiramente na China em 1965, e posteriormente na Coreia em 1984 e 1985 (Park et al., 1989). A SPHS ocorrem durante epidemias em áreas endêmicas, não sendo freqüente em países onde a leptospirose está associada a doenças ocupacionais como Itália (Ciceroni et al., 2000) e Argentina (Vanasco et al., 2008). Na epidemia coreana de 1987, a principal *causa mortis* foi a SPHS, com diversos casos apresentando alterações renais discretas, sem necessitar de diálise, mascarando o diagnóstico de leptospirose (Park et al., 1989). Desde 1988, a leptospirose é responsável por surtos de febres hemorrágicas na Índia. Nas ilhas Andaman e Nicobar, a SPHS e a miocardite grave são as principais *causa mortis* da leptospirose nessas regiões (Sehgal et al., 1995; Kuriakose et al., 1997; Chakurkar et al., 2008). Em Mumbai, Singh et al (1999) relataram 58 casos confirmados de leptospirose com 50% de incidência de SPHS e com 40% de hipotensão, sendo 79% dos óbitos ocorridos nas primeiras 24 horas de

internação, devido à extrema gravidade dos casos. A mortalidade geral nessa casuística foi de 24,2%, porém discrepante, dependendo da presença de hemoptise maciça, sendo 42,9% nos casos de SPHS e de 6,7% nos pacientes sem a SPHS.

É, no entanto, a partir do surto de 1995 ocorrido na Nicarágua que a leptospirose chamou a atenção da comunidade médica para sua forma pulmonar hemorrágica grave, adquirindo grande importância clínica e epidemiológica como causa de febre hemorrágica. Neste surto, o fato mais intrigante é que houve uma baixa suspeita clínica de leptospirose, pois a hemoptise maciça ocorreu sem icterícia e sem insuficiência renal concomitantes, levando a fatalidade 40 pacientes (Trevejo et al., 1998; Zaki & Shieh, 1996). Insuficiência respiratória fatal por leptospirose também tem sido descrita nas Ilhas União, na Austrália, ilhas Seychelles e no Peru (Simpson et al., 1998; Slack et al., 2006; Yersin et al., 2000; Segura et al., 2005).

No Brasil, uma mudança de padrão clínico da leptospirose também vem ocorrendo. Até a década de 1980, poucos casos de SPHS foram descritos no país, mas a partir da década de 1990, esta forma de apresentação da leptospirose grave é registrada com frequência em grandes cidades brasileiras (Gonçalves et al., 1967). No primeiro surto descrito de leptospirose na cidade do Rio de Janeiro em 1967, quatorze casos de doença de Weil foram confirmados, dentre os quais dois pacientes apresentaram hemoptise discreta e outros dois casos, choque cardiovascular. Mais recentemente, Silva et al (2002) descreveram quatro

casos de leptospirose com hemoculturas positivas, três dos quais faleceram com menos de 48 horas de internação por SPHS e ARDS. Abdulkader et al (2000) avaliaram retrospectivamente 110 casos de Leptospirose hospitalizados entre 1985 a 1996 em Fortaleza, Ceará, e encontraram uma maior frequência de manifestações pulmonares (dispnéia e crepitações pulmonares, porém sem SPHS) nos últimos anos do período de estudo (1995-1996) em relação ao período inicial (1985-1994). Em Salvador, uma série de 133 casos ocorridos em 1975 tinha menos de 20% dos pacientes com hemoptise, cuja apresentação foi discreta, sem causar insuficiência respiratória (Caldas & Sampaio, 1979). A partir de 2003, casos de SPHS são registrados em Salvador, porém a insuficiência renal ainda é principal causa de mortalidade por leptospirose na cidade (Ko et al., 1999; Gouveia et al., 2008). No Estado de São Paulo, registra-se o maior número de casos de SPHS do país, que surgem progressivamente ao longo dos anos 80, ocorrendo principalmente na capital, presente em 72% dos casos graves de doença de Weil hospitalizados, com taxa de letalidade global de 17% (Nicodemo et al., 1997; Romero et al., 2003; Spichler et al. 2008). Em outros estados, a ocorrência de SPHS é discreta. Como um exemplo de contraste na apresentação clínica da leptospirose dentro do país, no Rio Grande do Norte, 2.180 casos da enfermidade foram notificados entre 1985 e 2005, sem ocorrência de doença de Weil com SPHS ou choque (Lacerda et al., 2008).

3.6. Indicadores de mau prognóstico da Leptospirose grave

Os indicadores de mau prognóstico da leptospirose, associados de forma independente com desfecho letal, descritos na literatura mundial são: idade avançada, hipercalemia, oligúria, aumento da creatinina sérica, lesão pulmonar aguda, hemorragia pulmonar, hiperbilirrubinemia, hipotensão, arritmias e alteração do estado mental (Spichler et al., 2008). Como a ocorrência de leptospirose grave não tem um padrão de distribuição geográfica uniforme, os indicadores de gravidade devem ser conhecidos para cada região endêmica da doença, o que tem sido demonstrado em estudos epidemiológicos atuais no Brasil.

Em São Paulo, um estudo prospectivo de coorte determinou que os fatores associados com óbito hospitalar em pacientes com leptospirose e lesão pulmonar aguda, necessitando de ventilação mecânica foram: o choque, a creatinina sérica elevada (maior que 265,2 $\mu\text{mol/l}$) e potássio sérico elevado (maior que 4 $\mu\text{mol/l}$) (Marotto et al., 1999). Mais recentemente, Spichler et al (2008) determinaram os fatores de risco associados com o desfecho letal para todos os casos de leptospirose grave ocorridos na grande São Paulo entre 2004 e 2006, através de estudo caso-controle. Os fatores de risco são: oligúria, plaquetopenia, idade acima de 35 anos e o envolvimento pulmonar como o mais forte preditor de óbito.

Em Salvador, estudos demonstraram que a leptospirose tem uma apresentação clínica diferente em relação aos casos de São Paulo, com outros fatores de riscos associados com o óbito e SPHS de maior taxa de mortalidade. Ko et al (1999) determinaram que idade acima de 37 anos, insuficiência renal, insuficiência respiratória e principalmente, alteração do estado mental foram os fatores associados independentemente com óbito nas epidemias de leptospirose ocorridas nos anos 90 em Salvador. Como não há dados da análise de líquido ou de necropsia para esclarecer a importância de sintomas neurológicos na mortalidade desses casos, os autores sugeriram que as manifestações neurológicas decorreram de lesão direta do SNC pela *Leptospira*, ou como consequência das alterações tóxico-metabólicas da doença grave. Também, o mesmo grupo de pesquisadores evidenciou que um diagnóstico errôneo de Dengue protela a procura de assistência médica, infringindo ao caso de leptospirose um atraso no diagnóstico e na instituição da terapêutica adequada, possivelmente comprometendo o desfecho do paciente (Flannery et al., 2001). Sobre a SPHS em Salvador, Gouveia et al. (2008) conduziram um estudo prospectivo de base hospitalar, com busca ativa de complicações respiratórias nos casos de doença de Weil. A SPHS é descrita a partir do ano de 2003 com uma alta taxa de letalidade de 74%. Entre os achados mais interessantes deste estudo, encontra-se o fato de mulheres terem duas vezes maior chance de apresentar a SPHS, de 40% dos casos de SPHS apresentarem hemoptise maciça somente após a intubação oro traqueal e de haver casos de SPHS sem insuficiência renal (34%) ou sem icterícia

(15%) na avaliação médica inicial feita no pronto-socorro (Gouveia et al., 2008). Esses resultados reforçam as recomendações de manter-se uma alta suspeita clínica de leptospirose para casos de doença aguda febril com insuficiência respiratória em nosso meio, independente do sexo do paciente e mesmo quando não há na admissão hospitalar icterícia, disfunção renal ou hemoptise maciça. Também, deve-se considerar leptospirose no diagnóstico diferencial com outras doenças hemorrágicas febris (por exemplo, Dengue e Hantavirose), uma vez que estas podem apresentar um quadro clínico inicial muito semelhante e ocorrerem concomitantemente no mesmo espaço geográfico e período sazonal (Flannery et al., 2001; Bharti et al., 2003; Ko et al., 2009).

No Ceará, foi determinado por Daher et al (1999) que apenas a oligúria associou-se independentemente com o óbito de casos graves de leptospirose ocorridos na região, no período de 1984 a 1996. Após o ano de 1994, artralgia, desidratação, dispnéia e crepitações pulmonares foram mais freqüentes nesta casuística.

3.7. A resposta imune do hospedeiro na leptospirose

Apesar de a leptospirose ser uma doença infecciosa antiga, largamente distribuída no mundo e com taxas de mortalidade crescentes, pouco se sabe a respeito da resposta imune específica protetora do hospedeiro contra as leptospiros patogênicas. Durante décadas, o

conhecimento acerca desta resposta restringia-se apenas à imunidade humoral, porém nos últimos anos alguns avanços foram alcançados nos campos da imunidade inata e da imunidade adaptativa.

3.8. Imunidade inata

O primeiro estágio da infecção por leptospiros é caracterizado por invasão da barreira cutâneo-mucosa do hospedeiro e após alguns dias, disseminação sistêmica encontrando-se leptospiros no sangue e outros fluidos corporais. Isto significa que a leptospiros virulentas são capazes de evadir às primeiras linhas de defesa do organismo: a atividade do complemento e a fagocitose (Walport, 2001). Por um longo período, pouco se soube sobre o papel do complemento, neutrófilos e macrófagos na defesa ou na patogenia da leptospirose, sendo escassos os estudos *in vivo*. No entanto, progressos foram feitos nos últimos anos.

Sabe-se há décadas que a sensibilidade *in vitro* das leptospiros ao soro humano não imune é variável, sendo as cepas saprófitas sensíveis e as cepas patogênicas resistentes, sugerindo que leptospiros virulentas escapam do principal componente sérico da imunidade inata - o complemento (Johnson & Harris, 1967; Anderson & Johnson, 1968; Banfi et al., 1982; Cinco & Banfi, 1983). Entretanto, os mecanismos que permitem tal resistência só começaram a ser desvendados nos últimos cinco anos. Leptospiros patogênicas de resistência alta e intermediária ao soro humano

têm a capacidade de aderir inibidores solúveis do complemento à sua superfície, por meio de proteínas de membrana, evitando assim a opsonização e a formação do complexo de ataque à membrana celular. Meri et al. (2005) demonstraram que as cepas com resistência alta e intermediária agregam maior quantidade de inibidores da via alternativa do complemento (fator H e FHR-1) que as cepas sensíveis. Foi determinado que as proteínas de membrana externa das leptospiros LenA (LfhA) (Verma et al., 2006), Lsa24 (Barbosa et al., 2006) e LenB (Stevenson et al., 2007) ligam-se ao fator H, inibidor do complemento. Mais recentemente, Barbosa et al (2009) demonstraram que cepas virulentas de *Leptospira* isoladas de hamsters infectados agregam o C4BP (inibidor da via clássica) à superfície externa, prevenindo a clivagem de C4b e a deposição dos elementos finais C5 e C9 do complemento. A proteína LenA vem sendo considerada um alvo para o desenvolvimento de vacinas que inibam a sua ligação ao fator H, aumentando a suscetibilidade das leptospiros à ação do complemento. A figura 1 resume o papel do complemento na leptospirose.

Figura 1. **A** – Cepas saprófitas de *Leptospira* são suscetíveis à ação do componente C_3 do complemento, causando destruição de bactérias por formação do complexo de ataque à membrana. **B** – Cepas virulentas de leptospirosas evadem à ação destrutiva do complemento, pois agregam em sua superfície inibidores da via clássica (C4BPA), que inativam C4b, C5 e C9 e da via alternativa (Fator H e FHR-1, ancorados pelas proteínas LenA, LenB e Lsa24), que inativam o C3b. Em consequência, ocorre disseminação do agente no hospedeiro. O complemento está envolvido na patogenia de lesões da leptospirose como a SPHS (deposição de C3 ao longo da membrana alvéolo-capilar pulmonar) e IRA.

Quanto aos receptores de imunidade inata, o LPS da *Leptospira* inicia a ativação de células da imunidade por meio do receptor *Toll-like receptor* (TLR), que pode estar envolvido tanto na proteção, quanto na patogenia da doença ao ativar uma resposta inflamatória. Trabalhos realizados no início da década passada demonstraram que a ativação de células murinas e humanas via TLR pelo LPS de leptospiros é diferente da ativação pelo LPS de outras bactérias Gram-negativas. O LPS da *Leptospira* tem uma porção 1-metilfosfato que não é encontrada no lipídeo A de outras bactérias, gerando especificidade daquele para o TLR2. Ademais, existe um padrão de reconhecimento específico do LPS de leptospiros pelos TLR, dependendo da espécie animal. O LPS de leptospiros estimula macrófagos de humanos apenas pelo TLR2/TLR1, enquanto que em camundongos a ativação ocorre pelo TLR2 e pelo TLR4 (Werts et al., 2001; Nahori et al., 2005). O lipídeo A do LPS é reconhecido apenas em camundongos, exclusivamente pelo TLR4-MD₂, não causando ativação de macrófagos humanos (Que-Gewirth et al., 2004; Nahori et al., 2005). Esta especificidade de reconhecimento traduz-se em diferenças na suscetibilidade à leptospirose. O TLR4 é crucial para uma resposta Th1 eficaz contra leptospiros nos camundongos, tanto na infecção aguda letal quanto no controle da carga bacteriana tecidual na infecção crônica (Viriyakosol et al., 2006). A LipL32 e outras proteínas de membrana externa de leptospiros, ainda não determinadas, são reconhecidas pelos TLRs e estão implicadas na patogenia da nefrite intersticial da leptospirose. Estas proteínas ativam o TLR2 de células tubulares renais de camundongos, deflagrando a via do

NF κ B (com produção de TNF α e iNOS) e a via do MAPK (com secreção de MP-1 e MIP-2 para o recrutamento de neutrófilos) (Yang et al., 2006; Hung et al, 2006). Também, as OMPs de leptospiros induzem a fosforilação de p38 e NF κ B em células da microglia, com produção de citocinas inflamatórias e iNOS (Blasi et al., 2007). A Loa22 tem efeito citotóxico sobre células renais do túbulo proximal de ratos (células NRK52E) e induz nestas inflamações ao ativar e aumentar a expressão o TLR2, com produção subsequente de MCP-1, NOs, IL-1 β e IL-6 (Zhang et al., 2010). Concluindo, diferentes componentes das leptospiros podem ativar diferentes TLRs em diferentes órgãos, para respostas imunes variadas: clareamento da infecção ou inflamação intensa com disfunção orgânica.

Foi determinada recentemente em camundongos a ativação de linfócitos B e de linfócitos T por TLR e a resposta inflamatória resultantes por Chassin et al (2009). A produção de IgM anti-LPS pelas células B é dependente do TLR4, enquanto que a produção de IFN γ nos rins pelos linfócitos T e a produção de IFN γ no fígado são dependentes de TLR2 e TLR4. A inflamação linfocítica em órgãos vitais (fígado e rins) nos animais *Knockout* para TLR2 e TLR4 foi independente do MyD88, com morte dos mesmos. Estes dados sugerem que tanto TLR2 quanto TLR4 são essenciais no controle da infecção por leptospiros, porém a inflamação deflagrada por bactérias virulentas ocorre por vias de sinalização diferentes.

A figura 2 sintetiza os dados sobre os TLRs na leptospirose.

Figura 2. A - A ativação de células mononucleares humanas por leptospiros ocorre pela interação entre o LPS bacteriano com o TLR 2. **B** – Em camundongos existe um sinergismo entre o TLR2 e TLR4 para a ativação celular e para o controle da infecção aguda e crônica. O lipídeo A do LPS de leptospiros é reconhecido apenas pelo complexo TLR4/MD2 de células de camundongos. **C** – Nas células epiteliais do túbulo renal proximal de camundongos, OMPs de leptospiros interagem com o TLR2/TLR1 ativando as vias do NFκβ (com produção final de TNFα e iNOS) levando à inflamação. Igualmente, a via da MAPK é ativada (com produção final de MCP-1 e MIP-2) levando ao recrutamento de leucócitos.

A proteína ST₂ é um modulador dos TLRs e apresenta duas formas: a forma ancorada na membrana de células como fibroblastos, mastócitos, macrófagos e células Th2 e a forma solúvel, que atenua a sinalização via TLR4 e IL1r, induzindo à produção de citocinas antiinflamatórias, diminuindo a inflamação. Recentemente, foi determinado que a ST₂ na forma solúvel está em níveis aumentados em casos graves de leptospirose, associando-se com hemorragias graves e maior mortalidade (Wagenaar et al., 2009). Interessantemente, o sangue total e PBMC destes pacientes com leptospirose não produziram *in vitro* ST₂, quando estimulados com leptospiras virulentas vivas, sugerindo que a elevação sérica dessa proteína provém de células como endotélio e fibroblastos em tecidos lesionados.

As células *Natural killer* (células NK) exibem grande atividade bactericida contra bactérias Gram-positivas/negativas através de um mecanismo citotóxico lítico mediado por perforinas e pela produção de IFN γ . As interações entre leptospiras e células NK ainda são pouco conhecidas. Até o momento, sabe-se que a administração de FTS (Serum Thymic Factor) protege gerbilos da nefrite letal por leptospiras, devido a um aumento na atividade de células NK (Yukawa et al., 1994). Também, a cultura de PBMC de indivíduos sadios prolifera após estímulo com alta carga de *L. interrogans* virulenta graças às células TCD4+, células T $\gamma\delta$ + e células NK produtoras de IFN γ (Klimpel, 2003). Estudo recente de De Fost et al (2007) desenvolvido em pacientes com leptospirose mostrou que os níveis plasmáticos de

granzima B, IP-10 e Mig estão elevados, refletindo uma ativação dos linfócitos citotóxicos (células *Natural Killer*-NK e células T citotóxicas) a qual ocorre na fase precoce da resposta do hospedeiro. Mais estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para avaliar o papel de células citotóxicas e granzimas na patogênese e na mortalidade da leptospirose humana grave. A figura 3 demonstra os achados de literatura sobre células NK na leptospirose.

Figura 3. **A** - O hormônio FTS (Serum Thymic Factor) aumenta a citotoxicidade de células NK, quando administrado intraperitonealmente em gerbilos, protegendo-os da nefrite intersticial. **B** – *Leptospiras* virulentas estimulam a proliferação em cultura de células NK de PBMC humano e bovino. **C** – Pacientes com leptospirose têm níveis séricos de Granzima B, IP-10 e Mig aumentados na fase aguda da doença, refletindo um aumento da atividade citotóxica de células NK e TCD8+.

Quanto aos neutrófilos, estes não parecem ser um fator de defesa importante contra leptospiros patogênicas em indivíduos não imunes. Experimentos de Wang et al (1984) demonstraram que leptospiros virulentas quando incubadas com neutrófilos humanos podem aderir às células, mas não sofrem fagocitose, sobrevivendo no meio de cultura. A adesão de neutrófilos às células endoteliais foi avaliada em estudo realizado por Dobrina et al (1995). Os autores verificaram que estas células aderem ao endotélio vascular do cordão umbilical humano após adição de leptospiros ao meio de cultura, de forma dose-dependente e influenciada pelo peptidoglicano da parede celular da bactéria. A adesão é inibida pela adição de polimixina B e pode ser prevenida por anticorpos monoclonais contra o complexo CD11/CD18 e contra ELAM-1 expressos no endotélio. Esse estudo aponta para a participação dos neutrófilos na patogenia das alterações vasculares da leptospirose, porém sua ação direta sobre as células endoteliais não foi ainda demonstrado.

A adesão e a invasão celular por leptospiros são propriedades inerentes às cepas virulentas, ausentes na *L. biflexa*. Em macrófagos, esses mecanismos de virulência foram primeiramente demonstradas por Merien et al. (1997), utilizando técnicas de imunofluorescência. A fagocitose e destruição de leptospiros por macrófagos não são mecanismos de defesa eficientes no início da infecção em indivíduos não imunes, ocorrendo somente na presença de anticorpos específicos opsonisantes (Tu et al., 1982; Wang et al., 1984) e apenas após longo período de contato entre as

células (após duas horas) (Cinco et al., 1981). Recentemente, Li et al. (2007), por meio de coloração de prata e microscopia eletrônica, demonstraram que cepas altamente virulentas de *L. interrogans* aderem aos macrófagos e fibroblastos, pela porção terminal, levando à fagocitose. Em seguida, essas células sofrem apoptose e, principalmente, necrose. Em uma segunda investigação, Li et al. (2010) observaram que após invasão de macrófagos, o destino citoplasmático de leptospiros virulentas diferiu entre humanos e camundongos. Em macrófagos murinos, as leptospiros encontraram-se em fagossomas co-localizados com o LAMP-1, com morte das bactérias por hidrolases. No homem, as leptospiros estão livres no citosol e não se localizam com o LAMP-1, ocorrendo aumento progressivo do número de bactérias intracelulares e de apoptose celular proporcional ao tempo de contato no meio de cultura. Estes dados sobre a ação fagocítica de macrófagos explicam, em parte, a suscetibilidade ou resistência à infecção pela *Leptospira* entre diferentes hospedeiros e que a apoptose de macrófagos pode ser um mecanismo de evasão de cepas virulentas de leptospiros ao sistema imune humano.

Sobre a função das células dendríticas (CD) na leptospirose, foi realizado recentemente um estudo por Gaudart et al (2008), no qual a adesão da *Leptospira interrogans* com a CD *in vitro* ocorre através do receptor DC-SIGN, um receptor lecitina tipo-C, que reconhece antígenos de carboidratos ricos em manose e fucose na superfície celular de vários patógenos, entre eles leptospiros. Esta interação é serovar dependente e ocorre tanto com leptospiros íntegras, quanto com os seus antígenos

secretados, resultando em maturação da CD, com grande produção de citocinas do perfil Th1 (TNF α e IL-12p70) e pouca produção de IL-10. Os prováveis receptores de membrana celular envolvidos na ativação da CD já foram estudados em células mononucleares do sangue periférico de casos humanos e em modelos experimentais de leptospirose, sendo verificado que os TLR2 e TLR4 participam da ativação dessas células (Netea et al., 2004; Werts et al., 2001; Nahori et al., 2005; Viryakosol et al., 2006). Entretanto, ainda não foi demonstrado o intercâmbio (*cross-talk*) entre as vias de sinalização dos DC-SIGN e TLRs durante a sensibilização e reconhecimento de leptospirosas pelas CD como nos moldes evidenciados por Van Kooyk & Geijtenbeek (2003), para bactérias Gram-negativas. A figura 4 esquematiza as funções de macrófagos e células dendríticas na leptospirose.

Figura 4. A – *Leptospiras virulentas* aderem e invadem macrófagos do hospedeiro. Em camundongos resistentes as leptospiros sofrem a ação de hidrolases nos fagossomas co-localizados com o LAMP-1. Células J774A1 em cultura, após contato com alta carga de leptospiros sofrem necrose e apoptose por ativação da via FADD/caspase-8/caspase-6/ caspase-3, com clivagem de PARP e laminina A e C. **B** – Em macrófagos humanos, leptospiros virulentas, após a adesão e invasão, são encontradas livres no citosol e no núcleo da célula sem associar-se a fagossomas, induzindo a morte celular por necrose ou apoptose. **C** – *Leptospiras virulentas* interagem com células dendríticas via receptor DC-SIGN, levando à ativação celular com produção de citocinas Th1 (IL-12 e TNF- α).

3.9. Complexo de histocompatibilidade e leptospirose

Os estudos que avaliam o papel do MHC na leptospirose humana e experimental são recentes. Sabia-se que leptospiros encontravam-se no interior de macrófagos, degradadas, sugerindo que ocorria o processamento de antígenos da bactéria pelo MHC II (Zaki et al, 1998). A primeira associação entre leptospirose e HLA vem de um estudo epidemiológico, sobre o surto da doença ocorrido em um lago de Springfield, EUA, durante provas de triatlo em 1998. Os triatletas positivos para o HLA-DQ6 tiveram um risco aumentado para leptospirose confirmada, em comparação com aqueles negativos. O risco de infecção foi ainda maior entre os atletas DQ6 positivos que ingeriram água contaminada do lago (OR = 8,96, $P \leq 0,001$). Não foram achados entre os casos polimorfismos para os alelos de TNF- α . Este estudo tem grande importância, pois é o primeiro relato de suscetibilidade associada a fatores genéticos na leptospirose, predispondo à doença sintomática, como também é o primeiro relato na literatura médica onde a associação de um fator ambiental com um fator genético afeta a aquisição de uma doença infecciosa (Lingappa et al., 2004).

Nos Açores, Portugal, mutações de alelos foram demonstradas em 64 casos de leptospirose humana (Fialho et al., 2009). No HLA classe I o haplótipo A*01-B*08-CW*07 e polimorfismo de um nucleotídeo nos genes da IL-4 e IL-4 α tiveram uma frequência maior nos casos de leptospirose que em

relação aos controles. Não houve associação do HLA classe II e dos genes KIR (*Killer-cell immunoglobulin-like receptors*). Provavelmente, estas mutações predisõem à leptospirose, pois o haplótipo A*01-B*08-CW*07 está associado com níveis baixos de IgG2, que é o principal anticorpo anti-LPS, com maior poder de opsonização e indução de fagocitose. Como discutido anteriormente, no gado efetivamente vacinado para o serovar Hardjo, a imunoproteção foi associada com anticorpos IgG2 induzidos por uma resposta Th1, através do IFN γ (Naiman et al., 2001 e 2002).

Quanto aos antígenos imunogênicos específicos de leptospirosas reativos com moléculas de HLA, foi determinado recentemente por Guo et al (2010) que a molécula HLA-A*0201 de células TCD8+ citotóxicas de camundongos e pacientes com leptospirose moderada reagem com o epítipo LigA₃₀₅₋₃₁₃. Esse dado, reitera a importância das células TCD8+ na imunidade anti-leptospirosas, como previamente demonstrado por Pereira et al (1998).

Ainda não se sabe quanto à participação do MHC II na intensidade da resposta inflamatória da leptospirose humana. No entanto, um estudo experimental recente demonstrou que porcos infectados com *L. interrogans* virulenta têm uma expressão aumentada de MHCII em linfócitos e histiócitos presentes no infiltrado das lesões renais. Também, o MHCII apresentou uma expressão aumentada no epitélio tubular em regeneração, sugerindo um papel no controle da colonização bacteriana, após a fase aguda da infecção (Radaelli et al., 2009).

Não há dados ainda sobre o papel do HLA na leptospirose com SPHS e choque, e há muito a esclarecer sobre o papel do MHCII na imunidade e na patogenia da doença.

3.10. Imunidade humoral na Leptospirose

Anticorpos aglutinantes e opsonizantes são importantes para a concretização da resposta imune contra microorganismos extracelulares. Dessa forma, os primeiros estudos da imunidade do hospedeiro anti-*Leptospira*, realizados nas décadas de 70 e 80, enfocavam a imunidade humoral e o papel dos anticorpos anti-LPS como os principais efetores dessa resposta. No entanto, este paradigma vem sendo revisto nos últimos anos, por meio de estudos que evidenciam a importância de células da imunidade celular para a indução e manutenção da resposta humoral (Naiman et al., 2001 e 2002).

Os anticorpos anti-LPS de leptospirosas são opsonisantes, aglutinantes e a transferência destes confere proteção passiva na infecção experimental por leptospirosas (Adler & Faine, 1976 e 1977). No homem, anticorpos tipo IgM aparecem a partir do terceiro dia de sintomas, anticorpos IgA a partir do quinto ao nono dia e anticorpos IgG a partir da segunda semana dos sintomas (Adler, 1978). A imunidade humoral anti-leptospira é serovar específica (Adler & Faine, 1977). Ainda não está determinado se

anticorpos contra outros antígenos da leptospira, como as proteínas Loa22, LipL32 e proteínas da família Lig, conferem proteção contra a infecção.

Em estudos pioneiros da imunidade anti-*Leptospira*, Adler e Faine (1976, 1977 e 1978) demonstraram que a resposta humoral é essencial em experimentos com camundongos, e uma vez suprimindo as células B (com ciclofosfamida administrada antes da infecção) a produção de anticorpos não se forma, tornando-os suscetíveis. Por outro lado, animais tratados com imunossupressores são protegidos da doença letal ao receberem esplenócitos ou anticorpos específicos.

É possível que a imunidade humoral também esteja envolvida na imunopatogenia da leptospirose. Assim sendo, Abdulkader et al. (2002) encontraram em pacientes com leptospirose grave uma resposta de anticorpos IgG intensa (títulos acima de $> 1:400$), duradoura (acima de 9 meses) e de maior avidéz ao antígeno LPS. Esses pacientes tiveram febre mais prolongada e maior freqüência de envolvimento renal e pulmonar (porém sem SPHS) que aqueles com baixos títulos do anticorpo. Apesar de não se saber qual o subtipo de IgG envolvido nestes casos graves, uma maior avidéz de anticorpos IgG sugeriu reinfecção, a qual seria responsável por uma resposta humoral intensa, inclusive com possível produção de auto-anticorpos. Esta hipótese é uma pergunta chave, ainda sem resposta, cuja solução é importante para o entendimento não só dos mecanismos de lesão da doença, mas também para a epidemiologia e história natural da leptospirose grave, principalmente em áreas endêmicas, onde populações sofrem periódicas exposições ao agente no meio contaminado. A coorte de

leptospirose, conduzida na favela Pau-da-Lima em Salvador, Bahia, tem como um dos objetivos responder esta questão (se casos graves estão associados ou não à reinfecção) através de inquéritos sorológicos periódicos (Maciel et al., 2008).

A ocorrência de auto-anticorpos tem sido relatada na literatura da leptospirose por diversos autores. Como em outras infecções por espiroquetas, na leptospirose ocorre a produção de anticorpos anticardiolipina que reagem contra o endotélio vascular e outras membranas celulares, produzindo efeitos patológicos diretos. Rugman et al (1991) demonstraram que dentre 16 pacientes com leptospirose, 8 apresentavam altos títulos de IgG-anticardiolipina, associados a complicações como sufusão conjuntival, bloqueio cardíaco, miocardite, convulsões, miosite, insuficiência renal e hepatite, coincidindo com a chamada “fase imune” da doença. Santiago et al. (2001) demonstraram uma ocorrência de 23% de IgG anti-fosfolípide e 10% de IgM anti-fosfolípide durante a fase aguda da Leptospirose. Ainda não se sabe como estes anticorpos surgem na leptospirose, como também não há estudos específicos que investiguem o papel destes anticorpos na patogenia desta doença. Possíveis hipóteses seriam: a bactéria causaria injúria vascular direta com exposição de antígenos ou ocorreriam mudanças na conformação dos fosfolípidos hexagonais da superfície celular do agente, induzindo aumento de anticorpos anti-cardiolipina (Hugman et al. 1991). Outras associações entre lesões de órgãos e auto-anticorpos na leptospirose são a uveíte, com os anticorpos anti-LruA e anti-LruB (Verma et al., 2008) e a SPHS, pela

deposição de anticorpos IgG ao longo da membrana alveolar pulmonar (Nally et al., 2005; Croda et al, 2009). A figura 5 sintetiza o papel da imunidade humoral na imunidade e na patogenia da leptospirose.

Figura 5. **A** – Anticorpos aglutinantes opsonizam leptospiplas, facilitando a fagocitose de macrófagos em hospedeiros imunes. **B** – Uma resposta humoral intensa com títulos de IgG > 1/800 e de alta avidéz associa-se com doença de Weil com acometimento pulmonar e sugere reinfeção. **C** – Auto-anticorpos são detectados na leptospirose: anticorpos anticardiolipina, antifosfolípides e anti-trato uveal. Depósito de IgG é encontrado ao longo da membrana alvéolo-capilar pulmonar, sugerindo que anticorpos mediam um mecanismo auto-imune na SPHS. **D** – Camundongos tornam-se suscetíveis à infecção por leptospiplas após a quimioablação de células B por ciclofosfamida, com ausência de produção de anticorpos específicos.

3.11. Citocinas e imunidade celular adaptativa na leptospirose

Estudos realizados na última década trouxeram luz à importância da imunidade celular na leptospirose. Entretanto, o papel da resposta celular adquirida na defesa do hospedeiro, como também na patogenia das lesões de órgãos, ainda não é totalmente compreendido.

Os poucos estudos que avaliam o papel de células adaptativas e citocinas na imunidade anti-*Leptospira* sinalizam para o fato de uma resposta Th1 ser ativada na fase precoce de um estímulo com leptospiras (*in vitro* ou em modelos experimentais), produzindo uma resposta inflamatória. Os componentes das leptospiras que estimulam a resposta pró-inflamatória ainda não foram totalmente investigados. No entanto, sabe-se que a glicoproteína (GLP) de membrana externa de *L. interrogans* Copenhageni virulenta, ao estimular de forma dose-dependente a cultura de PBMC humano, induz aumento da expressão de CD69 em monócitos e linfócitos, aumento de expressão de HLA-DR em monócitos, e secreção aumentada de IL-6, TNF α (precocemente) e IL-10 (tardamente) (Diament et al., 2002; Dorigatti et al., 2005). A LipL32 induz nas células do epitélio renal a ativação do NF κ B com secreção de TNF α , MCP-1 e óxido nítrico, indicando que a resposta Th1 está envolvida na nefrite túbulo-intersticial da leptospirose (Yang et al., 2002, 2006 e 2007). Ainda falta demonstrar o tipo de resposta inflamatória (células e citocinas envolvidas) induzido por novas proteínas de

membrana externa, como a Loa22 e outras, o que constitui uma questão fundamental para o desenvolvimento de novas vacinas para prevenir a leptospirose.

Sobre a cinética de citocinas na leptospirose, foi demonstrado em modelo de *hamsters* por Vernel-Pauillac & Merien (2006), que as células mononucleares do sangue periférico dos animais infectados secretam citocinas pró-inflamatória (TNF α) e do perfil Th1 (IL-12) na primeira hora pós-infecção, predominando até o quarto dia pós infecção, enquanto que o perfil Th2 aparece mais tardiamente, após 24 horas da infecção. Neste modelo houve infecção grave, que mimetiza a leptospirose de humanos com icterícia, hemorragias, hepatopatia e nefrite. Outros grupos de pesquisa confirmam este achado em que a resposta Th1 é precoce e a Th2 tardia, através de modelos de nefrite intersticial e hemorragia pulmonar em hamsteres por leptospirose. No tecido renal, a expressão de RNAm é aumentada para TNF α , TGF β e IP-10 (fator quimiotático para linfócitos) desde o terceiro dia pós infecção, enquanto que o aumento da expressão de IL-10 ocorre mais tardiamente, a partir do quinto dia do experimento (Lowanitchapat, 2009). No pulmão de hamsteres infectados com *L. interrogans*, Marinho et al. (2009) demonstraram que a hemorragia pulmonar maciça acompanha-se de alta expressão gênica (RNAm) *in situ* de TNF α (pico precoce), IL-10 (aumentada até o 28º dia de experimento) e eNOS.

Os estudos avaliando a importância das citocinas Th1 no controle de lesões/cura ou na patogênese de lesões ainda são escassos, tanto em humanos quanto na leptospirose experimental. Do ponto de vista

da proteção da resposta Th1, existem algumas evidências. Alguns estudos em gado bovino vacinado para leptospirose trouxeram à tona nos últimos anos a importância da imunidade celular tipo Th1, para a manutenção da resposta humoral eficaz anti-leptospiras. As PBMC obtidas do gado imunizado com vacina com cepa monovalente de *L. borgpetersenii* serovar Hardjo, quando estimuladas por leptospiras, produzem uma potente resposta Th1, com grande produção de IFN- γ secretado principalmente por células T $\gamma\delta$ e por células TCD4+ (Naiman et al., 2001 e 2002). Essa resposta Th1 com produção de IFN- γ leva a produção anticorpos IgG1 de maior poder de opsonização e fagocitose de bactérias (Delves & Roitt, 2000a e 2000b). A produção de IFN γ parece ser dependente de IL-12p40, como demonstrado em sangue total humano, após estímulo com leptospiras inativadas por De Fost et al (2003).

É possível que existam efeitos redundantes entre diferentes citocinas para o controle da infecção por leptospiras. Em um estudo atual, demonstrou-se que camundongos C57BL/6 *knockouts* para TNF α , IFN γ e IL-4 ao serem infectados por leptospira patogênica, a mortalidade destes não é diferente dos animais controles, sugerindo que a deficiência individual de cada uma dessas citocinas, neste modelo, não influencia a mortalidade. No entanto, a deficiência de TNF α em camundongos neste experimento leva a uma lesão renal mais acentuada durante a convalescência, indicando que essa citocina é essencial no controle da lesão renal da leptospirose (Athanzio et al., 2008). Ainda são necessárias mais pesquisas para

determinar as citocinas essenciais envolvidas na patogenia e cura da leptospirose grave, humana e experimental.

Como contraste, uma resposta Th1 também pode ser deletéria quando em excesso. À semelhança do que ocorre no choque séptico causado por bactérias Gram-positivas/-negativas, altos níveis séricos de TNF α em pacientes com leptospirose grave correlacionam-se com insuficiência renal e maior mortalidade (Estavoyer et al., 1991; Tajiki & Salomão, 1996). No entanto, uma relação IL-10/TNF α alta correlaciona-se com um melhor prognóstico na leptospirose humana, refletindo uma resposta inflamatória menos exacerbada, com menor comprometimento renal e pulmonar (Tajiki et al., 1996). Esses resultados sugerem que deve existir um fino equilíbrio entre a resposta Th1 e Th2 para a manutenção da fisiologia do hospedeiro infectado.

No tocante à resposta Th2, essa é tardia na leptospirose experimental, prevalecendo nos momentos finais dos experimentos (Verneil-Pauillac & Merien, 2006; Lowanitchpat et al., 2009; Marinho et al., 2009). A resposta Th2 associa-se também com insuficiência renal, devido a um aumento da síntese de matriz extracelular, como demonstrado por Tian et al (2006) em que a *L. santarosai* serovar Shemani induz a um aumento do TGF β , colágeno tipo I e IV nos túbulos renais proximais.

As vias de sinalização para a produção de citocinas nas células mononucleares, o papel de polimorfismos genéticos para receptores da imunidade inata e para genes determinantes de citocinas ainda não estão

totalmente esclarecidos na leptospirose, principalmente em casos graves. No surto de Leptospirose em Springfield, EUA polimorfismos em alelos de TNF α não foram encontrados entre os atletas que adoeceram (Lingappa et al., 2004). Na nefrite intersticial de camundongo, células tubulares renais interagem via TLR2/1 com OMPs e LipL32 de leptospiros, levando à ativação das vias do NF κ B e da MAPK quinases, com produção subsequente de TNF α , iNOS e quimiocinas (Yang et al., 2002 e 2006; Hung et al, 2006). A melhor caracterização dessa resposta do hospedeiro pode fornecer ferramentas para o entendimento da resistência à infecção em animais carreadores e da susceptibilidade à infecção em humanos.

Quanto às células imunes, pouco se sabe sobre as que são reais efetoras da resposta imune protetora ou as que são envolvidas na patogenia de lesões. Como foi abordado anteriormente, macrófagos e neutrófilos são ativos contra cepas virulentas somente na presença de anticorpos no soro e células NK parecem exercer citotoxicidade contra leptospiros na fase inicial da doença humana (De Fost et al., 2007). Através dos estudos de vacinas em gado bovino, células T γ δ ⁺ produtoras de IFN γ também podem ser candidatas a efetoras na imunidade anti-*Leptospira* (Naiman et al., 2001 e 2002). Em estudo *ex-vivo* com PBMC de voluntários normais, as células T γ δ ⁺ respondem ao estímulo com leptospiros vivos. A cultura de PBMC humanas prolifera graças às células T α β (com baixa carga de leptospiros) e células T γ δ (com alta carga de leptospiros), produzindo TNF α e IFN- γ . Interessante notar que as células T γ δ reconhecem leptospiros sem processamento de antígenos ou sem células apresentadoras de

antígenos, sugerindo que antígenos da bactéria agem como superantígenos (Klimpel et al., 2001). Estudos com PBMC humano e um relato de caso de leptospirose humano, demonstram expansão de células $T\gamma\delta^+$ frente ao estímulo ou infecção por leptospiras. Ocorreu em um caso, com recuperação da contagem de linfócitos na convalescência e novo aumento destas células na recidiva dos sintomas (Barry et al., 2006).

Quanto às células T helper e T citotóxicas, poucos estudos são disponíveis os quais as apontam como essenciais no controle da infecção, prevenindo lesões e que a disfunção dessas células está associada a quadros mais graves. O comportamento dos subtipos de linfócitos na leptospirose grave foi primeiramente avaliado por Kanashiro-Yamashiro et al (1991). A cultura de PBMC de pacientes com leptospirose grave (porém sem SPHS) apresentou alto número de células B, mas baixo número e pouca proliferação de células $TCR3^+$ e $TCR4^+$. Os autores verificaram que essa disfunção das células T é revertida durante a convalescência e que o soro de pacientes com leptospirose exerce um efeito inibitório na cultura de células de indivíduos saudáveis. Em estudo efetuado por Pereira et al. (1998) demonstrou-se que camundongos neonatos e jovens infectados com cepa de *L. interrogans* virulenta apresentavam lesões histológicas mais graves nos rins e pulmões, após tratamento com anticorpos monoclonais anti- $CD4^+$ e/ou anti- $CD8^+$. Recentemente, foi determinado que há células $TCR8^+$ citotóxica específicas contra o epítipo $LigA_{305-313}$ em pacientes com leptospirose (Guo et al., 2010).

Quanto à função de células TCD4+, células TCD8+ e células T regulatórias na leptospirose com SPHS, não se encontram dados disponíveis na literatura nacional e inglesa, até o momento.

A resposta imune celular de memória na leptospirose foi estudada até o momento por Tuero et al. (2010) em cultura de PBMC de casos provenientes de favela do Peru, que se recuperaram da doença. Nesta pesquisa, não se encontrou resposta das PBMC após estímulo com um *pool* antígenos específicos de leptospiras virulentas como a LipL32 e OMPs. Também, o estímulo com diferentes cepas de leptospiras induziu resultados semelhantes entre ex-pacientes e controles (proliferação, expansão de células T $\alpha\beta$ + e T $\gamma\delta$ + e produção de TNF α e IFN γ), com exceção da produção de IL-10, que foi menor nos ex-casos de leptospirose. Os autores comentaram que a estimulação, proliferação e ativação de PBMC semelhante entre casos e controles e a falta de especificidade da resposta de ex-pacientes com antígenos específicos sugerem o efeito de superantígenos presentes nas leptospiras, ainda não conhecidos. A figura 6 demonstra o papel da imunidade celular na leptospirose.

Figura 6. A resposta imune anti-*Leptospira* é do tipo Th1. **A** – Camundongos *knockouts* para $TNF-\alpha$ têm nefrite intersticial mais intensa que os controles, indicando que esta citocina é essencial para o controle de lesões. **B** – *In vitro*, células mononucleares em contato com leptospiros ou com seus antígenos produzem citocinas Th1. A cultura de PBMC de bovinos vacinados, em contato com leptospiros virulentas, apresenta uma resposta proliferativa às custas de células T $CD4^+$, $T\gamma\delta^+$ e NK, com grande produção de IFN γ . As PBMC em cultura de indivíduos sadios proliferam com a adição de GLP e leptospiros. GLP induz aumento da expressão de HLA-DQ6 e secreção de IL-6, $TNF\alpha$, IFN- γ , IL-12p40. Leptospiros intactas induzem proliferação de T $CD4^+$, $T\gamma\delta^+$, $T\alpha\beta^+$ e NK produtoras de IFN γ . **C** – Pacientes com altos níveis séricos de $TNF-\alpha$ e NO têm maior morbidade e mortalidade que aqueles com níveis baixos, refletindo uma resposta inflamatória exacerbada. **D** - Disfunção de células da imunidade adaptativa associa-se a lesões graves na leptospirose. Em humanos, casos graves têm diminuição do número e da resposta proliferativa de células T $CD4^+$, com recuperação destes parâmetros na convalescência. Em camundongos, a quimioablação de células T $CD4^+$ e/ou T $CD8^+$ associa-se a lesões pulmonares e renais mais graves.

3.12. A apoptose na leptospirose

Até o momento a apoptose na patogenia da leptospirose foi avaliada em poucos estudos experimentais e *in vitro*, permanecendo ainda desconhecido o real papel deste mecanismo de morte celular na patogenia da leptospirose humana grave. No entanto, a apoptose parece ser uma linha de interesse para alguns grupos de pesquisa, principalmente em macrófagos.

Merien et al. (1997) descreveram primeiramente a apoptose na leptospirose, ao demonstrar que cobaias infectadas por *L. interrogans* virulenta apresentam significativa apoptose de hepatócitos, aferida pela técnica de TUNEL. A apoptose ocorreu principalmente após 48 horas de infecção, numa fase precoce, com pouca quantidade de leptospiros e leve reação inflamatória no órgão. Estes achados sugerem que a apoptose pode ser um meio de evasão das leptospiros amortecendo a sinalização do sistema imune, diminuindo o recrutamento celular inflamatório para o órgão e permitindo a disseminação sistêmica da bactéria. Neste experimento, outros órgãos (rins, pulmões, coração e baço) não apresentaram apoptose significativa.

A apoptose de macrófagos por leptospiros virulentas foi recentemente demonstrada em células de murinos (J774A1), nas quais ocorre aumento da regulação do FasL/Fas e ativação da via FADD/caspase

8/caspase 3, sem associação com ativação da citocromo c e caspase 9 (Li et al., 2005; Li et al., 2008; Jin et al., 2009).

A imunomodulação da resposta imune do hospedeiro, através de tratamento com imunossupressores vem sendo estudada tanto na leptospirose experimental quanto na humana com o intuito de diminuir as lesões que levam à insuficiência de órgãos vitais durante a doença. Estes estudos, que serão discutidos adiante, têm resultados promissores.

3.13. Diagnóstico da Leptospirose

O diagnóstico da leptospirose é feito através de métodos que demonstrem o agente em fluidos e/ou tecidos (cultura, métodos histoquímicos, imuno-histoquímicos ou presença de DNA do agente) ou por meio de sorologia (Levett, 2001; Bharti et al., 2003; Ko et al., 2009).

Nos casos graves, achados laboratoriais característicos, mas não específicos, podem sugerir leptospirose. O hemograma geralmente mostra leucocitose com desvio à esquerda e plaquetopenia. A função renal está alterada com aumento de uréia e creatinina séricos, porém com hipocalemia. Hipercalemia ocorre quando a necrose tubular está instalada (Seguro et al., 1990; Sitiprija et al., 2006). As enzimas canaliculares estão aumentadas, sobretudo a bilirrubina direta e fosfatase alcalina. Ocorre aumento discreto ou moderado das transaminases pela ausência de necrose

em hepatócitos (Arean, 1962). A creatina fosfoquinase sérica é aumentada devido à rabdomiólise, como também a amilase sérica por pancreatite (Uip et al., 1992; Spichler et al., 2005) . O líquido pode demonstrar discreto aumento de proteínas com aumento de linfócitos e glicorraquia normal. A uroanálise demonstra proteinúria, piúria, hematúria macroscópica, aumento de urobilinogênio e cilindros granulosos e hialinos (Seguro et al., 1990; Sitiprija, 2006) .

A microscopia de campo escuro de amostras de urina ou sangue para a visualização de leptospiros não é recomendada pela alta chance de diagnósticos falso-positivos e falso-negativos (Faine et al., 1999).

A cultura de leptospira pode ser feita com amostras de sangue e líquido (coletadas entre o sétimo a décimo dia de doença) ou urina (coletadas na segunda ou terceira semanas de doença) e tem baixa sensibilidade. A coleta de sangue ou líquido deve ser feita com heparina ou oxalato de sódio e o transporte da amostra deve ser feito em ar ambiente, nunca sob congelação (Wolf, 1954). A inoculação da amostra deve ser feita dentro de 24 horas. A cultura, por apresentar dificuldades técnicas para realizá-la, é feita em laboratórios especializados. O período de incubação da amostra é longo e mesmo sob as melhores condições, uma cultura somente pode ser considerada negativa após 6-8 semanas, no mínimo, ou após quatro meses, de preferência. O meio de cultura para leptospiros é disponível em poucos laboratórios e é feito com soro de coelho a 10% ou 1% de albumina bovina, mais ácidos graxos de cadeia longa, em pH 6,8-7,4, a 28-30°C. A cultura deve ser examinada após 3-4 dias para verificar se há

bactérias contaminantes e repicada após 7-21 dias (Palmer & Zochowski, 2000). Antibióticos seletivos são adicionados ao meio, como 5-fluoracil, sulfato de neomicina, polimixina B, rifampicina e vancomicina (Ellis & Michna, 1976).

O diagnóstico baseado na PCR pode demonstrar a presença de material genético do agente mesmo naqueles que já receberam doses de antibióticos, porém ainda não é disponível em larga escala. A PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR), usando o sistema TaqMan polimerase, já foi estudada em amostras clínicas e ambientais, com boa sensibilidade e especificidade, podendo diferenciar cepas patogênicas e não patogênicas (Smythe et al., 2002; Levett et al. 2005). A PCR quantitativa pode determinar a carga de bactérias infectantes, sugerindo uma evolução grave, porém faltam grandes estudos multicêntricos avaliando esta relação como fator prognóstico (Truccolo et al., 2001; Segura et al., 2005).

Os métodos sorológicos são os mais empregados para firmar o diagnóstico de leptospirose, sendo a microaglutinação microscópica (MAT) o teste padrão pela alta sensibilidade (92%) e especificidade (95%) (Cole et al., 1973; Cumberland, et al., 1999). A MAT é realizada apenas em alguns laboratórios de referência. Um resultado positivo do MAT é determinado quando corre um aumento de quatro vezes nos títulos da segunda amostra de soro, colhida após duas/três semanas de intervalo ou quando ocorre a conversão de uma amostra negativa para uma segunda amostra com títulos maiores ou iguais que 1/100 (Bharti et al., 2003). Outros métodos sorológicos como imunofluorescência, ELISA e Western-Blot podem ser

empregados, apesar de uma sensibilidade menor que o MAT, mas com a vantagem de serem fáceis de realizar. Em nosso meio, o ELISA é o mais comumente empregado, utilizando antígeno total da leptospira para detecção de anticorpos do tipo IgM (Romero et al., 2003; Macbride et al., 2007).

O método imunohistoquímico pode ser utilizado para a identificação de antígenos de leptospiros nos tecidos fixados em parafina. Utiliza-se anticorpo primário anti-*Leptospira* obtido de coelho imunizado com antígeno de *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. O complexo peroxidase/anti-peroxidase é utilizado para a obtenção de marcação colorida no tecido (Alves et al., 1986).

Apesar da utilização de métodos e critérios simples, o grande entrave para efetuar o diagnóstico de leptospirose ainda é a baixa suspeita clínica que acarreta um grande número de casos não identificados (Vinetz et al., 2003).

3.14. Terapia para a Leptospirose grave e novas intervenções

O tratamento clássico da leptospirose consiste em antibioticoterapia específica, reposição de fluidos, correção dos distúrbios hidroeletrólíticos como a hipopotassemia e analgesia para as dores musculares. Casos graves, com doença de Weil, necessitam de terapia

dialítica para tratamento da uremia e ventilação mecânica para os casos com insuficiência respiratória (Amato et al., 1998; Andrade et al., 2007).

O tratamento antibiótico da leptospirose é feito com Penicilina cristalina ou ampicilina via intravenosa para casos graves. Doxiciclina, ampicilina e amoxicilina podem ser prescritas para casos leves e moderados (Bharti et al., 2003; Ko et al., 2009). Uma revisão sistemática sobre antibióticos na leptospirose, publicada por Guidugli et al (2000) no *The Cochrane Library*, chamou atenção da comunidade médica pela ausência de benefícios concretos dessa modalidade de tratamento, não demonstrando redução na mortalidade, na duração da internação hospitalar, no período de defervescência e na leptospirúria em comparação com o tratamento placebo (Guidigli et al., 2000). No entanto, os próprios autores indicam o tratamento, ressaltando que a incerteza do benefício da antibioticoterapia pode ter decorrido do pequeno número de estudos incluídos na meta-análise (apenas três *trials* randomizados) e com poucos pacientes (150 casos). Essa conduta – a prescrição de antibióticos - parece ser global, mesmo porque há baixa possibilidade de efeitos colaterais com penicilina ou doxiciclina (MacClain et al., 1984; Edwards et al., 1988; Watt et al., 1988; Vinetz et al., 2003). Para dar suporte fisiopatológico à opção de tratar com antibióticos, um estudo recente realizado em nosso meio demonstrou que as alterações (baixa expressão) dos transportadores tubulares NHE3 e NKCC2 nos rins de hamsteres infectados com *L. interrogans* virulenta é revertida com o tratamento precoce ou tardio com ampicilina (Spichler et al., 2007).

Estudos de sensibilidade *in vitro* demonstram que o Ceftriaxone tem atividade bactericida contra a *Leptospira* (*L. interrogans bataviae* e *L. interrogans icterohaemorrhagiae*), com MIC $<0,06\mu\text{g/ml}$, sendo uma alternativa terapêutica à penicilina cristalina (Ressner et al., 2008). O Ceftriaxone é uma opção de tratamento mais segura quando ao internar-se um paciente suspeito de ter leptospirose, consideram-se outros diagnósticos como broncopneumonia, infecção urinária, colangite e outras infecções graves. Panaphut et al (2003) cols na Tailândia demonstraram equivalência entre Ceftriaxone e Penicilina cristalina IV quanto à duração da febre (duração média de 3 dias) e quanto à duração da disfunção de órgãos, em estudo randomizado aberto incluindo 173 casos de leptospirose grave (icterícia e insuficiência renal). Como vantagens: o ceftriaxone não necessita de ajuste renal, tem menor carga de sódio, induz poucas reações alérgicas e possibilita menor número de doses ao dia (dose única ou em duas vezes ao dia), tornando o custo da terapia IV por sete dias, equivalente ao custo com penicilina (Friedland & Warrell, 1991; Emmanouilides et al., 1994). A Doxiciclina apresenta ação bactericida superior ao Ceftriaxone, é o antibiótico de escolha para a prevenção nos expostos e é eficaz na redução da duração dos sintomas e da leptospirúria (MacClain et al., 1984; Sehgal et al., 2000; Ressner et al., 2008). No entanto, a Doxiciclina foi empregada apenas em casos leves e moderados de leptospirose e não há apresentação IV do medicamento. Não se sabe se o início precoce de terapia antibiótica teria impacto no prognóstico da leptospirose com hemorragia pulmonar.

Apesar da escassez de estudos que avaliem novas formas de tratamento, com o objetivo de diminuir a mortalidade da leptospirose grave com SPHPS e choque, o Brasil tem dado contribuições eficazes nessa área. Em 2007, um estudo realizado no Instituto de Infectologia Emílio Ribas por Andrade et al. (2007) demonstrou uma diminuição da mortalidade de pacientes com SPHS em ventilação mecânica e requerendo drogas vasoativas, ao proporem tratamento dialítico precoce e diário. Nos que receberam a diálise precoce e diária, a taxa de mortalidade foi de 16,7% (três casos em 18), enquanto que a taxa de mortalidade foi de 66,7% no grupo em que a diálise foi instituída em dias alternados e após atingir níveis altos de uréia sérica. Devido a este resultado satisfatório, esforços para instituição de diálise diária vêm sendo empregados nas unidades de terapia intensiva de todo Brasil para o tratamento da leptospirose grave.

O tratamento com imunossupressores há tempos vem sendo relatado na literatura mundial, com o intuito de modular a resposta imune e diminuir a mortalidade da doença de Weil com SPHS e disfunção de múltiplos órgãos. Esses estudos apontaram uma melhora no desfecho daqueles que recebem o tratamento, porém são relatos de casos, não controlados e não randomizados (Siriwanij et al., 2005; Shenoy et al., 2006; Dursun et al., 2007). Estudos bem desenhados e recentes demonstram que diferentes modalidades de imunossupressão têm impacto importante na morbidade e mortalidade da leptospirose grave. Triverdi et al. (2009) avaliaram os efeitos da ciclofosfamida associada a pulsoterapia de metilprednisolona em 33 pacientes com SPHS na Índia. A sobrevida foi de

66,7% naqueles que receberam o tratamento, enquanto que a sobrevida foi de 9,4% naqueles que receberam apenas antibióticos ($OR = 19,33$ $P < 0,001$). Em outro estudo, o mesmo grupo de autores administrou em 114 casos confirmados de doença de Weil (com hemorragia pulmonar) o tratamento de dois ciclos de plasmaférese alternados com uma dose de ciclofosfamida. A sobrevida foi de 61,4% comparada com uma sobrevida de apenas 16,6% em 30 pacientes controles, que receberam tratamento padrão (Triverdi et al, 2010). Estes dois ensaios terapêuticos sugerem pelos seus resultados e tipo de imunossupressores utilizados (ciclofosfamida, plasmaférese e metilprednisolona, todos com ação sobre linfócitos B) que houve intervenção bem sucedida em uma doença imune, mediada por auto-anticorpos (Davidson & Diamond, 2001). Um terceiro *trial* randomizado, multicêntrico, com análise tipo intenção-de-tratar, conduzido na Tailândia em pacientes com leptospirose e acometimento pulmonar, não demonstrou que a pulsoterapia de dexametasona ou a desmopressina apresentam vantagens sobre o tratamento padrão com antibióticos, verificando-se aumento do número de infecções nosocomiais entre os que receberam dexametasona (Ni wattayakul et al., 2010).

No campo da leptospirose experimental, um estudo com hamsteres demonstrou que rapamicina, administrada após o início da infecção, diminui as lesões em órgãos-alvos, com pouca hemorragia pulmonar e mínima nefrite intersticial focal (Praditpornsilpak et al., 2006).

O tratamento com drogas imunossupressoras ainda não é consensual em nosso país e necessita de protocolos bem definidos para o seu uso, inclusive empregando testes de diagnóstico rápido (Croda, 2007).

3.15. A sepse bacteriana

Por definição, sepse é uma infecção sistêmica acompanhada de resposta inflamatória intravascular generalizada com febre ou hipotermia, taquicardia, taquipnéia e leucocitose ou leucopenia. Quando o indivíduo em sepse apresenta sinais de disfunção orgânica como hipotensão, hipoxemia, oligúria, acidose metabólica, hiperlactetemia, plaquetopenia e alteração do estado mental, tem-se a sepse grave. O choque séptico é definido como a sepse grave acompanhada de hipotensão não responsiva à reposição de fluidos via intravenosa, necessitando de drogas vasoativas (Bone et al., 1992; Dellinger et al., 2008).

Entre as causas mais comuns de sepse estão broncopneumonia, infecções do trato urinário, infecções cutâneas e intra-abdominais tanto comunitárias quanto nosocomiais, causadas por bactérias Gram-positivas/-negativas. A taxa de mortalidade aumenta de acordo com a gravidade, sendo 25-30% na sepse grave e 40-70% no choque séptico (Hotchkiss & Karl, 2003; Dellinger et al., 2008). Várias características do hospedeiro e do microorganismo causador da infecção podem influenciar o desfecho do paciente com sepse. A sepse pode progredir para choque

séptico e insuficiência de múltiplos órgãos por diversos fatores como uma resposta imune e inflamatória do hospedeiro excessiva ou insuficiente, alta carga bacteriana infectante, fatores de virulência e resistência do microorganismo causativo e falta de controle do foco infeccioso (Hotchkiss & Karl, 2003; Russel, 2006).

A fisiopatologia da sepse é complexa, compreendendo interações entre o microorganismo e diversos sistemas fisiológicos, dentre eles o sistema imune, o sistema neuroendócrino e a cascata da coagulação (Hotchkiss & Karl, 2003; Russel, 2006). A resposta imune do hospedeiro na sepse inicia-se quando ocorre ação do complemento após a invasão do agente agressor e quando receptores de imunidade inata como os TLRs nas células efectoras (células NK, macrófagos e células dendríticas) interagem com moléculas dos microorganismos. Como exemplo, o TLR2 reconhece os peptidoglicanos de bactérias Gram-positivas e o TLR-4 reconhece o lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas (Delves & Roitt, 2000a). A interação TLRs e epítomos bacterianos resulta em sinalização intracelular, via NF κ B, aumentando a transcrição de citocinas pro-inflamatórias e Th1 (TNF α , IL-1 IL-6, IFN tipo I), como também citocinas antiinflamatórias (IL-10, IL-4, TGF β) (Delves & Roitt, 2000a; Medzhitov & Janeway, 2000). Como consequência da produção de citocinas inflamatórias, ocorre ativação de outras células imunes com potencialização da resposta inflamatória, ativação do endotélio vascular e quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos (van der Poll & Opal, 2008). As imunidades celulares e humorais amplificam a resposta da imunidade inata na sepse. As células B produzem imunoglobulinas que se

ligam aos microrganismos, opsonizando-os e facilitando a fagocitose (Delves & Roitt, 2000b). As células TCD4+ podem secretar citocinas do tipo Th1 ou do tipo Th2, dependendo da carga do inóculo e das interações entre essas células e os microrganismos infectantes (Andrian & Mackay, 2000; Delves & Roitt, 2000b; van der Poll & Opal, 2008). As células TCD8+ e células NK exercem seu papel de citotoxicidade, destruindo os microrganismos. A tentativa da resposta inflamatória é de destruir os microorganismos invasores, mas a inflamação intravascular sistêmica pode levar à disfunção endotelial na microcirculação, causando o choque e disfunção de órgãos. O sistema de coagulação apresenta desequilíbrio durante a sepse, caracterizado pela produção de fatores pró-coagulantes (fator tecidual) pelo endotélio ativado, diminuição da produção de fatores anticoagulantes e da fibrinólise, levando à formação de trombos na microvasculatura, a qual piora a perfusão, gerando hipóxia tecidual (Russel, 2006).

Na última década tem sido revisto o paradigma de que a insuficiência de múltiplos órgãos da sepse é resultante apenas de um estado pró-inflamatório exacerbado (Hotchkiss & Karl, 2003; Russel, 2006). Várias evidências em humanos e em animais experimentais demonstraram um estado imunossupressor ao longo da evolução da sepse. Tal condição é caracterizada pelo aumento da produção de citocinas Th2 e baixa produção de citocinas Th1 por células mononucleares do sangue periférico (Erthel et al., 1995; Gogos et al., 2000), anergia a antígenos de hipersensibilidade (Meakins et al., 1977), linfopenia por intensa apoptose de linfócitos no baço e epitélio intestinal (Hotchkiss et al., 2001), ativação de células regulatórias

(Suvas & Rouse, 2006), diminuição de células NK (Flohe et al., 2006,) e de células dendríticas (Hotchkiss, 2001; Efron et al., 2004), baixa expressão de MHC II (Monneret et al., 2006), reativação de vírus como citomegalovírus (Limaye et al., 2008) e *Herpes simplex* (Luyt et al., 2007) e predisposição a infecções nosocomiais (Rajan & Sleight, 1997).

Neste contexto, o baço é um órgão que vem chamando a atenção nos últimos anos, após estudos que demonstraram ocorrer nele eventos patogênicos cruciais da sepse. Nos estudos de Hotchkiss et al (1999, 2000, 2001), feitos em necrópsias de indivíduos que faleceram por choque séptico foi descrita uma intensa perda de células por apoptose, principalmente no epitélio intestinal e no baço. A análise dos esplenócitos por imunohistoquímica revelou que os principais subtipos celulares afetados são células B, células T CD4+ e células dendríticas, em comparação com controles sem sepse. Em estudos experimentais, foi demonstrado que no modelo de sepse em camundongos a apoptose de linfócitos intestinais e esplênicos ocorre de forma mais intensa com o avançar da idade do animal (Turnbull et al., 2004). As alterações transcricionais do RNAm das células TCD4+ ocorrem nas primeiras seis horas da indução de sepse, principalmente nos receptores de células T e em enzimas da via MAPKnases, precedendo as alterações fenotípicas e funcionais das células TCD4+ esplênicas, as quais ocorrem após 24 horas de sepse (McDunn et al., 2006).

Como novas perspectivas terapêuticas, baseadas nesses novos conceitos da fisiopatogenia da sepse, estudos em animais, utilizando

IFN γ (Dock et al., 1997; Kox et al., 1997), IL-15 (Benjamin et al., 2005), IL-12 (Göebel et al., 2000) e inibidores de caspases (Hotchkiss et al., 1999; 2000; 2005), tiveram êxito em diminuir a mortalidade da síndrome, pela reversão da imunossupressão e da apoptose de células da imunidade.

3.16. O choque séptico como manifestação clínica da leptospirose grave

Hipotensão ocorre na leptospirose acompanhando casos graves com doença de Weil e SPHS, conferindo ao quadro infeccioso um estado semelhante ao choque séptico causado por outras bactérias (Ko et al., 2009). A Incidência do choque na leptospirose grave não é bem descrita e tem distribuição variável no mundo, não relatada em vários países como EUA, Argentina, Nova Zelândia, Itália e algumas regiões do Brasil. No entanto, pode ter frequência tão alta quanto 18% na Grécia (Raptis et al., 2006), 40% na Índia (Singh et al., 1999), 57% (Avdeeva & Bondarenko, 2006) 70% na Tailândia (Panaphut et al., 2003) e de 70% a 100% em São Paulo, Brasil (Marotto et al., 1999; Andrade et al., 2007), segundo estudos prospectivos. Em um deles, realizado em São Paulo, o choque representou um fator de risco para óbito na leptospirose com insuficiência respiratória, com uma possibilidade de óbito seis vezes maior que aqueles que não apresentam hipotensão refratária (Marotto et al., 1999).

A fisiopatogenia do choque cardiovascular na leptospirose é pobremente compreendida. Sabe-se através de estudos de patologia humana e experimental que ocorre claramente uma disfunção endotelial na leptospirose semelhante à sepse, com exceção da necrose das células endoteliais, não observada na leptospirose (Arean, 1962; De Brito et al., 1979; 1987). Alguns estudos demonstram que casos de leptospirose grave com choque apresentam níveis sanguíneos altos e persistentes de óxido nítrico no sangue (Avdeeva & Bondarenko, 2006; Maciel et al., 2006) e expressão aumentada de iNOS no pulmão da SPHS, acompanhando áreas de necrose e hemorragia (Chen et al., 2007). Foi também demonstrado experimentalmente, que as células de Kupffer de ratos produzem grande quantidade de radicais reativos de oxigênio com expressão aumentada de iNOS após estímulo com *L. interrogans* virulenta (Marangoni et al., 2000 e 2006). Esses dados sugerem a participação do óxido nítrico na inflamação sistêmica e na disfunção do endotélio vascular de órgãos afetados.

Algumas diferenças também já foram observadas entre leptospirose grave e choque séptico por bactérias Gram-negativas e estas ocorrem principalmente no nível molecular, como por exemplo, a relação entre o LPS de leptospiros e os TLRs que ativam células imunes (Werts et al., 2001; Nahori et al., 2005). Apesar de a leptospirose ser confundida clinicamente com sepse, sobretudo as de origem gastrointestinal e de vias biliares, características próprias da doença diferenciam-na de outras infecções. A saber, a conjunção de insuficiência renal, icterícia colestática e

rabdomiólise acompanhada de plaquetopenia sem CIVD e a hemorragia pulmonar maciça (Levett, 2001; Bharti et al., 2003).

Quanto às alterações hemodinâmicas presentes no choque cardiovascular da leptospirose, poucos dados são descritos, mas revelam alterações típicas de choque séptico através dos parâmetros fornecidos pelo cateter de artéria pulmonar (cateter de Swan-Ganz) como: baixa pressão capilar pulmonar ocluída, baixa resistência vascular sistêmica indexada e índice cardíaco elevado (Marotto et al., 1999; Bourdais et al., 1988; Siriwanij et al., 2005). Em alguns casos graves, disfunção autonômica foi relatada com hipotensão e bradicardia antes do óbito, decorrentes da diminuição da atividade simpática e aumento da atividade parassimpática (Chen et al., 2007).

Até o momento, não temos dados bem estabelecidos na literatura sobre a relação entre hipotensão (ou outras complicações da leptospirose), leptospiremia e tempo de evolução da doença. Alguns autores discutem em que fase da doença o choque cardiovascular ocorre na leptospirose: na fase aguda como uma progressão de uma leptospiremia intensa (Singh et al., 1999; Salkade et al., 2005), na fase imune (Ko et al., 2009) ou secundária a uma reação de Jarisch-Herxheimer após início da antibioticoterapia (Watt & Warrell, 1995)? É pouco provável o choque ser um achado da fase leptospirêmica se o analisarmos pelo ângulo da propriedade endotóxica do LPS de leptospiros, que é baixa, quando comparada com aquela do LPS de outras bactérias Gram-negativas (Shimizu et al., 1987a e 1987b). No entanto, uma alta carga bacteriana infectante diminui o período

de incubação e a sobrevida de animais experimentais de forma dose-dependente (Faine, 1957; Silva et al., 2008). Nesta mesma linha de raciocínio, sabe-se também através de um relato de cinco casos oriundos do Peru de leptospirose grave, que o choque e a SPHS maciça ocorreram nestes pacientes na vigência de uma grande quantidade de material genético amplificado (pela técnica de RT-PCR), não associado a uso prévio de antibióticos (Segura et al., 2005). Em outros quatro casos ocorridos no Rio de Janeiro, três pacientes faleceram por SPHS maciça, com hemoculturas para leptospirosas positivas (coletadas na admissão hospitalar) e IH positiva para antígenos da bactéria no tecido pulmonar (Silva et al., 2002). Esses achados indicam a existência de uma alta carga infectante e que o microorganismo participa diretamente das lesões, contribuindo para a maior gravidade do caso. É possível que fatores inerentes ao hospedeiro e atraso na antibioticoterapia devam contribuir para o não controle da infecção e progressão da doença. No entanto, ainda não foram determinados fatores genéticos do indivíduo, predispondo-o à leptospirose grave com SPHS e choque. Igualmente, alguns serovars estão mais diretamente associados com quadros graves em áreas endêmicas, como as cepas de *L. interrogans* provenientes de surtos em São Paulo e Rio de Janeiro, pertencentes a uma mesma subpopulação clonal por similaridades genéticas, sugerindo alta virulência da bactéria como determinante de evolução grave (Pereira et al., 2000). No tocante à possibilidade da SPHS e do choque cardiovascular estar atrelados à fase imune da doença, as maiores casuísticas de leptospirose grave revelaram que os casos foram hospitalizados com ao menos quatro a

seis dias de evolução (Marotto et al., 1999; Chen et al.; 2007; Spichler et al., 2008). Isto justifica considerar a hipótese de um mecanismo de lesão auto-imune do endotélio de órgãos-alvos, mediado por anticorpos, como demonstrado recentemente no pulmão da SPHS (Yang & Hsu, 2005; Nally et al., 2006; Croda et al., 2009). Quanto à reação de Jarisch-Herxheimer, o fenômeno não foi relatado em nenhum dos estudos terapêuticos recentes com antibióticos para a leptospirose (Costa et al., 2003, Panaphut et al., 2003). Igualmente, nos estudos de Tajiki et al (1997) e de Estavoyer et al (1991) o aumento sérico de TNF α foi encontrado antes do início da antibioticoterapia, nas primeiras horas de internação hospitalar.

3.17. O baço na leptospirose

A descrição das alterações esplênicas na leptospirose humana são antigas. Em 1962, Arian fez a primeira análise completa da patologia da leptospirose, através de 33 necrópsias de casos confirmados, dentre os quais 22 pacientes com insuficiência renal, cinco com choque e três com hemoptise. O exame macroscópico de 26 baços demonstrou esplenomegalia em sete casos, com a cápsula esplênica tensa, vermelho-arroxeadas e brilhantes. Ao corte, encontrou-se congestão e hemorragias focais desorganizando a arquitetura normal do órgão na maioria dos casos. À histologia, os principais achados encontrados foram: seios venosos dilatados e congestos, com diversos focos de hemorragia, hiperplasia de células

reticuloendoteliais, eritrofagocitose, infiltrados focais de neutrófilos e aumento de plasmócitos. Leptospiras não foram identificadas pela coloração de prata e não foram descritos aspectos histopatológicos da polpa branca. Comby em 1969 fez uma descrição de 10 casos de leptospirose, cuja *causa mortis* principal foi hemorragia digestiva maciça, levando ao choque e insuficiência de múltiplos órgãos e encontrou além dos achados descritos por Arean, atrofia e focos de hemorragia da polpa branca, na maioria dos casos (Comby et al., 1969).

No âmbito da leptospirose experimental, Muensoongnoen e cols. (2006) avaliaram as alterações histopatológicas do baço de hamsteres infectados por *L. interrogans* serovar pyrogenes. Alterações semelhantes às encontradas por Arean (1962) foram vistas precocemente, na primeira hora de infecção, que se agravaram progressivamente até o sexto dia do experimento. Os achados principais foram: necrose celular focal nos cordões esplênicos; dilatação de sinusóides com congestão e áreas de hemorragia desorganizando o parênquima esplênico; grânulos de hemossiderina livres nos cordões de Billroth e no citoplasma de macrófagos e por último, infiltrado inflamatório de neutrófilos distribuídos no estroma e nos sinusóides esplênicos. Os autores propõem como possível mecanismo patológico para as alterações esplênicas a ação local de toxinas da *Leptospira sp*, causando dano celular e necrose no início da infecção, lesando a parede vascular com subsequente alteração da permeabilidade de capilares sinusoidais e extravasamento de hemácias (Muensoongnoen, 2006).

Uma vez que no baço ocorrem eventos patogênicos cruciais da sepse/choque séptico por bactérias Gram-positivas/-negativas como a perda de células imunes por apoptose, levando a um estado de imunossupressão que imprime ao paciente um pior prognóstico e considerando-se que a leptospirose grave pode assemelhar-se clinicamente a essa síndrome, faz-se imprescindível a avaliação aprofundada das alterações esplênicas que ocorrem nessa doença causada por espiroquetas. A comparação de casos de leptospirose com casos de sepse/choque séptico por bactérias Gram-positivas/-negativas é válida, pois até o momento, não há pesquisas clínicas que verifiquem congruências ou divergências entre essas entidades. Ressalta-se ainda que, na literatura nacional e de língua inglesa, não se encontrou estudo humano ou experimental que avalie a resposta imune *in situ* em órgãos-alvos na vigência da leptospirose com SPHS e choque cardiovascular.

4. Materiais e Métodos

4.1. Casuística

4.1.1. Casos de leptospirose

O grupo foi composto de fragmentos de baço obtidos por necropsia de pacientes que foram a óbito, no Hospital das Clínicas da FMUSP e Hospital Universitário da USP, por quadro confirmado de leptospirose grave com doença de Weil, hemorragia pulmonar e choque cardiovascular, sem isolamento bacteriológico de qualquer outro agente infeccioso. Todos os casos de leptospirose preencheram critérios clínicos e laboratoriais de sepse/choque séptico (Bone et al., 1992).

A leptospirose foi definida por quadro clínico compatível (icterícia febril com mialgias, IRA, leucocitose, plaquetopenia e fenômenos hemorrágicos) e por critério epidemiológico (exposição à água, lixo e solo contaminados ou contato direto com animais reservatórios) associados a qualquer um dos seguintes exames complementares positivos: ELISA IgM positivo, microaglutinação (MAT) positiva (títulos acima de 1:800 em única amostra, soroconversão ou aumento de 4 vezes na titulação da segunda amostra colhida na convalescência), hemocultura positiva, necropsia sugestiva de leptospirose (nefrite intersticial proximal, necrose tubular aguda, destrabeculação de hepatócitos e hemorragia pulmonar) com ou sem imunohistoquímica positiva para antígeno de *Leptospira* nos tecidos.

4.1.2. Controles

Como grupo controle, foram selecionados baços de pacientes que foram a óbito por choque séptico, decorrente de infecções por bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas. A seleção teve como base a definição de choque séptico: presença de síndrome de resposta inflamatória sistêmica com taquicardia (maior que 90 batimentos por minuto), taquipnéia (maior que 20 incursões por minuto), leucocitose (maior que 12.000/ μ l) com mais de 10% de formas imaturas, febre ou hipotermia (temperatura axilar maior que 38°C ou menor que 35°C), pressão arterial sistólica menor que 90 mmHg, requerendo infusão de drogas vasoativas, associada a um diagnóstico infeccioso comprovado por exames complementares microbiológicos, radiológicos e/ou anatomopatológico (Bone et al., 1992).

Um segundo grupo controle foi representado por pacientes sem quadro infeccioso agudo, submetidos à esplenectomia por laparotomia exploradora devido a trauma abdominal. Desse grupo foram excluídos aqueles que chegaram à sala de emergência em choque hipovolêmico, com imunodeficiência de base ou em uso de medicações imunossupressoras.

Todas as amostras de baço dos grupos leptospirose eram provenientes de pacientes com idade igual ou superior a 18 anos.

4.2. Dados demográficos e laboratoriais

Foram coletados dados como idade, sexo, duração da internação hospitalar, *score* APACHE II e intervalo de tempo entre o óbito e a realização da necropsia, bem como resultados de exames complementares sanguíneos: creatinina, uréia, potássio, bilirrubina total e frações, aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT), hematócrito, leucometria e contagem de plaquetas.

4.2.1. Processamento do material

Os fragmentos de baço coletados foram fixados em formaldeído tamponado a 10%, incluídos em parafina de acordo com procedimentos habituais, seccionados em micrótomo e corados pela hematoxilina-eosina (HE). Foi excluído o material de necropsia com autólise parcial ou total.

4.2.2. Método imunohistoquímico

Para a realização das reações de imunohistoquímica (Hsu et al., 1981), cortes histológicos de 0,4µm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente

preparadas com solução adesiva de 3-amino-propiltietoxi-silano (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. A3648). Os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol a 56°C durante 30 minutos e à temperatura ambiente durante 20 minutos, sendo posteriormente hidratados em seqüência decrescente de etanol (absoluto, 95% e 70%) e água corrente durante 10 minutos cada e tampão “phosphate buffer saline” (PBS), pH 7,4.

Foi realizado o bloqueio de pigmentos de formol com imersão dos cortes em solução de hidróxido de amônio 25% diluído em álcool 95% por 30 minutos à temperatura ambiente.

Foi utilizado o método imunohistoquímico de Estreptavidina-biotina peroxidase (SABC, do inglês *Streptavidin-Biotin Peroxidase*, conforme padronização do Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da FMUSP.

O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com três incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada e em seguida, os preparados foram novamente lavados em água corrente e água destilada por 10 minutos cada, sendo colocados posteriormente em tampão PBS pH 7,4.

A exposição antigênica, quando necessária, foi realizada por incubação em banho-maria com tampão *Target Retrieval Solution* 10 vezes concentrado (TRIS-EDTA 10/1mM, Dako-cód. S1699) durante 20 minutos, com aquecimento do tampão à temperatura de 95°C. Os preparados foram novamente lavados em água corrente, água destilada e tampão PBS pH 7,4 por 5 minutos cada.

O bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido foi feito com incubação das amostras em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé) a 10% durante 30 minutos à temperatura ambiente. Subseqüentemente, os preparados foram incubados com os anticorpos primários, diluídos em solução a 1% de albumina bovina fração V (Serva cód. 11930) acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7,4, *overnight* a 4°C.

Após duas lavagens com tampão PBS pH 7,4 por cinco minutos cada, foi feita a incubação com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho e anti-imunoglobulina de camundongo produzido em cabra (Dako cód. K 690) durante 30 minutos a 37°C. Os preparados foram novamente lavados em tampão PBS pH 7,4 e incubados com o complexo SABC (Dako cód. K690) durante 30 minutos a 37°C. Após nova lavagem em tampão PBS pH 7,4, a reação foi revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'- diaminobenzidine, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. D5637) 0,04% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%. A intensidade de cor foi controlada ao microscópio óptico através dos controles positivos que acompanharam cada reação. Controles negativos foram também utilizados em cada reação, omitindo-se o anticorpo primário.

Os preparados assim processados foram lavados em água corrente por 10 minutos, contra-corados com Hematoxilina de Harris por 20 segundos, lavados em água corrente, desidratados em etanol e diafanizados em xilol. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP15-100).

Alguns anticorpos (tabela 1) necessitaram do emprego de um sistema de amplificação de sinal, denominado CSAII (Dako, cód. K1497), que consiste na deposição de um componente fenólico ligado à fluoresceína, seguido por uma reação com anticorpo anti-fluoresceína conjugado com peroxidase.

Tabela 1: Relação de anticorpos primários empregados em imunohistoquímica

Anticorpo	Marca/código	Exposição Antigênica	Diluição	Kit utilizado
Ig de camundongo anti-CD4 humano	Dako/M834	-	1:1000	CSA II**
Ig de camundongo anti-CD8 humano	Dako/M7103	-	1:30	CSA II**
Ig de camundongo anti-CD20 humano	Dako/M0755	Calor úmido	1:40	LSAB-HRP*
Ig de camundongo anti-CD45	Dako/M742	Calor úmido	1:100	LSAB-HRP*
Ig de camundongo anti-CD57 humano	Immunotech/1166	Calor úmido	1:100	LSAB-HRP*
Ig de camundongo anti-CD68 humano	Dako/M0876	Calor úmido	1:30	LSAB-HRP*
Ig de coelho anti-S100	Dako/Z311	-	1:000	LSAB-HRP*
Ig de cabra anti-IL1- β humana	R&D Systems/AF201-NA	Calor úmido	1:20	LSAB-HRP*
Ig de camundongo anti-IL2r humana	Novocastra/CD25	Calor úmido	1:20	LSAB-HRP*
Ig de cabra anti-IL4 humana	R&D Systems/AF204-NA	Calor úmido	1:40	LSAB-HRP*
Ig de cabra anti-IL6 humana	R&D Systems/AF206-NA	Calor úmido	1:20	LSAB-HRP*
Ig de camundongo anti-IL-10 humana	R&D Systems/MAB217	Calor úmido	1:10	LSAB-HRP*
Ig de camundongo anti-IL-12 humana	R&D Systems/MAB219	Calor úmido	1:10	LSAB-HRP*
Ig de camundongo anti-IFN- γ humano	R&D Systems/MAB285	Calor úmido	1:30	LSAB-HRP*
Ig de cabra anti-TNF- α humano	R&D Systems/AF210MA	Calor úmido	1:40	LSAB-HRP*
Ig de coelho anti-TGF- β humano	Santa Cruz/SC-82	Calor úmido	1:50	LSAB-HRP*
Ig de coelho anti-caspase-3	Cell Signaling/9661 S	Calor úmido	1:100	LSAB-HRP*

*LASB-HRP: Kit imunohistoquímico para peroxidase

** CSA II: Kit imunohistoquímico de amplificação de sinal para peroxidase

4.2.3. Método de imunohistoquímica para citocinas

A reação imunohistoquímica para visualização da expressão de citocinas apresenta alguns diferenciais. Antes do bloqueio de proteínas inespecíficas, os preparados foram colocados em tampão PSB pH 7,4 contendo saponina 0,1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. S 7900) por 10 minutos a temperatura ambiente e em seguida colocados novamente no tampão PBS pH7,4. Os preparados foram incubados “overnight” a 4°C, seguindo o protocolo já descrito anteriormente, contudo, após a incubação com o anticorpo secundário, os preparados foram novamente colocados em tampão PSB pH 7,4 contendo saponina 0,1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA,cód. S 7900) por 10 minutos a temperatura ambiente e em seguida colocados novamente no tampão PBS pH7,4. Posteriormente, um novo bloqueio de peroxidase endógena foi realizado (3 vezes, por 10 minutos cada) e a reação prosseguiu, segundo o protocolo já mencionado.

4.2.4. Método de imunohistoquímica para detecção de antígenos de leptospiras

Um anticorpo policlonal de coelho, desenvolvido no Instituto de Medicina Tropical da USP referendado por Alves et al (1986, 1992), padronizado no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da FMUSP foi utilizado para detectar antígeno de *Leptospira* em amostras de fígado e rins dos pacientes com suspeita de leptospirose, para a realização do diagnóstico *post-mortem*. Adicionalmente, a reação imunohistoquímica foi realizada para detecção de antígeno de *Leptospira* no baço.

4.3. Análise histológica e imunohistoquímica

4.3.1- Análise semi-quantitativa

Os achados histológicos esplênicos foram analisados de forma semiquantitativa, segundo critérios que foram nomeados como A, B e C referentes a diferentes eventos. O critério A (0 = ausente e 1 = presente) categorizou os eventos de hemorragia capsular/pericapsular, hemorragia da PV, necrose da PV, necrose e trombose de vasos da PV, sinais de ativação endotelial da arteríola centro-folicular, hematopoiese extramedular, depleção de zona T e de zona B dependentes, atrofia ou hiperplasia de folículos da

polpa branca. O critério B (1 = focal e 2 = difusa) discriminou o tipo de congestão da polpa vermelha. O critério C (0 = normal, 1 = leve, 2 = moderado e 3 = intenso) avaliou a intensidade da congestão da PV e do pigmento de hemossiderina e a densidade dos macrófagos/células reticulares, plasmócitos, linfócitos e polimorfonucleares da PV.

4.3.2. Análise quantitativa

Os cortes imunomarcados para avaliação do fenótipo das células inflamatórias e de citocinas foram submetidos a contagem, utilizando-se retículo graduado com área de 1 cm² dividida em 100 porções de 1 mm² adaptado à ocular do microscópio óptico.

Usando-se o aumento de 40 vezes e ocular de 10 vezes foi determinada a secção mais preservada presente no preparado. A contagem, realizada com aumento de 400 vezes, foi iniciada na primeira área a partir da extremidade livre de secção que preencheu totalmente o retículo. Após o correto posicionamento do graticulo, foram contadas sequencialmente as células imunomarcadas. Para cada caso, foram contadas 10 áreas de polpa branca e 10 de polpa vermelha cobertas pelo retículo. Ao analisar a polpa branca esplênica, o retículo sempre abrangeu a arteríola centro-folicular. Os resultados foram expressos em número de células por mm² (Cesta, 2006).

4.3.3. Análise estatística

Para esse estudo retrospectivo, descritivo e comparativo com os três grupos estudados a análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Graph Pad Prism 4.0 para Windows. Dados categóricos foram expressos em número e percentual, comparando-se os grupos com p determinado pelos testes *Chi-Square de Pearson* ou *Teste exato de Fischer*, quando apropriado. Os dados quantitativos foram demonstrados como mediana e intervalo interquartil. O teste *Kurtosis* foi aplicado, demonstrando-se que os dados são do tipo dados não paramétricos. A comparação entre 3 grupos foi feita com o teste *Kruskal-Wallis* e a comparação entre 2 grupos foi feita com o teste *Mann-Witney-Wilcoxon*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significantes.

5. Comissão de ética em pesquisa

Este estudo teve o seu projeto aprovado pela comissão de ética das instituições participantes, Hospital das Clínicas da FMUSP, sob o registro da CAPPesq ICHC nº 0537/06 (anexo 1) e Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (anexo 2).

6. Resultados

6.1. Casuística

6.1.1. Grupo de leptospirose com choque e hemorragia pulmonar

Onze casos de leptospirose foram selecionados e incluídos no estudo, após um levantamento retrospectivo do arquivo do Departamento de Patologia da FMUSP, no período de 1981 a 2005. Todos os casos apresentavam doença de Weil, com choque e insuficiência respiratória, devido à SPHS a qual foi a *causa mortis* principal. Os principais dados demográficos, epidemiológicos, clínicos e laboratoriais no momento da admissão hospitalar, bem como a evolução clínica do grupo leptospirose estão sumariados na tabela 2 e os demais dados estão no anexo 3.

Tabela 2: Achados demográficos, epidemiológicos, clínicos, laboratoriais e evolução clínica de 11 pacientes com leptospirose grave com choque e hemorragia pulmonar.

Dados demográficos e epidemiológicos		
Idade, <i>mediana</i> (IR) *	40	(36-56)
Sexo: masculino, <i>número</i> (%) **	9	(81,8%)
feminino, <i>número</i> (%)	2	(18,2%)
Contato com roedores, <i>n</i> (%)	5	(45,4%)
Contato com água contaminada, <i>n</i> (%)	7	(63,6%)
Comorbidades (hipertensão arterial)	3	(27,27%)
Sintomas clínicos		
Duração dos sintomas, <i>median</i> (IR)	6 days	(4.5-7.0)
Febre, <i>n</i> (%)	11	(100,0%)
Mialgias, <i>n</i> (%)	11	(100,0%)
Icterícia, <i>n</i> (%)	11	(100,0%)
Alteração do estado mental, <i>n</i> (%)	6	(54,5%)
Hemorragia pulmonar, <i>n</i> (%)	11	(100,0%)
Choque, <i>n</i> (%)	11	(100,0%)
Exames laboratoriais		
Microaglutinação positiva	7	(63,6%)
ELISA IgM positiva	5	(45,4%)
Hematócrito %, <i>mediana</i> (IR)	28.79	(25.5-30.85)
Leucócitos, cells/mm ³ , <i>mediana</i> (IR)	1.69x10 ⁴	(1.29-2.4x10 ⁴)
Plaquetas, cells/mm ³ , <i>mediana</i> (IR)	5.0x10 ⁴	(4.0-6.3x10 ⁴)
Creatinina sérica, mg/dL, <i>mediana</i> (IR)	6	(4.5-8)
Bilirrubina sérica, mg/dL, <i>mediana</i> (IR)	14	(7-27)
AST, mg/dL, <i>mediana</i> (IR)	134	(44.5-294)
ALT, mg/dL, <i>mediana</i> (IR)	78	(25-114)

Evolução clínica		
Uso de drogas vasoativas, <i>n</i> (%)	11	100,0%)
Ventilação mecânica, <i>n</i> (%)	11	(100,0%)
Diálise, <i>n</i> (%)	9	(81,8%)
Duração da hospitalização em UTI, mediana (IR)	2 days	(1.5-9.5)
Escore APACHE II, mediana (IR)*	23.5	(21-27.5)

IR: Intervalo interquartil

*Grupo leptospirose mais idoso que grupo trauma ($P = 0,029$, Mann-Withney)

**Grupo leptospirose com mais homens que o grupo sepse ($P = 0,007$, Chi-Square Pearson)

* Escore APACHE II foi calculado em 8 pacientes.

6.1.2. Grupo controle com sepse por bactérias Gram-positivas/Gram-negativas

O grupo controle de sepse por bactérias Gram-positivas/Gram-negativas foi composto por dez casos. Quanto ao sexo, este grupo foi formado principalmente por mulheres (8 casos), com diferenças significantes em relação ao grupo leptospirose ($p = 0,007$) e trauma ($p = 0,001$), constituídos principalmente por homens (anexo 4).

O grupo sepse apresentou uma mediana de idade de 57 anos (IR = 49,0-63,5), com diferença significativa com o grupo trauma, mais jovem ($p = 0,02$).

As principais comorbidades relatadas nos prontuários foram hipertensão arterial sistêmica (80,0%) e diabetes mellitus (70,0%).

O diagnóstico microbiológico *ante-mortem* foi evidenciado em três casos (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*). A necrópsia demonstrou infecção em todos os casos, sendo a broncopneumonia o mais comum (60,0%), seguido pela pielonefrite (20,0%), infecção intra-abdominal (10,0%) e infecções de pele e de partes moles (40,0%).

A mediana da internação em UTI foi de 7,5 dias (IR=1,0-30,0).

6.1.3. Grupo controle com esplenectomia por trauma

Esse grupo é composto principalmente por homens jovens (11 casos), com mediana de idade 27 anos (IR = 23,5 - 33,5), mais jovem que o grupo leptospirose ($p = 0,029$) e que o grupo sepse ($p = 0,02$) (anexo 5).

6.2. Análise histológica das alterações esplênicas encontradas na leptospirose com choque, comparadas com casos controles de sepse e trauma

Os resultados da análise das alterações histológicas estão sumariados na tabela 3 e vistos em sua totalidade nos anexos (6,7,8).

As características da congestão na polpa vermelha esplênica em casos de leptospirose e sepse foram semelhantes, intensa e difusa, diferentes do grupo trauma, que foi ausente ou discreta ($p < 0,0001$).

A hemorragia pericapsular e capsular foi mais freqüente no grupo trauma, que nos grupos leptospirose e sepse ($P = 0,008$).

As células reticulares da PV apresentaram pronunciadas hipertrofia e hiperplasia, como também aumento da quantidade de macrófagos nos grupos leptospirose e sepse em relação ao grupo trauma ($P < 0,0001$).

Nos cordões esplênicos, houve aumento no número de neutrófilos, eosinófilos, plasmócitos e linfócitos nos casos de leptospirose e sepse, comparados com o grupo trauma ($P < 0,0001$).

Hematopoiese extra-medular foi encontrada tanto na PV quanto na PB dos baços de pacientes dos grupos leptospirose e sepse, enquanto este achado foi ausente no grupo trauma ($P < 0,0001$).

Os folículos linfóides apresentaram-se com aspecto atrófico nos casos de leptospirose e sepse, porém normais no grupo trauma ($P < 0,0001$). As regiões T-dependentes e B-dependentes dos folículos linfóides dos casos de leptospirose e sepse apresentaram um aspecto de baixa densidade celular, quando comparadas com os casos do grupo trauma ($P = 0,0001$).

O endotélio da arteríola centro-folicular demonstrou sinais de ativação endotelial nos casos dos grupos leptospirose e sepse e ausentes no grupo trauma ($P = 0,001$).

Tabela 3: Achados histológicos esplênicos em pacientes com leptospirose com choque séptico, sepse e trauma

Achados patológicos	Leptospirose (n=11)	Sepse (n=10)	Trauma (n=12)	p valor
Congestão polpa vermelha *	1(9,1%)	0(0%)	10(83,3%)	¹ p<0,0001
Ausência/Discreta	10(90,9%)	10(100%)	2(16,7%)	^a p=0,001
Moderada/Intensa				^b p=NS
				^c p<0,0001
Tipos de congestão	0(0%)	0(0%)	10(83,3%)	¹ p<0,0001
Focal	11(0%)	10(100%)	1(8,3%)	^a p<0,001
Difusa				^b p=NA
				^c p<0,0001
Hemorragia peri/subcapsular	1(9,1%)	2(20,0%)	8(66,70%)	¹ p<0,008
				^a p=0,007
				^b p=NS
				^c p<0,038
Hemorragia polpa vermelha	10(90,9%)	10(100%)	8(66,7%)	¹ p<0,075
				^a p=NA
				^b p=NS
				^c p<0,068
Necrose polpa vermelha	1(9,1%)	3(30%)	0(0%)	¹ p<0,093
				^a p=NA
				^b p=NS
				^c p=NS

Vasos da polpa vermelha Necrose e trombose	0(0%)	2(20,0%)	0(0%)	^f $p<0,093$ ^a $p=NA$ ^b $p=NS$ ^c $p=NS$
Células reticulares/macrófagos da polpa vermelha* Normal/Discreta Moderada/Intensa	0(0%) 11(100,0%)	1(10,0%) 9(90,0%)	12(100,0%) 0(0%)	^f $p<0,0001$ ^a $p<0,0001$ ^b $p=NS$ ^c $p<0,0001$
Células polimorfonucleares da polpa vermelha* Normal/Discreta Moderada/Intensa	0(0%) 11(100,0%)	4(40,0%) 6(60,0%)	12(100,0%) 0(0%)	^f $p<0,0001$ ^a $p<0,0001$ ^b $p=0,035$ ^c $p<0,003$
Plasmócitos da polpa vermelha* Normal/Discreta Moderada/Intensa	0(0%) 11(100,0%)	1(10,0%) 9(90,0%)	12(100,0%) 0(0,0%)	^f $p<0,0001$ ^a $p<0,0001$ ^b $p=NS$ ^c $p<0,0001$
Linfócitos da polpa vermelha** Normal Discreto	0(0%) 11(100,0%)	0 (0,0%) 10(100,0%)	11(91,7%) 1(8,3%)	^f $p<0,0001$ ^a $p<0,0001$ ^b $p=NA$ ^c $p<0,0001$

Metaplasia mielóide na polpa vermelha	11(100,0%)	4(40,0%)	0(0,0%)	^f $p<0,0001$ ^a $p<0,0001$ ^b $p=0,004$ ^c $p<0,029$
Pigmentos de hemossiderina	5(45,5%)	6(60,0%)	12(100,0%)	^f $p<0,064$
Normal	1(9,1%)	1(10,0%)	0(0,0%)	^a $p<0,012$
Moderado	5(45,5%)	3(30,0%)	0(0,0%)	^b $p=NS$
Intensa				^c $p=NS$
Volume dos folículos	2(18,2%)	0(0,0%)	12(100,0%)	^f $p<0,0001$ ^a $p<0,0001$
Normal	9(81,8%)	10(100,0%)	0(0,0%)	^b $p=NS$
Atrófico				^c $p<0,0001$
Depleção de zona T-dependente	11(100,0%)	6(60,0%)	0(0%)	^f $p<0,0001$ ^a $p<0,0001$ ^b $p=0,035$ ^c $p=0,003$
Depleção de zona B-dependente	9(81,8%)	9(90,0%)	0(0%)	^f $p<0,0001$ ^a $p<0,0001$ ^b $p=NS$ ^c $p<0,0001$
Sinais de ativação do endotélio da arteríola centro-folicular	11(100,0%)	7(70,0%)	3(25,0%)	^f $p=0,001$ ^a $p<0,0001$ ^b $p=NS$ ^c $p<0,046$

* Os parâmetros foram reagrupados em 2 categorias para análise estatística (normal/discreto e moderado/intenso).

** A análise semiquantitativa dos linfócitos da polpa vermelha foram reagrupados para análise estatística em duas categorias (normal e discreto)

¹*p*: valor de *p* comparando os três grupos (leptospirose, sepse e trauma) como determinados pelo teste de Pearson Chi-Square.

^a*p*: valor de *p* comparando o grupo leptospirose com o grupo trauma.

^b *p*: valor de *p* comparando o grupo leptospirose com o grupo sepse.

^c *p*: valor de *p* comparando o grupo sepse com o grupo trauma.

NS – não significante

NA – não se aplica

Os achados histopatológicos, de casos de leptospirose grave com SPHS e choque cardiovascular podem ser visualizados na figura 7. Reação de IH positiva para antígenos de *Leptospira* pode ser visualizada na figura 8.

Figura 7. Baço – Achados histológicos do baço na leptospirose grave com hemorragia pulmonar e choque cardiovascular: **a** – congestão, hemorragia e pigmentos de hemossiderina na PV; **b**– esplenite aguda com polimorfonucleares, plasmócitos, macrófagos e células reticulares; **c**-metaplasia mielóide da PV; **d** – hiperplasia e hipertrofia de células reticulares e aumento do número de macrófagos na PV; **e** – folículos da PB com atrofia e congestão intensa da PV; **f**- folículo da PB com zona-T e zona-B dependentes com depleção de linfócitos, infiltração de macrófagos na PB, sinais morfológicos de ativação endotelial na arteríola centro-folicular. Coloração hematoxilina-eosina. Aumento x 400, exceto figura **e** (x 200).

Figura 8. Baço – reação imuno-histoquímica evidenciando antígenos de leptospira. (SABC, x200)

6.3. Análise da resposta imune *in situ* no baço de pacientes com leptospirose e choque, comparada com casos controles de sepse e trauma.

6.3.1. Resposta imune celular inata e adquirida

Os resultados quantitativos da expressão tecidual de células imune e de células apoptóticas no baço de pacientes com leptospirose com choque, sepse e trauma estão demonstrados nos gráficos 1-7; nas figuras 9-15, na tabela 4 e nos anexos 9, 10 e 11.

As células NK estiveram diminuídas nos grupos infecciosos em relação ao grupo trauma.

Gráfico 1. Avaliação quantitativa da imunomarcagem de células CD57+ nas polpas vermelha e branca nos casos de Leptospirose, Sepse e Trauma.

Figura 9. Baço – reação imuno-histoquímica para células *Natural-killer* (CD57+) nos grupos: 1 - leptospirose, 2 - sepse e 3 - trauma (SABC, 400x)

As células dendríticas (S100), apresentadoras de antígenos estiveram em número aumentado na PV do baço dos dois grupos infecciosos (leptospirose e sepse) em relação ao grupo controle trauma. Na leptospirose, o número de células S100+ foi significativamente maior que na sepse ($p = 0,0003$). Na PB, entretanto, estas células estiveram aumentadas significativamente apenas na leptospirose, não havendo diferenças entre o grupo sepse e o grupo trauma.

Gráfico 2. Avaliação quantitativa da imunomarcação de células S100+ nas polpas vermelha e branca nos casos de Leptospirose, Sepse e Trauma.

Figura 10. Baço – reação imuno-histoquímica para células apresentadoras de antígenos (S100+) nos grupos: 1 - leptospirose, 2 - sepse e 3 - trauma (SABC, 400x)

Células CD68+ encontram-se significativamente em número aumentado na PV e PB do grupo sepse em relação à leptospirose e ao trauma. Não houve diferenças entre os grupos leptospirose e trauma.

Gráfico 3. Avaliação quantitativa da imunomarcagem de células CD68+ nas polpas vermelha e branca nos casos de Leptospirose, Seps e Trauma.

Figura 11. Baço – reação imuno-histoquímica para macrófagos (CD68+) nos grupos: 1 -leptospirose, 2 - sepsis e 3 - trauma (SABC, 400x)

As células TCD4+ apresentaram-se em quantidade menor nos baços dos casos de leptospirose e sepse que no grupo trauma, tanto na PV quanto na PB ($p < 0,0001$). No grupo de leptospirose encontrou-se uma quantidade relativamente menor dessas células quando comparado com o grupo sepse ($p = 0,043$).

Grfico 4. Avaliao quantitativa da imunomarcao de clulas CD4+ nas polpas vermelha e branca nos casos de Leptospirose, Sepse e Trauma.

Figura 12. Baço – reação imuno-histoquímica para linfócitos TCD4+ nos grupos: 1 -leptospirose, 2 - sepse e 3 - trauma (SABC, 400x)

As células TCD8+ estiveram em quantidade semelhante ao controle trauma, na PV e PB, porém diminuídas no tecido esplênico dos casos de sepse quando comparadas com o grupo trauma ($p<0,01$).

Gráfico 5. Avaliação quantitativa da imunomarcacão de células CD8+ nas polpas vermelha e branca nos casos de Leptospirose, Sepse e Trauma.

Figura 13. Baço – reação imuno-histoquímica para linfócitos TCD8+ nos grupos: 1-leptospirose, 2 - sepse e 3 - trauma (SABC, 400x)

O grupo leptospirose apresentou uma quantidade maior de células B na PV que no grupo sepse ($p=0,02$) e trauma ($0,006$).

Gráfico 6. Avaliação quantitativa da imunomarcagem de células CD20+ nas polpas vermelha e branca nos casos de Leptospirose, Sepse e Trauma.

Figura 14. Baço – reação imuno-histoquímica para linfócitos B (CD20+) nos grupos: 1-leptospirose, 2 - sepse e 3 - trauma (SABC, 400x)

Houve menor grau de apoptose nos grupos de leptospirose e sepse que no grupo trauma na PB. Na PV, a apoptose foi significativamente diminuída nos grupo leptospirose em relação ao trauma não havendo diferenças entre os grupos de sepse e trauma.

Gráfico 7. Avaliação quantitativa da imunomarcagem de células apoptóticas nas polpas vermelha e branca nos casos de Leptospirose, Sepse e Trauma.

Figura 15. Baço – reação imuno-histoquímica para células apoptóticas (caspase 3+) nos grupos: 1- leptospirose, 2 - sepse e 3 - trauma (SABC, 400x)

Tabela 4: Resultados quantitativos da expressão tecidual de células imune no baço de pacientes com leptospirose com choque, sepse e trauma

	Leptospirose (11 casos)	Sepse (10 casos)	Trauma (12 casos)	Valor P
NK PV	19,20 (16,0-26,40)	17,6 (2,4-73,6)	90,40 (73,6-173,6)	^r p=0,0003 ^a p<0,0001 ^b p=0,97 NS ^c p=0,0062
	PB	24,0 (18,40-61,60)	5,6 (0,0-32,80)	135,2 (92,8-198,4)
CD68 PV	598,4 (153,6-898,4)	1075 (712,0-1411)	308,0 (224,0-350,4)	^r p=0,0007 ^a p=0,052 NS ^b p=0,0184 ^c p=0,0005
	PB	192,0 (153,6-325,6)	547,20 (404,8-628,0)	148,0 (68,8-184,0)
S100 PV	686,4 (390,4-1040)	54,4 (12,8-125,6)	4,8 (6,4-8,0)	^r p<0,0001 ^a p<0,0001 ^b p=0,0003 ^c p=0,0001
	PB	214,4 (81,60-288,8)	10,4 (0,8-19,2)	8,8 (1,6-24,0)

	Leptospirose (11 casos)	Sepse (10 casos)	Trauma (12 casos)	Valor P
Caspase 3 PV	4,8 (1,60-17,60)	15,2 (6,40-40,80)	37,6 (8,80-71,20)	^f $p=0,029$ ^a $p=0,016$ ^b $p=0,08$ NS ^c $p=0,26$ NS
	0,0 (0,0-5,6)	3,2 (2,4-14,4)	62,4 (29,6-103,2)	^f $p=0,0002$ ^a $p=0,0006$ ^b $p=0,1$ NS ^c $p=0,0011$
TCD4+ PV	78,40 (57,60-237,60)	185,6 (90,40-411,2)	624,0 (528,0-846,4)	^f $p<0,0001$ ^a $p<0,0001$ ^b $p=0,044$ ^c $p=0,0003$
	1835,0 (1367,0-2376,0)	1850,0 (1420,0-2307,0)	5118,0 (3925,0-6040,0)	^f $p<0,0001$ ^a $p<0,0001$ ^b $p=0,69$ NS ^c $p<0,0001$
TCD8+ PV	412,8 (260,0-1493,0)	70,40 (49,60-298,40)	583,2 (340,8-761,6)	^f $p=0,0011$ ^a $p<0,689$ NS ^b $p=0,0035$ ^c $p=0,0008$
	865,6 (509,6-1024,0)	148,0 (62,40-188,0)	835,20 (564,0-1268,0)	^f $p<0,0001$ ^a $p=0,51$ NS ^b $p=0,0002$ ^c $p<0,0001$

	Leptospirose (11 casos)	Sepse (10 casos)	Trauma (12 casos)	Valor P
CD20 PV	188,8 (143,2-284,0)	76,80 (39,20-158,40)	36,0 (23,2-75,2)	¹ $p < 0,0084$ ^a $p = 0,0082$ ^b $p = 0,0221$ ^c $p = 0,176$ NS
PB	2163,0 (2011,0-2798,0)	2525,0 (2082,0-3097,0)	1541,0 (1287,0-1900,0)	¹ $p < 0,0001$ ^a $p = 0,0035$ ^b $p = 0,231$ NS ^c $p = 0,0022$

*Dados expressos em mediana e em parênteses, percentis 25% e 75%

¹ p : valor de p comparando os três grupos (leptospirose, seps e trauma) como determinado pelo teste de Kruskal-Wallis.

^a p : valor de p comparando o grupo leptospirose com o grupo trauma (teste Mann-Whitney).

^b p : valor de p comparando o grupo leptospirose com o grupo seps (teste Mann-Whitney).

^c p : valor de p comparando o grupo seps com o grupo trauma (teste Mann-Whitney).

NS – não significante

6.3.2. Expressão de citocinas in situ no baço

Os dados relativos à análise quantitativa da expressão de citocinas no tecido esplênico dos casos do estudo estão apresentados nos gráficos 8-16; nas figuras 16-24; na tabela 5 e nos anexos 9, 10 e 11.

A expressão de TNF α esteve significativamente aumentada no grupo leptospirose em relação aos controles de sepse e trauma, tanto na PV quanto na PB.

Gráfico 8. Avaliação quantitativa da imunomarcação de células com expressão de TNF-alfa nas polpas vermelha e branca nos casos de Leptospirose, Seps e Trauma.

Figura 16. Baço – reação imuno-histoquímica para células com expressão de TNF-alfa nos grupos: 1 - leptospirose, 2 - sepse e 3 - trauma (SABC, 400x)

A expressão tecidual foi mínima das citocinas Th1 (IFN γ , IL1, IL2 e IL6) nos baços dos três grupos estudados, não havendo diferenças entre os mesmos. Exceção, da IL-12 que mostrou expressão significativamente aumentada na PV do grupo leptospirose em relação ao grupo trauma.

Gráfico 9. Avaliação quantitativa da imunomarcação de células com expressão de IFN-gama nas polpas vermelha e branca nos casos de Leptospirose, Seps e Trauma.

Gráfico 10. Avaliação quantitativa da imunomarcagem de células com expressão de IL-1 nas polpas vermelha e branca nos casos de Leptospirose, Sepse e Trauma.

Gráfico 11. Avaliação quantitativa de células com expressão de IL-2r nas polpas vermelha e branca nos casos de Leptospirose, Sepse e Trauma.

Gráfico 12. Avaliação quantitativa de células com expressão de IL-6 nas polpas vermelha e branca nos casos de Leptospirose, Seps e Trauma.

Gráfico 13. Avaliação quantitativa de células com expressão de IL-12 nas polpas vermelha e branca nos casos de Leptospirose, Seps e Trauma.

Figura 17. Baço – reação imunohistoquímica para células com expressão de IFN-gama nos grupos: 1 - leptospirose, 2 - sepse e 3 - trauma (SABC, 400x)

Figura 18. Baço – reação imunohistoquímica para células com expressão de IL-1 nos grupos: 1 - leptospirose, 2 - sepse e 3 - trauma (SABC, 400x)

Figura 19. Baço – reação imunohistoquímica para células com expressão de IL-2 nos grupos: 1 - leptospirose, 2 - sepse e 3 - trauma (SABC, 400x)

Figura 20. Baço – reação imunohistoquímica para células com expressão de IL-6 nos grupos: 1 - leptospirose, 2 - sepse e 3 - trauma (SABC, 400x)

Figura 21. Baço – reação imunohistoquímica para células com expressão de IL-12 nos grupos: 1 - leptospirose, 2 - trauma (SABC, 400x)

Na PV e na PB a quantidade de células marcadas para IL-4 foi semelhante nos grupos leptospirose e trauma ($p=0,47$). O grupo sepse apresentou expressão menor dessa citocina quando comparado com os grupos leptospirose ($p=0,035$) e trauma ($p=0,044$).

O número de células com expressão de IL-10 estava significativamente aumentado na PV e PB dos baços dos grupos infecciosos em relação ao trauma.

A expressão de TGF β foi semelhante na PV e PB dos baços do grupo leptospirose e trauma. Apenas na PV o grupo sepse revelou expressão aumentada de TGF β em relação ao grupo leptospirose ($p=0,0184$) e trauma ($p=0,0041$).

Gráfico 14. Avaliação quantitativa de células com expressão de IL-4 nas polpas vermelha e branca nos casos de Leptospirose, Sepse e Trauma.

Gráfico 15. Avaliação quantitativa de células com expressão de IL-10 nas polpas vermelha e branca nos casos de Leptospirose, Sepse e Trauma.

Gráfico 16. Avaliação quantitativa de células com expressão de TGF-beta nas polpas vermelha e branca nos casos de Leptospirose, Sepse e Trauma.

Figura 22. Baço – reação imunohistoquímica para células com expressão de IL-4 nos grupos: 1 - leptospirose, 2 - sepse, 3 - trauma (SABC, 400x)

Figura 23. Baço – reação imunohistoquímica para células com expressão de IL-10 nos grupos: 1 - leptospirose, 2 - sepse, 3 - trauma (SABC, 400x)

Figura 24. Baço – reação imunohistoquímica para células com expressão de TGF-beta nos grupos: 1 - leptospirose, 2 - sepse, 3 - trauma (SABC, 400x)

Tabela 5: Resultados quantitativos da expressão tecidual de citocinas no baço de pacientes com leptospirose com choque, sepse e trauma

	Leptospirose (11 casos)	Sepse (10 casos)	Trauma (12 casos)	Valor P
TNFα				^f $p=0,0021$
				^a $p=0,0014$
PV	22,40 (12,80-32,40)	4,0 (0,8-17,6)	2,40 (0,0-5,6)	^b $p=0,0166$ ^c $p=0,233$ NS
PB	32,0 (0,0-100,0)	0,0 (0,0-0,80)	0,0 (0,0-2,40)	^f $p=0,0001$ ^a $p=0,0011$ ^b $p=0,0008$ ^c $p=0,2933$
IFNγ				^f $p=0,68$
				^a $p=0,949$ NS
PV	0,0 (0,0-4,0)	0,0 (0,0-1,60)	0,0 (0,0-3,20)	^b $p=0,56$ NS ^c $p=0,54$
PB	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	^f $p=0,63$ ^a $p=0,97$ NS ^b $p=NA$ ^c $p=NA$
IL1				^f $p=0,054$
				^a $p=0,77$ NS
PV	0,0 (0,0-0,0)	0,8 (0,0-2,40)	0,0 (0,0-0,0)	^b $p=0,093$ NS ^c $p=0,14$ NS
PB	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	^f $p=0,97$ ^a $p<0,97$ ^b $p=1,0$ NS

				^c $p=0,944$ NS
	Leptospirose (11 casos)	Sepse (10 casos)	Trauma (12 casos)	Valor P
IL2 PV	0,0 (0,0—24,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,80)	^r $p=0,515$ ^a $p=0,87$ NS ^b $p=0,44$ NS ^c $p=0,53$ NS
PB	0,0 (0,0-3,2)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-1,60)	^r $p=0,15$ ^a $p=0,87$ NS ^b $p=NA$ ^c $p=NA$
IL6 PV	3,2 (1,6-11,20)	0,0 (0,0-0,0)	1,6 (0,0-6,4)	^r $p<0,0021$ ^a $p=0,40$ NS ^b $p=NA$ ^c $p=NA$
PB	0,0 (0,0-4,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-1,60)	^r $p=0,11$ ^a $p=0,85$ NS ^b $p=NA$ ^c $p=NA$
IL12 PV	8,0 (4,80-14,40)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	^r $p<0,0001$ ^a $p=0,0031$ ^b $p=NA$ ^c $p=NA$
PB	0,0 (0,0-2,40)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-1,60)	^r $p=0,076$ ^a $p=0,87$ ^b $p=NA$ ^c $p=0,15$ NS

	Leptospirose (11 casos)	Sepse (10 casos)	Trauma (12 casos)	Valor P
IL4	11,20	0,00	1,60	^r $p=0,034$
PV	(0,0-49,60)	(0,00-0,80)	(0,00-12,00)	^a $p=0,047$ NS ^b $p=0,035$ ^c $p=0,044$
PB	0,00	0,00	1,60	^r $p<0,014$
	(0,00-24,80)	(0,00-0,00)	(0,00-5,60)	^a $p=0,97$ NS ^b $p=NT$ ^c $p=NA$
IL10	33,60	83,20	0,0	^r $p<0,0001$
PV	(28,80-64,16)	(38,40-152,0)	(0,0-0,80)	^a $p=0,0006$ ^b $p=0,024$ ^c $p=0,0002$
PB	20,80	32,0	0,0	^r $p=0,0002$
	(15,20-52,80)	(13,60-66,40)	(0,0-0,80)	^a $p=0,0006$ ^b $p=0,4811$ NS ^c $p=0,0009$
TGFβ	83,20	212	32	^r $p=0,003$
PV	(58,40-156,0)	(118,4-266,4)	(8,0-80,8)	^a $p=0,056$ NS ^b $p=0,0184$ ^c $p=0,0041$
PB	86,40	117,6	81,60	^r $p=0,43$
	(64,0-207,2)	(71,60-199,20)	(25,60-124,0)	^a $p=0,37$ NS ^b $p=0,91$ NS ^c $p=0,2226$ NS

*Dados expressos em mediana e em parêntesis, os percentis 25% e 75%

¹*p*: valor de *p* comparando os três grupos (leptospirose, sepse e trauma) como determinados pelo teste de Kruskal-Wallis.

^a*p*: valor de *p* comparando o grupo leptospirose com o grupo trauma (teste Mann-Whitney).

^b*p*: valor de *p* comparando o grupo leptospirose com o grupo sepse (teste Mann-Whitney).

^c*p*: valor de *p* comparando o grupo sepse com o grupo trauma (teste Mann-Whitney).

NS – não significativa

NA – não se aplica

7. Discussão

1- A leptospirose grave com choque cardiovascular tem comportamento clínico semelhante com a sepse/choque séptico causados por bactérias Gram-positivas/-negativas.

Os dados apresentados na tabela 1 demonstram que os pacientes com leptospirose incluídos nesse estudo apresentaram quadro clínico e laboratorial condizente com os critérios definidores de choque séptico: febre, taquicardia, hipotensão requerendo o uso de drogas vasoativas, leucocitose e disfunção de órgãos vitais (Bone et al, 1992; Dellinger et al, 2008). Foram selecionados 11 casos de leptospirose grave com choque e SPHS, a maioria homens adultos jovens, que viviam em condições sanitárias precárias, demonstrando preditores de um desfecho desfavorável, à admissão hospitalar. Esses fatores de risco de morte na evolução de um caso de leptospirose grave foram bem determinados em São Paulo e incluem choque cardiovascular, insuficiência respiratória com uso de ventilação mecânica, idade acima de 40 anos, creatinina e potássio séricos elevados, oligúria e plaquetopenia (Marotto et al, 1999; Spichler et al, 2008). Também, a gravidade dos casos pode ser aferida pela breve internação em cuidados intensivos, necessidade de hemodiálise, uso de drogas vasoativas e pelo alto escore APACHE II, cuja mediana foi de 23,5, que corresponde a uma taxa de sobrevida de apenas 30% (Knaus et al, 1985). A principal *causa mortis* destes pacientes foi a hemorragia pulmonar

maciça acompanhada de disfunção de múltiplos órgãos devido ao choque refratário.

A leptospirose não é incluída entre as causas clássicas de choque séptico na literatura médica, embora casos graves preencham os critérios clínicos e laboratoriais definidores de sepse/choque séptico. Formas graves de leptospirose - doença de Weil com hemorragia pulmonar e choque - são raras em áreas não endêmicas, mas são freqüentes em países onde a doença se comporta como uma endemia como Índia, Tailândia, Peru e Brasil (Nicodemo et al, 1997; Chierakul et al, 2008; Ko et al, 2009). Acreditamos que a leptospirose é uma causa de choque séptico nestas regiões geográficas, com aspectos clínicos, laboratoriais e desfechos similares ao choque causado por bactérias Gram-positivas/-negativas como o observado em nossa casuística.

Para alguns autores, como Andrade et al (2007a), a leptospirose pode ser vista do ponto de vista clínico e laboratorial como um “modelo perfeito de sepse”, uma vez que a doença afeta, geralmente, um grupo uniforme de pacientes composto de homens jovens, sem comorbidades prévias. Inversamente, a sepse/choque séptico por bactérias Gram-positivas/negativas apresenta diversidade dentro de sua casuística, com grande heterogeneidade dos pacientes quanto ao sexo, idade, patologias de base, agentes etiológicos e órgãos acometidos pela infecção, o que certamente influencia os resultados de ensaios de diagnóstico, tratamento e prognóstico. Como exemplo, durante a década de 90, *trials* fracassaram em diminuir a mortalidade na sepse/choque séptico ao

proporem a atenuação da resposta inflamatória, por meio de bloqueadores de TNF α e de IL-1 (Abraham et al, 1995; Opal et al, 1997). Muito do insucesso desses estudos foi atribuído à falta de homogeneidade dos casos de sepse quanto às características demográficas, patologias de base e ao tipo de infecções apresentadas. No entanto, esses desacertos iniciais permitiram o surgimento das primeiras hipóteses de que, ao contrário do que se pensava, na sepse/choque séptico um estado imunossupressor desenvolve-se ao longo da doença (Hotchkiss e Karl, 2003). A imunossupressão da sepse/choque séptico seria o responsável pelo óbito do paciente, causando uma incapacidade do paciente de curar-se da infecção inicial e de permitir a aquisição de outras infecções durante os cuidados intensivos como, por exemplo, infecções por bactérias Gram-negativas nosocomiais (Rajan e Sleight, 1997) , vírus *Herpes simplex* (Luyt et al, 2007) e CMV (Limaye et al, 2008). Essa condição caracteristicamente desenvolve-se por volta do quarto ao sétimo dia de doença e se agrava quando novas infecções são adquiridas (Hotchkiss e Karl, 2003). Neste estudo, os casos de leptospirose tiveram uma breve estadia hospitalar (mediana de dois dias), porém deve-se acrescentar o tempo decorrido entre o início dos sintomas e a admissão hospitalar, que teve uma mediana de cinco dias. É possível que este intervalo de tempo tenha influído no desfecho letal dos casos, com atraso na instituição terapêutica de antibióticos e hidratação intravenosa, além de fatores inerentes ao indivíduo e ao agente.

Os pacientes da presente investigação receberam o tratamento para choque séptico e para leptospirose padronizados de acordo com a

época da internação no Hospital das Clínicas da FMUSP e no Hospital Universitário da USP. Durante a última década, a terapia da sepse/choque séptico empregou a reposição volêmica intravenosa, antibioticoterapia, infusão de drogas vasoativas em caso de choque, ventilação mecânica protetora com baixos volumes correntes e com altos níveis de pressão expiratória positiva, quando há lesão pulmonar aguda e a diálise se houver disfunção renal (Amato et al, 1998; Andrade, et al 2007, Dellinger et al, 2008). Todos os pacientes deste estudo receberam ceftriaxone como antibioticoterapia específica, mesmo com um relato de vários dias de sintomas antes da admissão hospitalar (mediana de cinco dias). Na leptospirose, o benefício do tratamento antibiótico instituído após quatro dias de doença não é demonstrado de forma inequívoca, provavelmente devido ao pequeno número de pacientes incluídos nos *trials* disponíveis (Guidugli et al, 2000). Igualmente, alguns autores alegam que na fase tardia da leptospirose o grau de lesões orgânicas associa-se mais fortemente associado à resposta imune e inflamatória do hospedeiro, deflagradas no início da enfermidade, que à ação em si de leptospirosas (Faine et al, 1999; Levett, 2001). Entretanto, uma evidência experimental recente demonstrou o benefício do uso de ampicilina em hamsteres infectados, com reversão da disfunção tubular renal mesmo quando instituída tardiamente no curso do experimento (Spichler et al, 2007). Na nossa casuística, demonstramos a presença de antígeno de leptospirosas no baço em um cenário de esplenite aguda. Com este dado, não se pode excluir a participação do agente no curso das lesões da leptospirose grave. Assim sendo e considerando-se a

leptospirose grave como uma verdadeira sepse, a não instituição de antibiótico, na fase de evolução mais tardia da doença, iria contra um dos preceitos da terapêutica em doenças infecciosas - o controle obrigatório do foco infeccioso e a antibioticoterapia direcionada contra o agente (Dellinger et al, 2008). Serão necessários estudos prospectivos para avaliar a dinâmica do agente nas diferentes fases evolutivas da doença, principalmente nos casos fulminantes de leptospirose, através de hemocultura de sangue periférico e métodos de quantificação molecular.

Um importante avanço na terapia da leptospirose foi determinado recentemente por Andrade et al (2007a) através do tratamento dialítico diário e precoce, com impacto na redução da mortalidade. Alguns casos do presente estudo receberam tal terapêutica, de acordo com as rotinas dos serviços nos quais estavam hospitalizados, embasadas no protocolo da pesquisa citada (Andrade et al, 2007a). Ressalte-se que dois pacientes não puderam se submeter à hemodiálise devido à hipotensão profunda, refratária a altas doses de drogas vasoativas, contra-indicando o procedimento terapêutico.

Ao contrário do fracasso da terapia imunomoduladora da resposta inflamatória na sepse/choque séptico, o tratamento com imunossuppressores vem sendo empregado com sucesso na diminuição da alta mortalidade da leptospirose com SPHS (Shenoy et al, 2006; Triverdi et al, 2009, 2010). No passado, tal intervenção nesta doença infecciosa não obteve êxito em demonstrar benefícios, pelo pequeno número de pacientes incluídos nos estudos, porém, ensaios randomizados recentes, com

metilprednisolona, ciclofosfamida e plasmaférese, demonstraram uma diminuição significativa da mortalidade na leptospirose com insuficiência respiratória por SPHS. É certo que a leptospirose deve apresentar diferenças com a sepse/choque séptico causado por outras bactérias que favoreceram esses bons resultados, seja pelas características da população afetada e sua suscetibilidade, seja por peculiaridades do quadro clínico ou seja por propriedades inerentes à *Leptospira sp.* e sua interação com o hospedeiro durante o processo patogênico. Entretanto, o tratamento imunomodulador ainda não se encontra consensualmente em uso em nosso meio. Um dos grandes desafios para tal é a decisão de instituir essa modalidade terapêutica quando há a possibilidade de outros diagnósticos diferenciais, que podem ser agravados com a imunossupressão. Certamente, uma medida que poderia estender os benefícios do tratamento com imunossupressores para nossos pacientes seria a implantação de protocolos de atendimento para pacientes com febres hemorrágicas em nossas instituições de saúde, considerando o emprego de testes de diagnóstico rápido (Croda et al., 2007) já desenvolvidos para leptospirose. Outros tratamentos com imunomoduladores serão discutido adiante.

2- O aspecto histopatológico do baço, à necropsia de casos de leptospirose grave, assemelha-se aos achados da sepse/choque séptico por meio de sinais de disfunção endotelial, esplenite aguda e atrofia folicular.

Os estudos de necrópsias em leptospirose são poucos, em geral descritivos e sem estudo da imunidade tecidual (Areal, 1962; De Brito et al, 1967; Comby et al., 1969; Salkade et al, 2005; Chakurkar et al, 2008). As lesões esplênicas da leptospirose humana foram delineadas por Areal (1962) e Comby et al. (1969), enquanto que na leptospirose experimental, foram estudadas por Muensoongnoen et al (2005) em hamsteres infectados por *Leptospira interrogans* serovar pyrogenes. Estes autores demonstraram que o baço encontra-se de volume normal ou aumentado, com congestão sinusoidal, áreas de hemorragias extensas do parênquima, focos de necrose celular, grânulos de hemossiderina, hiperplasia de células reticulares com eritrofagocitose, infiltrado celular composto por neutrófilos, plasmócitos e eosinófilos. Apenas Comby et al (1969) descreve a PB esplênica, com atrofia de folículos e hemorragias nestas áreas em alguns casos.

O estudo atual é original, pois revê os fenômenos patológicos do baço em casos graves de leptospirose com SPHS e choque cardiovascular, fazendo um paralelo entre tais eventos com aqueles demonstrados por pacientes com choque séptico por bactérias Gram-positivas/negativas, através de análise semi-quantitativa das alterações da histologia esplênica e do emprego da metodologia de imunohistoquímica para caracterização da resposta imune *in situ*. Nossos resultados demonstram uma forte similaridade entre leptospirose e sepse quanto ao aspecto histológico e imunopatológico do baço, com diferenças significantes desses dois grupos infecciosos em relação aos controles normais (grupo trauma).

Verificamos como os autores Arean (1962), Comby et al (1969) e Muensoongnoen et al (2005) que a leptospirose e a sepse determinam um padrão de esplenite aguda. Encontramos células reticulares com hiperplasia e hipertrofia, número aumentado de macrófagos, eritrofagocitose moderada, infiltrado inflamatório com neutrófilos, eosinófilos e plasmócitos, além de focos de hematopoiese extra-medular. Congestão difusa e áreas de hemorragia ocorreram de forma bem pronunciada em relação aos controles normais. As células endoteliais das arteríolas centrais da PB demonstraram sinais de ativação na leptospirose, porém sem necrose das mesmas. Em contraste, o grupo de sepse apresentou o mesmo padrão de endotélio ativado, mas com dois casos de necrose endotelial e trombose. Futuros estudos são necessários para aprofundar o conhecimento sobre a disfunção do endotélio vascular na leptospirose, através da expressão de moléculas de adesão (VCAM e E-selectina) em amostras de tecidos e da caracterização das alterações hemodinâmicas da microvasculatura, que levam ao choque distributivo.

Pacientes com leptospirose e sepse tiveram uma marcante atrofia dos folículos da PB esplênica, com baixa densidade celular nas regiões T-/B- dependentes. Este achado, por si só, sugere um comprometimento da imunidade adaptativa nestas duas doenças infecciosas, com repercussões nos linfócitos B com prejuízo da resposta de anticorpos efetores, bem como nas células TCD4+ auxiliares, a ativação de macrófagos e a indução de uma resposta Th1 (Cesta, 2006; Delves e Roitt, 2000b).

A IH para antígeno de *Leptospira* mostrou um padrão granular de positividade, distribuído difusamente na PV e PB, tanto extracelular quanto intracelular (macrófagos, células reticulares e células endoteliais). A grande quantidade de antígenos de leptospiros presente no baço, marcando diferentes tipos celulares, sugere alta carga bacteriana infectante e indica que os mesmos têm um papel importante na patogenia da leptospirose com choque séptico. Este resultado, até o conhecimento dos autores, é a primeira demonstração na literatura médica de antígeno de leptospiros no baço, por meio de IH, previamente bem documentado no fígado, rins, coração, pulmão, músculo esquelético e cardíaco (De Brito et al, 1987; Alves et al, 1992; Uip et al, 1992; Nicodemo et al, 1997).

Diversas tentativas foram feitas no laboratório da Disciplina de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da FMUSP para demonstrar a presença de DNA de leptospiros no tecido esplênico, bem como quantificá-lo. Infelizmente, ainda não se obteve sucesso. Esse tipo de investigação nestas amostras seria importante, pois responderia a questão ainda em aberto, da participação da carga bacteriana infectante na patogênese da leptospirose grave com choque e SPHS (Silva et al, 2002). Até o momento, foi demonstrado no Peru um caso fulminante de SPHS que se associou a grande quantidade de DNA de leptospiros amplificado do tecido pulmonar, correlacionando-se com uma grande quantidade de bactérias infectantes (Segura et al, 2005).

3- *A leptospirose humana grave com choque cardiovascular e SPHS apresentam um comprometimento da imunidade inata aferida no baço e traduzida por uma baixa quantidade de células Natural Killer e baixa expressão de IFN γ .*

Os casos do grupo de leptospirose e do grupo sepse apresentaram uma quantidade expressivamente menor de células NK quando comparados com o grupo trauma, demonstrando nessas duas doenças um comprometimento profundo do início da resposta imune (Delves e Roitt, 2000a).

Este estudo apresenta, pela primeira vez na literatura pesquisada, uma avaliação de células NK em casos de leptospirose humana grave, antes somente realizada no homem *ex vivo* (Klimpel et al, 2003) ou de forma indireta, por meio de dosagem sérica de granzimas (De Fost et al, 2007). As células NK são as principais células de defesa da imunidade inata por terem atividade citotóxica contra bactérias extracelulares e por secretarem IFN γ , que irá estimular a ativação e ação de fagocitose dos macrófagos, a apresentação de antígenos e a atividade citotóxica de linfócitos TCD8+ (Delves e Roitt, 2000a e 2000b; Van der Poll e Opall, 2008). Na literatura médica, há diversos dados sobre o papel de células NK na sepse/choque séptico. Precocemente na sepse grave, é descrito que pacientes apresentam linfopenia (à custa da diminuição de células TCD4+ por apoptose) e aumento de células NK, quando comparados com controles. Entretanto, somente aqueles com mais de 20% de células NK no sangue

periférico apresentam um prognóstico melhor (sem evolução para choque séptico e maior sobrevida) que aqueles com nível menor de NK (Giamarellos-Bourboulis et al, 2006). Em estudo prospectivo recente Venet, et al (2010), mostraram que as alterações em leucócitos na sepse grave (inclusive células NK) ocorrem precocemente desde o início do quadro, mantendo-se por um período de 48 horas. Essa informação sobre a cinética celular na sepse grave é importante, pois nesse período em que tais alterações mantêm-se estáveis, permitir-se-ia a instituição de uma intervenção imunomoduladora, na tentativa de reverter um estado imunossupressor e a progressão para a disfunção de múltiplos órgãos. Um candidato imunomodulador na sepse é a IL-15, ainda sob investigação, mas com bons resultados em nível experimental (Inoue et al, 2010). A citocina IL-15 tem atuação essencial no desenvolvimento e sobrevida de células NK, na maturação de células dendríticas, no desenvolvimento de células $\gamma\delta$ e de linfócitos intra-epiteliais intestinais e na manutenção de células T de memória (Ohteki et al, 2002).

Retomando a leptospirose, alguns estudos demonstram que as células NK podem ser ativadas no início da resposta imune do hospedeiro e, apesar de poucos dados disponíveis parecem ser células essenciais no controle da doença. As células NK de PBMC em cultura de indivíduos sadios e do gado bovino proliferam após estímulo com alta carga de leptospirosas virulentas, produzindo IFN γ (Naiman et al, 2001; Klimpel et al, 2003). Estudo realizado na Tailândia, região endêmica da leptospirose, avaliou indiretamente células citotóxicas, por meio da dosagem sérica de Granzima

B, IP-10 e Mig, os quais se encontraram em níveis elevados, no início da doença (De Fost et al, 2007). Entretanto, não foram explicitados os dados clínicos dos 44 casos de leptospirose incluídos, bem como não houve correlação entre os níveis séricos de tais mediadores com os parâmetros clínicos e a evolução dos pacientes. Ademais, a dosagem de granzimas não particulariza o tipo de células citotóxicas (Delves e Roitt, 2000a). Quanto à leptospirose experimental, a administração do hormônio FTS (Serum Thymic Factor) em gerbilos aumentou a atividade citotóxica de células NK, atenuando a gravidade das lesões renais e melhorou a sobrevivência dos animais. Esse dado indicaria que as células NK são importantes no controle das lesões de órgãos-alvos, influenciando na evolução da doença neste modelo experimental (Yukawa et al, 1994). Poderíamos inferir que a diminuição de células NK influenciou a baixa expressão de IFN γ encontrada nas nossas amostras e afetaria o desfecho letal dos casos de leptospirose?

Como perspectivas futuras para o estudo atual, a análise da expressão de IL-15 e de granzimas (e avaliação do fenótipo das células que as expressam), por meio de IH no baço, poderia ser determinada neste ambiente de imunossupressão esplênica, o que traria informações importantes sobre a ativação inicial do sistema imune e sobre a ação citotóxica de células NK.

4- O comportamento dos macrófagos esplênicos e de citocinas pró-inflamatórias na leptospirose grave

Nos casos de leptospirose, as células CD68+ (macrófagos ativados) encontraram-se em número equivalente aos casos de trauma, e em número significativamente inferior em relação aos casos de sepse. Na sepse/ choque séptico, os macrófagos são células que apresentam disfunção, porém não ocorre intensa morte celular por apoptose como as células TCD4+, CD20+ e células dendríticas, o que justificaria o aumento de macrófagos no grupo sepse (Hotchkiss et al, 2002).

Na leptospirose, os macrófagos humanos e de animais foram anteriormente estudados apenas em ensaios *ex vivo* para avaliar a fagocitose de leptospiros opsonizadas por anticorpos específicos (Wang et al, 1984) ou para determinar a apoptose e necrose destas células após contato com leptospiros (Li et al, 2005; Li et al, 2007; Jin et al, 2009; Li et al, 2010). A apoptose de macrófagos humanos por leptospiros virulentas pode ser um mecanismo de evasão do agente ao às defesas do hospedeiro, permitindo sua disseminação, além de determinar uma polarização Th2 da resposta imune (Voll et al, 1997; Barker et al, 1999; Jin et al, 2009). A contagem de macrófagos CD68+ nos baços de casos de leptospirose foi equivalente ao grupo controle, enquanto que no grupo sepse encontraram-se aumentados. Não observamos nas amostras de baço dos casos de leptospirose uma quantidade significativa de corpos apoptóticos, que

pudesse explicar o não aumento de macrófagos ativados *in situ* frente a uma infecção aguda grave. É possível que a baixa densidade de células CD68+ no grupo leptospirose, deva-se ao comprometimento de células NK e do IFN γ diminuído (Delves e Roitt, 2000a; Van der Poll e Opal, 2008).

Demonstramos expressão significativamente aumentada de TNF α nos baços nos casos de leptospirose em relação aos grupos sepse e grupo trauma. A baixa expressão tecidual de IFN γ no tecido esplênico e de outras citocinas pró-inflamatórias e Th1 como IL-6, IL-1 β , IL-2R e IL-12 indica um estado de imunossupressão nos dois grupos infecciosos, comprometendo a ativação de macrófagos, células dendríticas e linfócitos (Wardle, 1987; Delves e Roitt, 2000a e 2000b; Van der Poll e Opal, 2008) .

Este estudo demonstra pela primeira vez a avaliação da expressão *in situ* de citocinas pró- e anti- inflamatórias em amostras teciduais de casos de leptospirose grave. Os estudos sobre citocinas na leptospirose descreveram principalmente a secreção *in vitro* de TNF α , IFN γ , IL-6 e IL-12 pelas PBMC de humanos e animais, após estímulos com leptospiras vivas virulentas (Klimpel et al, 2003; Gaudart et al, 2007; Tuero et al, 2010), peptidoglicanos (Cinco et al , 1996) e GLP de *L.interrogans* (Diament et al, 2002) ou no soro de pacientes na fase aguda da infecção (Tajiki e Salomão, 1996). Inversamente, na sepse por bactérias Gram-positivas/-negativas, essas citocinas foram extensamente estudadas em soro de pacientes e de animais, tanto a cinética quanto a correlação com a

evolução clínica, sendo algumas utilizadas inclusive como marcadores prognósticos.

O TNF- α , é um dos primeiros mediadores da sepse, secretado principalmente por monócitos e macrófagos teciduais (Delves e Roitt, 2000a; Van der Poll e Opal, 2008). Níveis plasmáticos elevados de TNF- α , no início da sepse, estão bem correlacionados com aumento de mortalidade (Hesse et al, 1988). A ação do TNF α é de induzir a produção de mediadores inflamatórios endógenos e a resposta fisiológica da sepse. A administração de bloqueadores de TNF α falhou em demonstrar benefícios em pacientes sépticos (Abraham et al, 1995).

A IL-1 foi extensamente estudada na sepse/choque séptico bacteriano durante a década de 80/90 e é considerada, como o TNF α , um mediador precoce da sepse, com papel biológico na indução de febre, taquicardia, taquipnéia, ativação de polimorfonucleares, macrófagos e aumento da secreção de TNF α , IL-4 e IL-6 (Dinarello, 1984). Como marcador de desfecho nas fases iniciais da sepse, a IL-1 apresenta conflitos, com estudos demonstrando que altos níveis séricos correlacionam-se com mau prognóstico (Calandra et al, 1990) e outros não (Friedland et al, 1996). A inibição de IL-1 na sepse, não obteve sucesso em reduzir a mortalidade de pacientes (Opal et al, 1997).

A IL-6 é uma citocina secretada por células mononucleares e endoteliais, é o principal estimulador da síntese hepática de proteínas de fase aguda, também aumenta a produção de imunoglobulinas e ativa células

T e NK (Marinkovic et al, 1989; Damas et al, 1996). Na sepse, como marcador de evolução clínica, vários estudos demonstraram que níveis séricos elevados de IL-6 estão associados com maior chance de óbito.

A citocina IL-2 é produzida por células T e células dendríticas após a apresentação de antígeno, potencializa a proliferação de células T específicas e de células B, a produção de anticorpos, a proliferação de células NK-T e o aumento da citotoxicidade (Burchill et al, 2007). A IL-2 não é abordada na sepse como um marcador de prognóstico e gravidade.

A IL-12 e IFN γ amplificam a resposta Th1. A IL-12 é secretada principalmente células dendríticas, por monócitos e macrófagos ativados e posteriormente por todas as células inflamatórias mononucleadas, após ativação. A ação desta citocina é crucial no organismo, com papel na ativação de células (NK, células T, macrófagos) e na potencialização mútua das mesmas (Karp et al, 1998). Na sepse, a IL-12 é a citocina chave para demonstrar o comprometimento da função de células dendríticas em iniciar a resposta Th1 (Benjamim et al, 2005; Wen et al, 2006; Flohe et al, 2006) .

O IFN γ é uma citocina definidora da resposta Th1, com efeitos importantes na ativação e proliferação de células TCD4 $^{+}$ e TCD8 $^{+}$, além de influenciar a imunidade inata ao estimular neutrófilos e macrófagos. A baixa secreção de IFN γ durante a fase de imunoparalisia da sepse/choque séptico é um dos pontos cruciais da síndrome, implicada na disfunção de linfócitos, monócitos e células dendríticas (Wardle et al, 1987; Ertel et al, 1995; Docke et al, 1997).

Na leptospirose, as descrições sobre citocinas apontam para uma resposta inicial Th1 da imunidade anti- *Leptospira*, tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro* (Diament et al, 2002; Dorigatti et al, 2005; Naiman et al, 2001; Klimpel et al, 2003; Tajiki e Salomão, 1996; Gaudart et al, 2008).

O TNF α é a citocina mais avaliada na leptospirose com resultados que demonstram ser o TNF α essencial no controle da lesão renal em camundongos *knockouts* e marcador de evolução clínica para pacientes com altos níveis séricos do mesmo (Athanasio et al, 2008a; Tajiki et al, 1996). O TNF α é secretado por diferentes tipos celulares *in vitro* após estímulo com *L.interrogans* como relatado em diversas publicações. Somente um estudo correlaciona níveis séricos desta citocina com prognóstico de casos de leptospirose. Tajiki et al (1996) demonstraram que pacientes com altos níveis séricos de TNF α , ou com alta relação sérica de TNF α /IL-10 nas primeiras 24 horas de internação, tiveram um prognóstico pior que aqueles com uma baixa relação sérica. Esse dado sugere que na leptospirose, à semelhança da sepse meningocócica, um estado hiperinflamatório inicial, mediado pelo TNF α , é deletério para a homeostase do organismo (Delves e Roitt, 2000a). Não foram encontrados polimorfismos genéticos de alelos para o TNF α em um estudo que incluiu casos leves de leptospirose provenientes de área não endêmica para a doença (Lingappa et al, 2004).

Sobre a IL-1 β na leptospirose, um experimento *ex vivo* realizado por Wagenaar et al, (2009), através de estímulo de sangue total e PBMC com leptospiras, demonstrou-se que a secreção dessa citocina na

doença grave, com hemorragias, foi muito baixa, não diferindo de controles. Sabe-se também que a proteína Sph2 de leptospiros virulentas induz em macrófagos e linfócitos de camundongos a expressão de IL-1 β , bem como IL-6 (Zhang et al, 2008).

A expressão do RNAm da IL-2 foi avaliada no tecido renal de hamsters infectados com *L.interrogans*, com resultado insignificante e que não diferiu do controle (Vernel-Pauillac et al, 2006).

Quanto a IL-12 na leptospirose, foi demonstrado que ocorre secreção aumentada em cultura de sangue humano total (De Fost et al, 2003) e por CD humanas após estímulo com diferentes cepas de leptospiros (Gaudart et al, 2008). A expressão de IL-12 RNAm foi aumentada nos rins de hamsters infectados com *L.pyrogenes* nas primeiras horas de infecção, demonstrando que é uma citocina precoce na resposta do hospedeiro (Vernel-Pauillac et al, 2006). Não encontramos na leptospirose grave referências sobre o comportamento da IL-12. Nossos resultados demonstraram uma alta expressão de IL-12 no grupo leptospirose, apenas na PV esplênica, ausente na PB. Acreditamos que este resultado ainda indica imunossupressão, como bem caracterizado no grupo sepse, onde a IL-12 foi ausente em todos os compartimentos do baço, uma vez que é na PB, que ocorre a apresentação de antígenos de células apresentadoras aos linfócitos (Delves e Roitt, 2000b).

Estudos demonstraram que a IL-6 é secretada por cultura de PBMC de indivíduos sadios, após estímulo com GLP de *L.interrogans* serovar

Copenhagueni, de forma dose-dependente e não relacionada com a LPS de leptospiros (Diament et al, 2002; Dorigatti et al, 2005). Em pacientes com leptospirose grave da Indonésia, os níveis de IL-6 estão aumentados, no sobrenadante de PBMC, coletado na admissão hospitalar, após estímulo com leptospiros virulentas (Wagenaar et al, 2009). Não temos dados na literatura consultada sobre a IL-6 na fase terminal da leptospirose grave. Demonstramos nesta pesquisa uma ausência de expressão *in situ* no baço, como parte de um estado de imunossupressão.

Quanto ao IFN γ na leptospirose, foi verificado que esta citocina é secretada por PBMC humano e de gado bovino após estímulo com leptospiros, e tem expressão do RNAm aumentada nos rins de hamsteres infectados por *L.pyrogenes* a partir das primeiras horas pós infecção (Naiman et al, 2001; Klimpel et al, 2003; Lowanitchapat et al, 2009) .

A expressão do RNAm da citocina IL-10 está aumentada e mantém-se tardiamente no sangue periférico (Vernel-Pauillac et al, 2006), rins (Lowanitchapat et al, 2009) e pulmões (Marinho et al , 2010) de hamsters infectados.

O comportamento *in situ* das citocinas, especialmente a diminuição das citocinas pró-inflamatórias e Th1 (IL-6, IFN γ , IL-1 β , IL-2r e IL-12) com aumento de IL-10 pronunciado, seguramente reflete o comprometimento predominante da imunidade inata na vigência de doença aguda e grave, como pudemos demonstrar no baço.

Quanto à IL-4 na leptospirose, camundongos *Knockout* para IL-4, não apresentaram diferenças quanto à gravidade histológica das lesões ou mortalidade em relação aos controles (Athanzio et al, 2008a). Em modelos de hamsteres a IL-4 é uma citocina que prevalece nos últimos dias do experimento, porém volta a cair no momento da morte dos animais (Vernel-Pauillac et al, 2006). Não encontramos um aumento significativo de IL-4 *in situ* nos baços dos casos de leptospirose. O TGF β igualmente prevalece ao final da infecção de hamsteres por leptospira patogênica, através do RNAm do TGF β pela TR-PCR (Lowanitchapat et al, 2009). No entanto, não encontramos uma expressão significativa dessa citocina *in situ* em nossos casos de leptospirose, quando comparados com controles.

Até o momento, não há descrição de dosagem sérica de citocinas em casos de leptospirose incluídos em ensaios terapêuticos, avaliando o perfil da resposta imune antes e após a instituição de tratamento, seja antibioticoterapia (Panaphut et al, 2003), sejam imunossupressores (Shenoy et al, 2006; Triverdi et al., 2001, 2009, 2010; Niwattayakul et al, 2010) ou seja hemodiálise (Andrade et al., 2007a). Faltam também estudos prospectivos que analisem uma conjunção de citocinas em casos de leptospirose de gravidade diversa, para que sejam determinados padrões na resposta imune, que certamente contribuiria para o diagnóstico de casos graves e para intervenções terapêuticas.

5- A interface entre a imunidade inata e adaptativa comprometida na leptospirose grave com choque e SPHS: células dendríticas em número preservado, porém baixa expressão tecidual de IL-12.

Neste estudo, as CD estão aumentadas nos grupos infecciosos em relação aos controles com trauma. No entanto, ocorre baixa expressão de citocinas essenciais - a IL-2 e IL-12, que secretadas por CD estimulariam outras células para amplificar a resposta Th1. A IL-12 estimula células NK, TCD4+ e TCD8+ a secretarem IFN γ , potencializando a ação destas células (Andrian e Mackay, 2000). Essa caracterização da resposta tecidual de CD é um dado inédito na leptospirose. Até o momento, somente um estudo *ex vivo* avalia o comportamento de CD obtidas de indivíduos sadios, que após estímulo com leptospirosas vivas secretam citocinas Th1 em grande quantidade (TNF α , IL-12p70) e pouca produção de IL-10 (Gaudart et al, 2008).

Utilizando como paralelo a sepse por bactérias Gram-positivas/-negativas, as células dendríticas encontram-se diminuídas nos baços obtidos por necropsia, por intensa apoptose (Hotchkiss et al, 1999; 2000; 2002; Tinsley et al, 2003). Em estudos experimentais, animais têm perda de CD no baço, pulmões e em linfonodos (Ding et al, 2004; Efron et al, 2004; Wen et al, 2006). O principal mecanismo de perda das CD é a apoptose tanto em humanos quanto em animais. Além disso, as CD são disfuncionais na sepse experimental polimicrobiana, polarizadas de forma persistente para Th2, produzindo baixa quantidade de IL-12 e alta secreção de IL-10 (Wen et al, 2006; Flohe et al, 2006).

Outras investigações são necessárias para esclarecer como outros receptores celulares ativam as CD (por exemplo, TLR), como ocorre o processamento intracelular de antígenos de leptospiros na CD e como ocorre a interação CD e célula T CD4+ para indução de uma resposta imune Th1 ou Th2.

6- No baço da leptospirose grave com choque e SPHS, há um cenário de “imunoparalisia” à semelhança da sepse/choque séptico com diminuição de células TCD4, baixa expressão de citocinas Th1 e alta expressão de IL-10.

Questionamos se a leptospirose grave com SPHS e choque cardiovascular poderiam ter elementos de imunossupressão como ocorre com choque séptico causado por bactérias Gram-positivas/ negativas, o que foi confirmado por nossos resultados: importante depleção de células T CD4+ na PB, diminuição significativa da expressão de IFN γ , alta expressão de IL-10 em comparação aos controles normais. Quanto às células T CD8+, estas foram encontradas na leptospirose em quantidade semelhante ao grupo controle, em contraposição ao grupo sepse, as quais estavam diminuídas tanto na PV quanto na PB. Este achado sugere que a atividade citotóxica linfocítica é afetada durante as infecções por bactérias Gram-positivas/negativas, mas não na leptospirose. No tocante aos linfócitos B, encontramos um aumento significativo destas nos dois grupos infecciosos em relação ao grupo controle (trauma). Os resultados acima correspondem

à primeira caracterização da imunidade adaptativa em casos de leptospirose com choque e SPHS.

Não está totalmente claro como ocorre a perda de células T CD4+ na leptospirose humana. Isogai et al (1998) demonstraram que a LPS de *L.interrogans* virulenta induz em camundongos aumento de TNF α sérico e também, apoptose de linfócitos esplênicos. Não foi encontrada no presente estudo, uma significativa quantidade de células apoptóticas em casos de leptospirose. Ao contrário, a apoptose no baço foi significativamente inferior no grupo leptospirose e sepse, quando comparados com o grupo controle de trauma. Este é um resultado da nossa investigação que precisa ser revisto. Em estudos de necrópsias de pacientes com choque séptico, Hotchkiss et al (1999, 2000, 2001, 2002) encontraram uma grande quantidade de apoptose de esplenócitos no baço, quando comparados com controles. É possível que a pouca apoptose encontrada nos casos infecciosos da nossa pesquisa seja devido a uma diferença da metodologia empregada, pois aqueles autores usaram o anticorpo anti-caspase-9 e a técnica do TUNEL, que marca ocasionalmente células necróticas, enquanto que utilizamos o anticorpo anti-caspase-3. Esses métodos apresentam rendimento divergente para a detecção de apoptose, principalmente no baço e nas placas de Peyer e quando há extremos do fenômeno (mínima ou intensa apoptose tecidual) (Resendes et al., 2004). Igualmente, não podemos descartar que a pouca quantidade de células da imunidade adaptativa seja decorrente de outros mecanismos além da apoptose, entre eles, a baixa resposta proliferativa frente ao

comprometimento da imunidade inata. Nessa investigação demonstramos diminuição das células NK e pequena expressão de IL-12, IL-6, IL-1 β , IL-2-r e IFN γ no tecido esplênico, comprometendo a ativação e a proliferativo das células adaptativas (Delves e Roitt, 2000a, 2000b; Van der Poll e Opal, 2008) .

Futuras investigações são necessárias para determinar o papel da apoptose de linfócitos na patogênese da leptospirose grave. A apoptose nessa doença já foi demonstrada em hepatócitos de cobaias por Merien et al (1997), durante a fase inicial da infecção, associada com pouca carga bacteriana no fígado, sugerindo um mecanismo de evasão da *Leptospira sp*, que permite sua disseminação sistêmica. Temporalmente, a apoptose no baço ocorre em paralelo com o fígado, porém em menor grau (Merien et al, 1997). Recentemente, a apoptose de macrófagos murinos e humanos na leptospirose vem sendo objeto de estudos de pesquisadores chineses, os quais demonstraram que essa ocorre via FADD/caspase-8/caspase-3 (Li et al, 2008; Jin et al, 2009). É possível que essa mesma via de ativação esteja implicada também na apoptose de linfócitos na leptospirose. Não sabemos se nos modelos de hamsteres de leptospirose, nos quais a resposta anti-inflamatória prevalece no estágio final da infecção, ocorre apoptose intensa de células imunes, influenciando o desvio da resposta imune para Th2 (Voll et al, 1997; Barker, 1999)

A importância das células TCD4+ na leptospirose foi demonstrada em poucos estudos experimentais e humanos e estes apontam para um papel fundamental dessas células na manutenção da homeostase

do organismo hospedeiro durante a infecção. Kanashiro-Yamashiro et al (1991) observaram que pacientes com leptospirose de quadro moderado apresentam contagem e proliferação normais de células TCD4+ em cultura, ocorrendo diminuição das mesmas em casos mais graves (com insuficiência renal, porém sem choque ou SPHS). Vale salientar que nesse estudo também se demonstrou que a diminuição de células TCD4+ nos casos graves foi reversível, tornando-se semelhante a controles durante a convalescência. Poderíamos inferir que casos com SPHS e choque cardiovascular refratário apresentam, evolutivamente, em certo estágio da doença uma disfunção intensa e irreversível das células TCD4+, levando o enfermo ao óbito? Em outra investigação, um protocolo de depleção de células TCD4+ e/ou TCD8+ por anticorpos monoclonais foi realizado em cobaias por Pereira et al (1998) com o intuito de avaliar o papel destas células na gravidade de lesões histológicas e validar um modelo experimental de SPHS. As lesões histológicas renais e pulmonares foram mais graves nos animais depletados de TCD4+ ou TCD8+ que os controles, com efeito aditivo naqueles com depleção conjunta de TCD4+ e TCD8+ (Pereira et al, 1998). Este dado é pioneiro, dentre os estudos experimentais em leptospirose, ao demonstrar a importância vital da imunidade celular adaptativa no controle das lesões de órgãos-alvo, revelando que a disfunção daquelas células está envolvida na patogênese da doença.

O perfil de citocinas nas lesões da leptospirose é pouco conhecido. Nos estudos acima citados (Nicodemo et al, 1997; Pereira et al, 1998; Nally et al, 2004), não foi pesquisado o perfil de citocinas atrelado aos

eventos patológicos, bem como ainda não tinha sido avaliada *in situ* a expressão de citocinas por linfócitos e outras células mononucleares na resposta anti-*Leptospira*, em humanos ou em animais, como verificamos na nossa pesquisa. Neste estudo, demonstramos um cenário de “imunoparalisia”: há uma menor quantidade de células NK e TCD4+, baixa expressão de IFN γ , IL-12, IL-6, IL-1 e IL-2r e alta expressão de IL-10 nos grupos leptospirose e sepse, quando comparados com o grupo trauma. Na literatura consultada, o papel das citocinas na leptospirose é avaliado através da dosagem destas pelo ELISA no soro (Tajiki e Salomão, 1996) e em sobrenadantes de PBMC humano e animal (Diament et al, 2002; Naiman et al, 2002; Klimpel et al, 2003), bem como através da expressão de RNAm em tecido renal e pulmonar de hamsters (Verneil-Pauillac et al, 2006; Lowanitchapat et al, 2009; Marinho et al, 2010). Em conjunto, estes estudos apontam para uma forte resposta Th1 na imunidade anti-leptospiras, ao menos nos primeiros momentos do estímulo de células com leptospiras ou no início da doença. As poucas demonstrações que relacionam célula com citocina giram em torno dos linfócitos TCD4+ e T $\gamma\delta$ + como fortes produtores de IFN γ . Em pesquisas com o gado bovino imunizado para o serovar Hardjo, a resposta eficaz de anticorpos somente ocorre quando há uma indução de resposta celular adaptativa (células TCD4+ e T $\gamma\delta$ +) produtora de IFN γ (Naiman et al, 2001 e 2002). Também em humanos, o PBMC de indivíduos sadios prolifera após estímulo com leptospiras vivas ou com a glicoproteína de membrana da bactéria, às custas de células TCD4+, T $\gamma\delta$ e

NK, com alta secreção de citocinas pró-inflamatórias e Th1 como a IL-6, IL-12 e IFN γ (Diament et al, 2002; Klimpel et al, 2006; Tuero et al, 2010).

A resposta imune eficaz do hospedeiro frente a um agente infeccioso decorre de um equilíbrio entre a resposta inflamatória e a antiinflamatória. O desequilíbrio entre estas levaria a extremos: a um estado hiperinflamatório ou a um estado antiinflamatório, imunossupressor, ambos deletérios ao hospedeiro. A hiperinflamação da sepse também conhecida como “tempestade de citocinas” foi bem descrita em modelos de endotemia experimental e na meningococcemia humana (Calandra et al., 1990). Como contraponto, a imunossupressão (ou imunoparalisia) ocorre na sepse quando esta se torna protraída, favorecendo a aquisição de novas infecções e o óbito do indivíduo (Rajan et al, 1997). A imunoparalisia da sepse é bem estudada em modelos de camundongo com peritonite por ruptura de ceco e em pacientes com infecções graves por bactérias Gram-positivas/negativas, sendo a teoria atual da fisiopatologia da síndrome, após dias de evolução (Karp et al, 1998). A resposta polarizada para o tipo Th2 é descrita através da dosagem de IL-4, IL-10 e TGF β no soro de pacientes com choque séptico por bactérias Gram-positivas/-negativas, após o quarto-sétimo dia de doença, quando encontram-se em níveis elevados que perduram de forma prolongada (Ertel et al., 1995; Gogos et al., 2000; Friedland et al., 1996). Essas citocinas Th2 têm a habilidade de inibir a síntese de IL-1, TNF α e outras citocinas essenciais da resposta Th1 como a IL-12. Embora os estudos de necrópsias em sepse/choque séptico tenham demonstrado uma importante diminuição de células dendríticas e linfócitos

no baço de pacientes falecidos por choque séptico (Hotchkiss et al, 2001, 2002), o perfil das citocinas Th1 e Th2 *in situ* não foi demonstrado como aqui, nesta investigação

Retomando a leptospirose, apenas um estudo em humanos sugere que um fino equilíbrio deva existir entre a resposta inflamatória e antiinflamatória para preservar a homeostase do organismo frente à infecção. Tajiki et al (1996) demonstraram no soro de pacientes com leptospirose uma alta relação TNF α /IL-10 correspondente a uma hiperinflamação, com um pior prognóstico clínico. Inversamente, nesse mesmo estudo, aqueles com uma baixa relação TNF α /IL-10 (equivalente a um equilíbrio entre as respostas pró e antiinflamatórias) tiveram uma evolução melhor, sem insuficiência renal e melhor sobrevida. Os dados da nossa pesquisa revelariam o outro extremo da relação Th1/Th2, ou seja, um estado de imunossupressão, não demonstrado no estudo de Tajiki et al (1996)?. Nossos resultados representam uma “fotografia” da resposta imune tecidual esplênica no momento do óbito de pacientes com doença grave, enquanto que a relação TNF α /IL-10 foi aferida no soro, dentro das primeiras 24 horas de hospitalização dos pacientes no estudo citado (Tajiki et al, 1996). É possível que evolutivamente, os pacientes com alto nível sérico de TNF α e baixo nível de IL-10 nas primeiras horas de doença venham apresentar, na fase terminal da infecção, um predomínio de IL-10 semelhante aos casos letais de choque séptico, nos quais há uma mudança na resposta imune tipo Th1 para Th2, crucial para uma má evolução clínica (Ertel et al., 1995; Gogos et al., 2000). No entanto, somente uma avaliação

prospectiva de casos graves de leptospirose, com dosagem de um painel de citocinas no soro, poderia responder essa questão. As referências de literatura, concernentes a uma resposta imune do hospedeiro tipo Th2 na evolução da leptospirose, semelhante aos nossos achados, são três estudos recentes em hamsteres com doença que mimetiza a doença humana (icterícia, nefrite intersticial e hemorragia pulmonar). Nestas investigações, os hamsteres foram infectados intraperitonealmente com alta carga de cepa virulenta de *L.interrogans* com o intuito de caracterizar, ao longo da infecção, a cinética de citocinas no sangue periférico (Vernel-Pauillac et al, 2006), no tecido renal (Lowanitchapat et al, 2009) e no tecido pulmonar (Marinho et al, 2010). Os resultados demonstraram que nos animais infectados, ocorre um aumento inicial e breve das citocinas inflamatórias e Th1 (TNF α , IFN γ e IL-12), seguido do predomínio de IL-10 nas fases finais dos experimentos. Seria a infecção de hamsteres o modelo experimental ideal para o entendimento de leptospirose humana grave com Weil, SPHS e choque? Futuros estudos poderiam aprofundar os conhecimentos acerca desse modelo, caracterizando a imunidade inata e adaptativa no sangue periférico e *in situ* nesses animais. Igualmente, estudos clínicos prospectivos seriam bem-vindos ao demonstrarem, por diversas metodologias, a evolução de um estado inflamatório para antiinflamatório no decorrer da leptospirose grave, bem como a caracterização da resposta imune inata e adaptativa nas formas clínicas leves, moderadas e graves da leptospirose.

Outra questão a ser aventada sobre a fisiopatologia do choque e SPHS da leptospirose, a partir do quadro de imunoparalisia aqui

representado no baço, é a conexão desta condição a auto-imunidade. Além de outras evidências de auto-imunidade, deposição de IgG e C₃ no espaço intra-alveolar foi demonstrada nos pulmões de cobaias (Nally et al, 2004) e humanos (Yang et al, 2005; Croda et al, 2009) com hemorragia maciça por leptospirose grave. Alguns dos pacientes do estudo de Croda et al. (2009), realizado no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da FMUSP, estão incluídos nesta pesquisa. Portanto, seria válido pensar que estariam associados os eventos auto-imunes no pulmão e o estado de imunossupressão no baço? A pouca quantidade de células NK e células TCD4+, sugere que a atividade de células T regulatórias possa estar comprometida, além do excesso de IL-10 (Suvas e Rouse, 2006; Venet et al. 2004). A análise futura de células T regulatórias, nas amostras deste estudo, poderia iluminar essa questão.

A informação gerada pelos resultados desta tese apresenta importância de aplicação prática, que permite um salto a partir do campo da imunopatogenia clínica - a caracterização de um estado de imunoparalisia *in situ* no baço de pacientes falecidos por leptospirose grave - para a seara da terapêutica, com possíveis novas intervenções para essa doença infecciosa. O conhecimento da fisiopatogenia da sepse/choque séptico avançou muito na caracterização da fase de imunossupressão da síndrome. Tentativas de reverter-la estão em andamento, com algum sucesso no campo experimental, como a administração de IFN γ (Kox et al., 1997) e IL-15 (Inoue et al, 2010) exógenos e bloqueadores de caspase (Hotchkiss et al., 1999, 2005). Esses tratamentos restauraram a capacidade de células mononucleares frente à

infecção, devido à indução de forte resposta Th1. Faltam ainda marcadores clínicos que possam ser utilizados de forma prática e eficiente, à beira leito, para diagnosticar que o paciente séptico encontra-se imunossuprimido e assim, sinalizar o momento ideal do início da terapêutica imunomoduladora para reversão dessa condição. Alguns marcadores já foram determinados em estudos prospectivos, associados a um prognóstico ruim. No entanto, esses testes ainda não validados teste diagnóstico da imunoparalisia da sepse/choque séptico. A saber, teste de hipersensibilidade (avalia anergia) (Meakins et al., 1977), expressão de HLA-DR (avalia a disfunção de células mononucleares) (Venet et al, 2007), dosagem de citocinas antiinflamatórias no soro e em sobrenadantes de PBMC (IL-10, IL-4, TGF- β) (Ertel et al., 1995) e o aparecimento de linfopenia no hemograma durante a evolução de uma infecção aguda grave (Rajan et al, 1997). Uma questão que se impõe, após a constatação de que imunossupressão também ocorre na fase terminal de casos de leptospirose com SPHS e choque cardiovascular, é se os pacientes beneficiar-se-iam das novas medidas terapêuticas imunomoduladoras usadas na sepse/choque por bactérias Gram-positivas/negativas.

A elucidação dos diversos aspectos ainda não esclarecidos da resposta imune do hospedeiro na leptospirose humana, a disfunção do endotélio vascular e as alterações hemodinâmicas poderão fornecer os subsídios fisiopatológicos para a escolha de tratamentos adequados.

Leptospirose grave com SPHS e choque cardiovascular: mecanismo patogênico

Figura 25. O homem infecta-se com leptospirose virulenta. **A** – Fatores inerentes à bactéria (carga infectante e virulência da cepa) e ao hospedeiro (genéticos) determinam a evolução da doença para formas oligossintomáticas (maioria) ou para doença de Weil (5-15%). **B** – Doença de Weil com equilíbrio da resposta Th1/Th2 (baixa relação TNFα/IL-10) evoluem para cura. **C** – O desequilíbrio da resposta Th1/Th2 (TNFα↑/IL-10↓) determina pior prognóstico com SPHS e choque cardiovascular, que podem evoluir para a cura ou óbito, que se acompanha de um estado de imunossupressão. **D** – O baço na leptospirose com SPHS e choque cardiovascular caracteriza-se por esplenite aguda, disfunção endotelial, presença de antígeno de leptospirose e comprometimento da imunidade inata e adaptativa (↓ de células NK, CD68+, CD4+, das citocinas IL-1β, IL-2r, IFNγ, IL-6, IL-12, com ↑ de IL-10

8. Conclusões

Conclusão geral

Pacientes com leptospirose grave acompanhada de SPHS e choque cardiovascular apresentam semelhanças com casos de choque séptico causado por bactérias Gram-positivas/-negativas: quadro clínico-laboratorial, baço com achados histopatológicos similares e estado de imunossupressão detectado *in situ* no tecido esplênico.

Conclusões específicas

1 - Pacientes com leptospirose grave com choque cardiovascular e SPHS apresentam febre, taquicardia, taquipnéia, hipotensão e leucocitose com desvio à esquerda, à semelhança dos casos de choque séptico causado por bactérias Gram-positivas/-negativas

2 -Na leptospirose grave, a análise do baço mostrou alterações histopatológicas como indícios de disfunção endotelial (ativação endotelial, congestão e hemorragias), esplenite aguda e sinais de imunossupressão traduzidos por atrofia folicular e diminuição da densidade das zonas T e B dependentes dos folículos linfóides da polpa branca, similares as encontradas no choque séptico causado por bactérias Gram-positivas/-negativas

3 - A distribuição difusa do antígeno de leptospiras no tecido esplênico, identificado no espaço extracelular e em diversos tipos celulares, sugere seu papel ativo na patogenia das lesões da leptospirose grave com hemorragia pulmonar e choque

4 - Na leptospirose grave demonstramos originalmente comprometimento importante da imunidade inata caracterizado por diminuição significativa das células NK e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-2r, IL-6 e IL-12) *in situ* no baço

5 - Na leptospirose grave a diminuição significativa de IL-12, apesar do aumento das células dendríticas no baço, deve indicar comprometimento da secreção dessa citocina pelas células dendríticas, resultando em ativação inadequada da imunidade adaptativa

6 - Na leptospirose grave com choque cardiovascular observa-se um perfil de imunoparalisia como já demonstrado no choque séptico por bactérias Gram-positivas/-negativas, comprovado no baço pela baixa densidade de expressão de células TCD4+, de INF γ e alta expressão de IL-10

7 - A ausência de um grande número de células apoptóticas, marcadas pelo anticorpo anti-caspase 3, no baço de pacientes com leptospirose grave e choque séptico não nos permite afirmar que a apoptose seria um mecanismo relevante de morte das células imune nessas doenças.

9. Anexos

Anexo 1

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 04/02/2009, **APROVOU o(s) documento(s)** abaixo mencionado(s) referente ao Protocolo de Pesquisa nº **0537/06**, intitulado: "**PATOGENIA DO ENVOLVIMENTO ESPLÊNICO NA LEPTOSPIROSE GRAVE COM SÍNDROME DE CHOQUE SÉPTICO**" apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

- Carta datada de 15/11/2008 encaminhando Adendo ao Projeto.

Comentário do Relator: Foi acrescentado na casuística os casos de óbito de pacientes por Leptospirose (e respectivas necropsias), incluirão os pesquisadores a partir dos arquivos do Serviço de Verificação de Óbito da Capital (SVO), no período compreendido entre 1931 a 2007.

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. MARIA IRMA SEIXAS DUARTE**

CAPPesq, 04 de Fevereiro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovidio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnnet.usp.br /

secretariacappesq2@hcnnet.usp.br

hf

Anexo 2

São Paulo, 20 de maio de 2010.

Dr. Amaro Nunes Duarte Neto,

Frente a sua consulta sobre sua tese de doutorado: "Patogenia do envolvimento esplênico na leptospirose grave com síndrome do choque séptico" temos as seguintes considerações a tecer:

1º Damos ciência a utilização de amostras do Serviço de Anatomia Patológica no ano de 2005 oriundas de necropsias feitas no Hospital Universitário de 2 indivíduos que faleceram com a doença leptospirose.

2º Temos cópia da autorização fornecida pela Diretoria Técnica do Serviço de Anatomia Patológica autorizando o uso das amostras naquela ocasião.

3º Estamos cientes que o estudo destas amostras não apresentaria qualquer impacto no diagnóstico, nem no tratamento destes indivíduos, e além disto, o anonimato dos mesmos foi garantido; acrescentamos que estes exames são ordinariamente mantidos pelo Hospital Universitário, por força de lei que antecede sua pesquisa.

4º A orientação adequada naquela ocasião seria de encaminhar este fato para conhecimento do CEP – HU, mas por distração, nem a CAPPesq, nem a FMUSP ou a Anatomia Patológica lembraram deste fato. Por sermos Instituições da USP, enoveladas no mesmo mister, o ensino das ciências da saúde, e muitas vezes trabalharmos em mais de uma das instituições favorece estes equívocos. Visando evitar futuros enganos, os órgãos envolvidos foram contatados e advertidos da ocorrência.

5º Não há como aprovarmos um fato já ocorrido, mas tendo em vista que os envolvidos não prejudicaram nenhum sujeito de pesquisa, a gênese da confusão ocorrida, a correção já acordada, não vemos impedimento a tramitação de sua pesquisa.

Mauricio Seckler
CRM 47962

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do HU

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Av. Prof. Lineu Prestes, 2564 – Cidade Universitária – 05508-900 – São Paulo – SP
Tel.: (11) 3039-9457 ou 9479 Fax.: (11) 3039-9452 E-mail: cep@hu.usp.br

Anexo 3. Dados clínicos e demográficos dos casos de leptospirose (11 casos)

IDENTIFICAÇÃO	IDADE	SEXO	LEPTOSPIROSE	MAT	ELISA	NECRO	IH FIGADO	IH BAÇO	APACHEII
AJB	56	M	POSITIVO	NR	NR	SUGESTIVA	POSITIVO	POSITIVO	27
EAM	23	M	POSITIVO	POSITIVO	NR	SUGESTIVA	NR	NEGATIVO	21
FF	22	F	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	SUGESTIVA	POSITIVO	NEGATIVO	<24HORAS
JBSL	54	M	POSITIVO	NR	NR	SUGESTIVA	POSITIVO	POSITIVO	30
ASL	38	M	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	SUGESTIVA	NR	POSITIVO	28
AMF	40	M	POSITIVO	POSITIVO	NR	SUGESTIVA	NR	POSITIVO	26
AM	37	M	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	SUGESTIVA	NR	POSITIVO	21
JGA	55	M	POSITIVO	POSITIVO	NR	SUGESTIVA	POSITIVO	POSITIVO	21
SBA	35	F	POSITIVO	NR	NR	SUGESTIVA	POSITIVO	POSITIVO	SEM DADOS
JAJ	56	M	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	SUGESTIVA	POSITIVO	NEGATIVO	20
RVS	40	M	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	SUGESTIVA	POSITIVO	POSITIVO	<24HORAS

NR: não realizado

Anexo 4. Dados clínicos e demográficos dos casos de choque séptico (10 casos)

IDENTIFICAÇÃO	IDADE	SEXO	DIAGNOSTICO SEPSE	APACHE II
JSL	24	F	PNEUMONIA BILATERAL	28
MGBF	52	F	SEPSE POR <i>E. FAECALIS</i>	SEM DADOS
LZB	19	F	PNEUMONIA BILATERAL	SEM DADOS
CG	59	M	SEPSE POR <i>S. AUREUS</i>	25
FMQ	61	F	COLECISTITE PURULENTA	SEM DADOS
QGD	55	F	INFECCAO URINARIA	SEM DADOS
MNS	47	F	ABSCESSO PULMONAR/ PNEUMONIA	SEM DADOS
MCSP	62	F	INFECCAO URINARIA <i>P. aeruginosa</i>	SEM DADOS
DXS	68	M	PE DIABETICO INFECTADO	SEM DADOS
AMB	65	F	PNEUMONIA BILATERAL	SEM DADOS

Anexo 5. Dados clínicos e demográficos dos casos de trauma (12 casos)

IDENTIFICAÇÃO	IDADE	SEXO	TRAUMA
386429 RM	23	M	AUTO X POSTE
B05-3750 AC	25	M	MOTO X POSTE
252775A EM	22	M	MOTO X AUTO
81153B FPM	24	M	MOTO X AUTO
B06-1827A IV	29	M	MOTO X AUTO
B05-4885C CPM	25	M	MOTO X AUTO
B06-81 MPM	29	M	MOTO X MOTO
B06-477C CA	37	M	AUTO X POSTE
B05-4682A CR	23	M	MOTO X POSTE
87155B ZC	40	M	QUEDA ALTURA
430841D MC	37	F	QUEDA ALTURA
530021 EGS	29	M	AUTO X POSTE

Anexo 6. Resultados da análise semi-quantitativa dos achados histopatológicos no baço de casos de leptospirose com SPHS e choque cardiovascular.

IDENTIFICAÇÃO	TIPO		HEMORRAGIA				CELULA	PLASMO-	NEUTRO-	LINFO-	META-	HEMOS-	VOLUME	VOLUME	ZONA T	ZONA B	ATIVACAO	ANTIGENO
	CONGESTAO	CONGESTAO	HEMORRAGIA	PERI	NECROSE	VASOS	RETICULAR	CITOS	FILOS	CITOS	PLASIA							
	SINUSOIDES	FOCAL/DIFUSA	PARENQUIMA	SUBCAPSULAR			MACROFAGO	SEPTO	SEPTO	SEPTO	MELOIDE		CG	FOLICULO	DEPLECAO	DEPLECAO	ACF	LEPTO
AJB	2	2	1	0	0	0	3	2	2	1	1	1	0	0	1	1	1	1
EAM	2	2	1	0	0	0	3	2	2	1	1	3	0	1	1	0	1	0
FF	2	2	1	0	0	0	3	2	3	1	1	2	0	0	1	1	1	1
JBSL	1	2	0	0	0	0	3	3	3	1	1	3	0	0	1	1	1	0
ASL	2	2	1	0	0	0	2	2	2	1	1	3	0	0	1	1	1	1
AMF	2	2	1	1	0	0	2	2	2	1	1	1	1	1	1	0	1	1
AM	3	2	1	0	0	0	2	2	2	1	1	1	0	0	1	1	1	1
JGA	3	2	1	0	0	0	2	2	2	1	1	1	0	0	1	1	1	0
SBA	3	2	1	0	0	0	3	3	3	1	1	3	0	0	1	1	1	1
JAJ	3	2	1	0	0	0	3	2	3	1	1	1	0	0	1	1	1	1
RVS	3	2	1	0	1	0	3	3	3	1	1	3	0	0	1	1	1	1

Anexo 7. Resultados da análise semi-quantitativa dos achados histopatológicos no baço de casos de choque séptico por bactérias Gram-positivas/-negativas.

IDENTIFICAÇÃO	TIPO		HEMORRAGIA				CELULA	PLASMO-	NEUTRO-	LINFO-	META-	HEMOS-	VOLUME	VOLUME	ZONA T	ZONA B	ATIVACAO					
	CONGESTAO SINUSOIDES	CONGESTAO FOCAL/DIFUSA	HEMORRAGIA	PERI/-	NECROSE	VASOS PV	RETICULAR	CITOS	FILOS-	CITOS-	PLASIA							SIDERINA	FOLICULO	DEPLECAO	ZONA B DEPLECAO	ENDOTELIO ACF
			PARENQUIMA	SUBCAPSULAR			MACROFAGO	SEPTO	SEPTO	SEPTO	MIELOIDE											
JSL	3	2	1	1	1	3	3	2	2	1	1	2	1	0	1	1	1					
MGBF	3	2	1	1	1	0	2	2	2	1	0	3	1	0	1	1	1					
LZB	3	2	1	0	0	3	2	2	1	1	0	1	0	0	0	1	1					
CG	3	2	1	0	0	0	2	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0					
FMQ	3	2	1	0	1	0	2	3	2	1	1	1	0	0	0	0	1					
QGD	3	2	1	0	0	0	3	3	2	1	1	1	0	0	1	1	0					
MNS	3	2	1	0	0	0	1	2	1	1	0	1	0	0	0	1	0					
MCSP	3	2	1	0	0	0	2	2	1	1	0	1	0	0	1	1	1					
DXS	3	2	1	0	0	0	3	2	2	1	1	3	0	0	1	1	1					
AMB	3	2	1	0	0	0	3	2	2	1	0	3	0	0	1	1	1					

Anexo 8. Resultados da análise semi-quantitativa dos achados histopatológicos no baço de casos de trauma.

IDENTIFICAÇÃO	TIPO																
	CONGESTAO		HEMORRAGIA				CELULA	PLASMO-	NEUTRO-	LINFO-	META-	HEMOS	VOLUME	VOLUME	ZONA T	ZONA B	ATIVACAO
	CONGESTAO	FOCAL	HEMORRAGIA	PERI/SUB	NECROSE	VASOS PV	RETICULAR/	CITOS-	FILOS	CITOS-	PLASIA						
	SINUSOIDES	DIFUSA	PARENQUIMA	CAPSULAR			MACROFAGO	SEPTO	SEPTO	SEPTO	MIELOIDE	SIDERINA	CG	FOLICULO	DEPLECAO	DEPLECAO	ENDOTELIO ACF
386429 RM	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
B05-3750 AC	2	2	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
252775A EM	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
81153B FPM	2	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
B06-1827A IV	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
B05-4885C CPM	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
B06-81 MPM	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
B06-477C CA	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
B05-4682A CR	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
87155B ZC	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
430841D MC	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
530021 EGS	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0

Anexo 9. Resultados da análise quantitativa da expressão tecidual de células imune e citocinas no baço de pacientes com leptospirose com SPHS e choque cardiovascular.

IDENTIFICAÇÃO	CD68		S100		NK		Caspase		TNF α		IFN γ		IL-4		IL-12		IL-6		TGF β		IL-10		IL-1b		IL-12		CD4		CD8		CD20	
	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB
AJB	51,6	22,3	6,8	14,3	0,3	3,6	0,7	0	0,2	0,1	0,1	0	3,8	0,2	0	0	0,3	0	4,2	4,1	2,1	0,9	0	0	0,4	0,4	4,60	106,30	99,3	53	10,5	130
EAM	42,6	16	77,8	16,1	1,7	3,2	0,3	0,3	3,3	3,5	0,3	0	0	0	4,3	0,3	0,7	0,4	5,2	3	3	1,14	0	0	0,1	0	14,40	98,50	51,5	61,5	15,9	125
FF	65,6	16,8	10	2,1	1,6	4,1	0,8	0	2,25	2	0	0	0	0	0,9	0,1	0,2	0	3	3,9	4,8	1,3	0	0	0,5	0	18,50	160,20	7	12,3	1,3	124
JBSL	24,6	11,3	49	6,1	0,4	0,8	1,4	0,3	1,4	1,3	0	0	0	0	0	0	0,7	0,2	13,8	4,4	1,8	0,7	0	0	0,1	0	2,00	136,80	14,5	68,3	17,3	212
ASL	60,7	12	43	24,7	1	1,4	0	0	1	4,1	0	0	0,7	0,8	0	0	0	0	1,9	12,6	0,4	0,3	0	0	0,5	0	4,90	19,10	98,6	65	9	44,6
AMF	31,7	10,1	117	4,1	1,1	0,3	0,3	0	0,4	0,8	0	0	2,4	1,5	0	0	0,1	0,1	3,6	1,57	3,22	4,1	0	0	0,2	0	9,50	163,20	88	54,1	18,2	193
AM	37,7	18,4	52,2	18,6	1,2	1,2	0,2	0,4	1,7	8,4	0	0	0,3	0	0	0	0	0	7,5	5,4	1,8	1,57	0	0	0,4	0	2,90	72,40	9,2	57	15,6	157
JGA	11,9	9,1	42,9	2,8	1,5	1,1	0	0	1,8	19,2	0	0	5,6	1,8	0	0	1	0,3	7,2	10,8	11,3	4,9	0	0	1,2	0,2	14,00	114,70	28,5	19	19,3	141
SBA	37,4	23,4	35,2	17,5	1,5	14,5	1,5	2,1	1,4	0,7	0,3	0,1	0	0	0	0	0,1	0	9,9	11,6	2,7	2,5	0	0	1,4	0	4,30	66,60	23	44,7	11,8	135
JAJ	3,4	1	28,6	9	2,6	2,6	0,3	0	0,6	2,9	0	0	1,6	1,6	2,1	0,6	0,3	0	3,7	13,3	2,1	1	0,1	0,2	0,5	0,1	2,40	120,50	18	63	8,9	126
RVS	26,1	8,1	20,2	13,4	1	1,5	0	0	1	0	0,2	0	1,2	0	0	0	0,1	0	9,6	15,7	0,4	1,5	0	0	0,6	0,1	15,30	130,80	25,8	16	6,8	142

Anexo 10. Resultados da análise quantitativa da expressão tecidual de células imune e citocinas no baço de pacientes com trauma.

	CD68		S100		NK		Caspase		TNFα		IFNγ		IL-4		IL-2		IL-6		TGFβ		IL-10		IL-1β		IL-12		CD4		CD8		CD20	
IDENTIFICAÇÃO	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB
386429 RM	15,4	2,1	0,4	2,1	4,4	11,3	4,4	15,9	0,2	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0,1	5,1	0	0	0	0	0	0	21,00	225,90	36,2	100,5	11,1	125,4
B05-3750 AC	15,7	9	0,4	1	15	13,5	1,1	2,1	0	0	0,1	0	0,7	1,4	0	0	0	0	5,5	5,7	0,1	0,1	0	0	0	5	78,90	380,70	62,5	71,7	1,7	74,3
252775A EM	12,6	4,5	0,4	1	20,2	5,9	9,6	15,4	0,8	0	0	0	2,9	0	0	0	0,1	0	0,6	1,7	0	0	0	0	0	0	31,00	283,60	22,6	37,1	18,2	117,5
81153B FPM	3,6	4,8	0,1	0,2	9,3	6,2	0,3	1,6	0	0	0	0,6	0,1	0,1	0	0	0,1	0,1	0,2	0,1	0	0	0	0	0	2	31,60	362,50	57,1	57,9	0,5	102,6
B06-1827A IV	20,8	11,4	0	0	4,8	2,1	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	9,3	1,5	0	0	0,1	0	0	0	34,60	203,10	36,7	110	2	120
B05-4885C CPM	35,2	20,1	0,5	0,6	12,4	17,2	3,4	6,5	0,5	0,2	0	0	0	0	0,1	0,1	0,6	0,2	4,6	5,1	0	0	0	0	0	1	52,30	374,30	82,5	86,8	5,5	130,8
B06-81 MPM	21,2	10,3	0,1	0	3,9	4	1,3	5	0,2	0	0	0	0,3	0,1	0,7	0,4	0,8	0,5	3,7	0,8	2,6	0,4	0	0	0	5	34,40	323,20	26,9	48,9	0,2	59,2
B06-477C CA	17,7	11,6	0,3	2,5	5,1	6,7	4,2	6,4	0	0,1	9,3	0	0,8	0,2	0	1	2	0	29,6	26,4	1,9	2,9	0	0	0	6	41,20	316,50	38,1	54,4	1,5	80
B05-4682A CR	67,2	21	0,3	2	6,7	14	4,8	4,5	1,5	0,1	0,3	0	2,6	1,1	5,2	0,4	1,4	0,1	1,3	6,8	0	0	0	0	0	1	115,60	383,00	36,8	33,4	3,9	86,9
87155B ZC	22,5	4,1	0	0,2	4,1	5,7	4,5	3,3	0,1	0,3	0	0	0	1	0	0	0,2	0	2,2	2,4	0	0	0,1	0,1	0	0	53,50	432,70	17	25,6	2,5	90
430841D MC	9,4	9,5	0	0	5,1	10,5	0,4	1,4	0	0	0	0	0,1	0,5	0	0	0	0	1,8	8,7	0	0	0	0	0	0	51,00	232,90	20	50	3,8	80,9
530021 EGS	21,3	4	0,3	0,5	6,2	10,2	0,7	2,3	0,2	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0,4	13,8	0	0	0	0	0	0	36,80	257,70	20	22,9	1,4	110,7

Anexo 11. Resultados da análise quantitativa da expressão tecidual de células imune e citocinas no baço de pacientes com choque séptico por bactérias Gram-positivas/-negativas.

	CD68		S100		NK		Caspase		TNF α		IFN γ		IL-4		IL-2		IL-6		TGF β		IL-10		IL-1b		IL-12		CD4		CD8		CD20	
IDENTIFICAÇÃO	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB	PV	PB
JSL	33,9	25,7	5,9	0	0,3	0,2	2,5	0,2	0,7	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	9,1	3,75	1,9	1	0,1	0	0	0	21,60	116,20	4	4,1	5,9	183
MGBF	78,3	31,2	1,1	1,1	3,5	2,4	0,2	0,1	0,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,7	5,2	2,3	0,3	0	0	0	0	7,20	135,80	3	3,7	0,4	162
LZB	23,7	24,9	5,6	0,8	0,1	0	0,8	1	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10,8	5,6	4,8	2,8	0,2	0	0	0	5,90	63,50	3,1	8,8	2,1	130
CG	58,8	29,6	9,8	1,3	58,8	29,6	2,6	0,8	1,3	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	16,4	9	12,6	5,5	0,5	0	0	0	5,00	100,10	4,8	9,7	2,8	74
FMQ	101	45,5	0,5	0,2	0,2	0	0,6	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13,2	8,8	6,2	0,7	0	0	0	0	26,30	174,80	26,9	14,7	18,1	215
QGD	88	40	1,2	0,1	5,7	0,5	1,1	0,6	0,2	0,1	0,3	0	0,4	0	0	0	0	0	21	14,9	5,1	2,4	0,1	0,2	0	0	25,40	115,00	25,4	13,5	6	186
MNS	56,5	38,5	10,2	2,1	0,5	0	0,1	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13,3	10	5,3	1,6	0	0	0	0	5,40	77,50	6	10	3,3	142
MCSP	75,6	37,2	1	0,5	1,8	0,6	4,4	1,4	0,1	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	15,5	5,9	6,4	5,6	0	0	0	0	16,00	149,40	3,1	2,9	4,6	154
DXS	55,1	23,8	0,6	0	0	0,2	0,6	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,71	0	2,5	1,2	0	0	0	0	7,20	139,00	4	8,2	5	130
AMB	88,4	37,2	5,7	1	1,7	1,7	1,3	0,2	0,3	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	16,9	15,5	18,7	2,4	0,1	0	0	0	26,00	100,00	11,9	9,7	13,8	202

10. Referências

1. Abdulkader RCRM, Seguro A, Malheiro PS, Burdman EA, Marcondes M. Peculiar electrolytic and hormonal abnormalities in acute renal failure due to leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 54: 1-6.
2. Abdulkader RC, Daher EF, Camargo ED, Spinosa C, da Silva MV. Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2002; 44:79-83.
3. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *J Am Med Assoc.* 1995; 273(12):934-41.
4. Adler B, Faine S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. *Infect Immun.* 1977; 17:67-72.
5. Adler B, Faine S. Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* serovar Pomona. *Infect Immun.* 1976; 14(3): 703-8.
6. Adler B, Faine S. The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. *J Med Microbiol.* 1978; 11: 387-400.
7. Alves VA, Yasuda PH, Yamashiro EH, Santos RTM, Yamamoto LU, de Brito T. An Immunohistochemistry assay to localize leptospires in tissue specimens. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1986; 28(3): 170-73.
8. Alves VAF, Gayotto LCC, De Brito T, Santos RTM, Wakamatsu A, Vianna MR, Sakata EE. Leptospiral antigens in the liver of experimentally infected guinea pig and their relation to the morphogenesis of the liver damage. *Exp Toxic Pathol.* 1992; 44:425-433.
9. Amato MBP, Barbas CSV, Medeiros DM, et al. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 1998; 338 (6):347-354.

10. Anderson DL, Johnson RC. Electron microscopy of immune disruption of leptospire: action of complement and lysozyme. *J Bacteriol.* 1968; 95:2293-2309.
11. Andrade L, Cleto S, Seguro A. Door-to-dialysis time and daily hemodialysis in patients with leptospirosis: impact on mortality. *Clin J Am Soc Neph.* 2007; 2 (4): 739-44.
12. Andrade L, Rodrigues AC, Jr Sanches TR, Souza RB, Seguro AC. Leptospirosis leads to dysregulation of sodium transporters in the kidney and lung. *Am J Physiol Renal.* 2007; 292: F586-F592.
13. Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. *N Engl J Med.* 2000; 343(14): 1020-1033.
14. Aragão HB. Sobre a presença do *Spirochaeta icterohemorrhagiae* os ratos no Rio de Janeiro. *Brasil Méd.* 1917; 31(39): 329-330.
15. Areal VM. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). 1962; 40(4): 393-423.
16. Athanazio DA, Santos CS, Santos AC, McBride FW, Reis MG. Experimental infection in tumor necrosis factor alpha receptor, interferon gamma and interleukin 4 deficient mice by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta trop.* 2008; 105(1):95-8.
17. Athanazio DA, Silva EF, Santos CS, Rocha GM, Vannier-Santos MA, McBride AJ et al. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Trop.* 2008; 105: 176-180.
18. Atzingen MV, Gómez RM, Schattner M, Pretre G, Gonçalves AP, mOrais ZM et al. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. *J infection.* 2009; 59: 264-276.
19. Avdeeva MG, Bondarenko IN. Serum nitric oxide as an additional criterion for evaluating the course of leptospirosis. *Klin Lab Diagn.* 2006; 11:50-2.

20. Banfi E, Cinco M, Bellini M, Soranzo MR. The role of antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospires. *J Gen Microbiol.* 1982; 128: 813-816.
21. Barbosa AS, Abreu PA, Vasconcellos SA, Morais ZM, Gonçalves AP, Silva AS et al. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infect Immun.* 2009; 77:1137-1143.
22. Barbosa AS, Abreu PAE, Neves FO, Atzingen MV, Watanabe MM, Vieira ML et al. A newly identified leptospiral adhesion mediates attachment to laminin. *Infect Immun.* 2006; 74: 6356-6364.
23. Barcellos C, Sabroza PC. Socio-environmental determinants of the leptospirosis outbreak of 1996 in western Rio de Janeiro: a geographical approach. *Int J Environ Health Res.* 2000; 10:301-313.
24. Barcellos C, Sabroza PC. The place behind the case: leptospirosis risk and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. *Cadernos de Saúde Pública.* 2001; 17: 59-67.
25. Barker RN, Erwig L, Pearce WP, Devine A, Rees AJ. Differential effects of necrotic or apoptotic cell uptake on antigen presentation by macrophages. *Pathobiology.* 1999; 67: 302-305.
26. Barocchi MA, Ko AI, Reis M, McDonald KL, Riley LW. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans* an invasive but nonintracellular pathogen. *Infect Immun.* 2002; 70: 6926-6932.
27. Barry M, Wisniewski AV, Matthias MA, Inouye SK, Vinetz JM. Suburban leptospirosis: atypical lymphocytosis and $\gamma\delta$ - T cell response. *Clin Infect Dis.* 2006; 43: 1304-7.
28. Beitzke H. Ueber die pathologische anatomie des ansteckenden Gelbsucht (Weil'schen krankheit). *Berl klin W chnschr.* 1916; 53: 188-191.

29. Benjamim CF, Lundy SK, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Reversal of long term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. *Blood*. 2005; 105: 3588-3595.
30. Bentes JA. Da leptospirose de Inada ou *icterus hemorrhagiae*. Estudo clínico e experimental. Rio de Janeiro, 1917. 83p. Tese – Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro.
31. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis*. 2003; 3: 757-71.
32. Blasi E, Ardizzoni A, Colombari B, Neglia R, Baschieri C, Peppoloni S et al. NFkB activation and p38 phosphorylation in microglial cells infected with *Leptospira* or exposed to partially purified leptospiral lipoproteins. *Microb Pathog*. 2007; 42: 80-87.
33. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest*. 1992; 101 (6): 1481-3.
34. Bourdais A, Lonjon B, Vergez-Pascal R, Fournier A, Ah Lo W. Complications respiratoires des leptospiroses. A propos de 6 cas dont trois avec etude hemodynamique. *Medicine Tropicale* 1988 ; 48(2) : 149-60.
35. Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 14560-14565.
36. Bulach M, Kalambaheti T, de la Pena Moctezuma A, Adler B. Functional analysis of genes in the *rfb* locus of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo subtype Hardjobovis. *Infect Immun*. 2000; 68: 3793-3798.
37. Burchill MA, Yang J, Vang KB, Farrar MA. Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunology Letters*. 2007; 114:1-8.
38. Calandra T, Baumgartner JD, Grau GE, Wu MM, Lambert PH, Schellekens J et al. Prognostic values of tumor necrosis alpha/

- cachectin, interleukin-1, interferon-alpha, and interferon-gamma in the serum of patients with septic shock. Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. *J Infect Dis.* 1990; 161: 982-987
39. Caldas EM, Sampaio MB. Leptospirosis in the city of Salvador, Bahia, Brasil. *Intern J Zoonosis.* 1979; 6: 85-96.
40. Cesta MF. Normal structure, function and histology of the spleen. *Toxicol Pathol.* 2006; 5:455-465.
41. Chakurkar G, Vaideeswar P, Pandit SP, Divate SA. Cardiovascular lesions in leptospirosis: an autopsy study. *J Infect.* 2008; 56: 197-203.
42. Charon NW, Goldstein SF. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annu Rev Genet.* 2002; 36: 47-73.
43. Chassin C, Picardeau M, Goujon JM, Bourhy P, Quellard N, Darche S et al. TLR4-and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen *Leptospira interrogans*. *J Immunol.* 2009; 183: 2669-2677.
44. Chen HI, Kao SJ, Hsu YH. Pathophysiological mechanism of lung injury in patients with leptospirosis. *Pathology.* 2007; 39(3):339-344.
45. Chierakul W, Tientadakul P, Suputtamongkol Y, Wuthiekanun V, Phimda K, Limpaboon R et al. Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 2008; 46: 254-260.
46. Chu KM, Rathinam R, Namperumalsamy P, Dean D. Identification of *Leptospira* species in the pathogenesis of uveitis and determination of clinical ocular characterization in South India. *J Infect Dis.* 1998; 177: 1314-1321.
47. Ciceroni L, Stepan E, Pinto A, Pizzocaro P, Dettori G, Franzin L et al. Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. *Eur J Epidemiol.* 2000; 16: 79-86.
48. Cinco M, Banfi E, Soranzo MR. Studies on the interaction between macrophages and leptospires. *J Gen Microbiol.* 1981; 124(2): 409-13.
49. Cinco M, Banfi E. Activation of complement by leptospires and its bactericidal activity. *Zentbl Bakteriolog Hyg.* 1983; 254:261-265.

50. Cinco M, Domenis R, Perticarari S, Presani G, Marangoni A, Blassi E et al. Interaction of leptospires with murine microglial cells. *The new microbiologica*. 2006; 29: 193-199.
51. 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 Microbo Lett*. 1996;138:211-14.
52. Cole JR, Sulzer CR, Pursell AR. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microbiol*. 1973; 25: 976-980.
53. Comby F, Gauthier R, Nazimoff O. New contribution to the study of leptospirosis in Reunion. II. Anatomopathology and histopathology of 10 fatal cases. *Bull Soc Path Exp*. 1969; 62(1): 92-101
54. Costa E, Lopes AA, Sacramento E, Costa YA, Matos ED, Lopes MB et al. Penicillin at the late stage of leptospirosis: a randomized controlled trial. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2003; 45(3):141-145.
55. Covic A, Goldsmith DJ, Gusbeth-Tatomir P, Seica A, Covic M. A retrospective 5-year study in Moldova of acute renal failure due to leptospirosis: 58 cases and a review of the literature. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18: 1128-1134.
56. Croda J, Figueira CP, Wunder EA Jr, Santos CS, Reis MG, Ko AI, Picardeau M. Targeted mutagenesis in pathogenic in Leptospira species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. *Infect Immun*. 2008; 76(12): 5826-33.
57. Croda J, Neto AND, Brasil RA, Pagliari C, Nicodemo AC, Duarte MIS. Leptospirosis pulmonary hemorrhage syndrome is associated with linear deposition of immunoglobulin and complement on the alveolar surface. *Clin Microbiol Infect*. 2009; Doi 10.1111/j.1469-0691.2009.02916.

58. Croda J, Ramos JGR, Matsunaga J, Queiroz A, Homma A, Riley LW et al. Leptospira immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 1528-34.
59. Cumberland P, Everard COR, Levett PN. Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61(5): 731-734.
60. Da Silva JJ, Netto BA, Lilembaum W, Alvim ME, de Oliveira AV. The hemorrhagic syndrome of leptospirosis: an experimental study in guinea pigs. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1995; 28: 169-77.
61. Daher E, Zanetta DMT, Cavalcante MB, Abdulkader RCRM. Risk factors for death and changing patterns in leptospirosis acute renal failure. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61: 630- 634.
62. Daher EF, Nogueira CH. Evaluation of penicillin therapy in patients with leptospirosis and acute renal failure. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2000; 42(6): 327-332.
63. Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P et al. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg.* 1992; 215(4):356-62.
64. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med.* 2001; 345(5): 340-350.
65. De Brito T, Bonm GM, Yasuda PH. Vascular damage in acute experimental leptospirosis of the guinea pig. *J Pathol.* 1979; 128:177-182.
66. De Brito T, Machado MM, Montans SD, Hosino S, Freymuller E. Liver biopsy in human leptospirosis: a light and electron microscopy study. *Virch Arch Path Anat.* 1967; 342:61-69.
67. De Brito T, Morais CF, Yasuda PH, Lancellotti CP, Hoshino-Shimizu S, Yamashiro E et al. Cardiovascular involvement in human and experimental leptospirosis: pathologic findings and

- immunohistochemical detection of leptospiral antigen. *Ann Trop Med Parasitol*. 1987; 81: 1-8.
68. De Fost M, Chierakul W, Limpaboon R, Dondorp A, White NJ, van der Poll T. Release of granzymes and chemokines in Thai patients with leptospirosis. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13:433-6.
69. De Fost M, Hartskeerl RA, Groenendijk MR, van der Poll T. Interleukin 12 in part regulates gamma interferon release in human whole blood stimulated with *Leptospira interrogans*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003; 10:332-5.
70. Dellinger RP, Mitchell ML, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R et al. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med*. 2008; 36: 296-327.
71. Delves PJ, Roitt IM. The immune system: first of two parts. *N Engl J Med*. 2000; 343(1): 37-49.
72. Delves PJ, Roitt IM. The immune system: second of two parts. *N Engl J Med*. 2000; 343(2): 108-117.
73. Diamant D, Brunialti MK, Romero EC, Kallas EG, Salomao R. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycoprotein. *Infect Immun*. 2002; 70:1677-83.
74. Dias JP, Teixeira MG, Costa MCN, Mendes CMCM, Guimarães P, Reis MG et al. Factors associated with *Leptospira* sp infection in a large urban Center in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; 40: 499-504.
75. Dinarello CA. Interleukin-1 and the pathogenesis of acute phase response. *N Engl J Med*. 1984; 311: 1413-1418.
76. Ding Y, Chung CS, Newton S, Chen Y, Carlton S, Albina JE et al. Polymicrobial sepsis induces divergent effects on splenic and peritoneal dendritic cell function in mice. *Shock*. 2004; 22: 137-144.
77. Dobrina A, Nardon E, Vecile E, Cinco M, Patriarca P. *Leptospira icterohemorrhagiae* and leptospire peptidoglycans induce endothelial

- cell adhesiveness for polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* 1995; 63(8): 2995-9.
78. Docke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN- gamma treatment. *Nat Med.* 1997; 3: 678-681.
79. Dorigatti F, Brunialti MK, Romero EC, Kallas EG, Salomao R. *Leptospira interrogans* activation of peripheral blood monocyte glycoprotein demonstrated in whole blood by release of IL-6. *Brz J Med Biol Res.* 2005; 38:909-14.
80. Dursun B, Bostan F, Artac M, Varan HI, Sulleymanlar G. Severe pulmonary haemorrhage accompanying hepatorenal failure in fulminant leptospirosis. *Int J Clin Pract.* 2007; 61(1): 61-7
81. Edwards CN, Nicholson GD, Hassell TA, Everard COR, Callender J. Penicilin therapy in icteric leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1988; 39: 388-390.
82. Edwards CN, Nicholson GD, Hassell TA, Everard COR, Callender J. Thrombocytopenia in leptospirosis: the absence of evidence for disseminated intravascular coagulation. *Am J Trop Med Hyg.* 1986; 35: 352-354.
83. Efron PA, Martins A, Minnich D. Characterization of the systemic loss of dendritic cells in murine lymph nodes during polymicrobial. *Sepsis.* 2004; 173: 3035-3043.
84. Ellis WA, Michna SW. Bovine leptospirosis: infection by the hebdomadis serogroup and abortion-a herd study. *Vet Ree.* 1976; 99: 409-412.
85. Emmanouilides CE, Kohn OF, Garibaldi R. Leptospirosis complicated by a *Jarisch-Herxheimer* reaction and adult respiratory disease syndrome: case report. *Clin Infec Dis.* 1994; 18: 1004-1006.
86. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholger U, Jarrar D, Trentz O et al. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood.* 1995; 85: 1341-7.

87. Estavoyer JM, Racadot E, Couetdic G, Leroy J, Grosperin L. Tumor necrosis factor in patients with leptospirosis. *Rev Infect Dis.* 1991; 13: 1245.
88. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne, Australia: MedSci; 1999.
89. Faine S. Factors affecting the development of the carrier state in leptospirosis. *J Hyg.* 1962; 60: 427-434.
90. Faine S. Virulence in *Leptospira*. I. Reactions of guinea-pig to experimental infection with *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Br J Exp Pathol.* 1957; 38(1): 1-7.
91. Fialho RN, Martins L, Pinheiro JP, Bettencourt BF, Couto AR, Santos MR et al. Role of human leukocyte antigen, killer-cell immunoglobulin-like receptors and cytokine gene polymorphisms in leptospirosis. *Hum Immunol.* 2009; 70: 915-20.
92. Flannery B, Pereira MM, Velloso LF, Carvalho CC, De Codes LG, Orrico GS et al. Referral pattern of leptospirosis cases during a large urban epidemic of dengue. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65: 657-663.
93. Flohe SB, Agrawal H, Schmidz D, Gertz M, Flohe S, Schade FU. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *J Leukoc Biol.* 2006; 79: 473-481.
94. Friedland J, Warrel DA. The *Jarisch-Herxheimer* reaction in leptospirosis: possible pathogenesis and review. *Res Infect Dis.* 1991; 13: 207-210.
95. Friedland JS, Porter JC, Daryanani S. Plasma pro-inflammatory cytokine concentrations, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) III scores and survival in patients in an intensive care unit. *Crit Care Med.* 1996; 24: 1775-1781.
96. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, Ministério da Saúde; 1998.

97. Ganoza CA, Matthias MA, Collins-Richards D, Brouwer KC, Cunningham CB, Segura ER et al. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Med*. 2006; 3(8):e308.
98. Gaudart N, Ekpo P, Pattanapanyasat K, van Kooyk Y, Engering A. *Leptospira interrogans* is recognized through DC-SIGN and induces maturation and cytokine production by human dendritic cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008; 53: 359-67.
99. Giamerellos-Bourboulis EJ, Tsaganos T, Spyridaki E, Mouktaroudi M, Plachouras D, Vaki I. Early changes of CD4+ lymphocytes and NK cells in patients with severe Gram-negative sepsis. *Crit Care*. 2006; 10(6): R166
100. Göebel A, Kavanaghi E, Lyons A, Saporoschetz IB, Soberg C, Lederer JA et al. Injury induces deficient interleukin-12 production, but interleukin-12 therapy after injury restores resistance to infection. *Ann Surg*. 2000; 231(2): 253-61.
101. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis*. 2000; 181: 176-180.
102. Gonçalves AJ, de Carvalho JE, Guedes e Silva JB, Rozembaum R, Vieira AR. Hemoptysis and the adult respiratory distress syndrome as the causes of death in leptospirosis. Changes in the clinical and anatomic pathological patterns. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1992; 25(4): 261-70.
103. Gonçalves AJR, Santino Filho F, Duarte F. Doença de Weil: aspectos epidemiológicos, clínicos, laboratoriais e anátomo patológicos de 14 casos. *Bol Cent Est Hosp Serv Est*. 1967; 19: 147-166.
104. Gouveia EL, Metcalfe J, Carvalho AL, Aires TS, Villasboas-Bisneto JC, Queiroz A et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary

- hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14: 505-508.
105. Guerreiro II, Croda J, Flannery B et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun.* 2001; 69: 4958-68.
 106. Guidugli F, Castro AA, Atallah AN. Systematic reviews on leptospirosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2000; 42:47-49.
 107. Guo YJ, Wang KY, Sun SH. Identification of an HLA-A*0201-restricted CD8+ T-cell epitope encoded within leptospiral immunoglobulin-like protein A. *Microbes and Infect.* 2010; 12: 364-373.
 108. Haake DA, Walkler EM, Bianco DR, Bolin CA, Muller MN, Lovett MA. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityporosa during *in vitro* cultivation. *Infect Immun.* 1991; 59:1131-1140.
 109. Haake DA, Lovett MA. Interjunction invasion of endothelial cell monolayers. *Methods Enzymal.* 1994; 236: 447-63.
 110. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun.* 2000; 68(4): 2276-2285.
 111. Haake DA. Spirochetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology.* 2000; 146: 1491-1504.
 112. Hauk P, Macedo F, Romero EC, Vasconcellos SA, Morais ZM, Barbosa AS et al. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infect Immun.* 2008; 76:2642-50.
 113. Hauk P, Negrotto S, Romero EC, Vasconcellos SA, Genovez ME, Ward RJ et al. Expression and characterization of HlyX hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni: potentiation of

- hemolytic activity by LipL32. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 333(4):1341-7.
114. Herxheimer G. Kurzer beitrage zur pathologie der Weil'schen krankheit. *Berl klin W chnschr*. 1916; 53: 494-495.
 115. Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, Manoque KR, Palladino MA Jr, Cerami A et al. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg Ginecol Obstet*. 1988; 116(2): 147-53.
 116. Higgins R & Cousineau G. The pathogenesis of leptospirosis I: hemorrhages in experimental leptospirosis in guinea pigs. *Can J Comp Med*. 1977; 41: 174- 81.
 117. Hospenthal DR, Murray CK. In vitro susceptibilities of seven *Leptospira* species to traditional and newer antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47:2646-48.
 118. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, Karl IE. Prevention of lymphocyte apoptosis – a potential treatment of sepsis? *Clin Infect Dis*. 2005; 41: S465-S469.
 119. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003; 348(2):138-150.
 120. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages in patients with sepsis. *J Immunol*. 2002; 168: 2493-2500.
 121. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE et al. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 14541-46.
 122. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol*. 2001; 166: 6952-6963.
 123. Hovind-Hougen K. Determination by means of electron microscopy of morphological criteria of value for classification of some spirochetes, in particular treponemes. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1976: Suppl 255: 1-41.

124. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem.* 1981; 29: 577-580.
125. Hu QL, Yin QZ, Wu SR, Dai BM, Lei YD. Relationship between the number of leptospire in blood, livers and lungs of guinea pigs and the pulmonary diffuse haemorrhage of leptospirosis. *Sichuan Yi Xue Yuan Xue Bao.* 1985; 16: 33-36.
126. Hubener and Heiter. Beitrage zur aetiologie der Weilschen krankheit. *Deutsche med Wchnschr.* 1915; 41: 1275-1277.
127. Hung CC, Chang CT, Tian YC et al. Leptospiral membrane proteins stimulate pro-inflammatory chemokines secretion by renal tubule epithelial cells through toll-like receptor 2 and p38 mitogen activated protein kinase. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 69: 1814-1822.
128. Ido YR, Hoki H, Wani H. The rat as a Carrier of *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, the causative agent of Weil'disease (*Spirochaeta icterohaemorrhagiae*). *J Exp Med.* 1917; 26:341-353.
129. Inada R, Ido Y, Hoki R, Kakeno R, Ito H. The etiology, mode of infection and specific therapy of Weil's disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). *J Exp Med.* 1916; 23: 377-403.
130. Inoue J, Unsinger J, Davis CG, Muenzer JT, Ferguson TA, Chang K et al. IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptative immune dysfunction and improves survival in sepsis. *J Immunol.* 2010; 184:1401-1409.
131. Isogai E, Isogai H, Kubota T, Fujii N, Hayashi S, Indoh T. Apoptosis of lymphocytes in mice administered lipopolysaccharide from *Leptospira interrogans*. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1998; 45 (9): 529-37.
132. Ito T, Yanagawa R. Leptospiral attachment to extracellular matrix of mouse fibroblast (L929) cells. *Vet Microbiol.* 1987; 15:89-96.

133. Jin D, Ojcius DM, Sun D, Dong H, Luo Y, Mao Y et al. *Leptospira interrogans* induces apoptosis in macrophages via caspase-8 and caspase-3-dependent pathways. *Infect. Immun.* 2009; 77: 799-809.
134. Johnson RC, Harris VG. Antileptospiral activity of serum II: leptospiral virulence factor. *J Bacteriol.* 1967; 93: 513-519.
135. Kanashiro-Yamashiro EH, Benard G, Sato MN, Seguro AC, Duarte AJS. Cellular immune response analysis of patients with leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1991; 45: 138- 145.
136. Karp CL, Wysocka M, Ma X, Marovich M, Factor RE, Nutman T et al. Potent suppression of IL-12 production from monocytes and dendritic cells during endotoxin tolerance. *Eur J Immunol.* 1998; 37:446-448.
137. Klimpel GR, Mathias MA, Vinetz JM. *Leptospira interrogans* activation of human peripheral blood mononuclear cells: preferential expansion of TCR gamma delta + T cells vs TCR alpha beta + T cells. *J Immunol.* 2003; 171:1447-55.
138. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.* 1985; 13: 818-
139. Ko AI, Galvao-Reis M, Dourado CMR, Jr Johnson WD, Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet.* 1999; 354:820-25.
140. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Rev Microbiol.* 2009; 7:736-47.
141. Kox WJ, Bone RC, Krausch D, Rocke WD, Kox SN, Wane H et al. Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle. *Arch Intern Med.* 1997; 157: 389-393.
142. Kuriakose M, Eapen CK, Paul R. Leptospirosis and Kolenchery, Kerala, India: epidemiology, prevalent local serogroups and serovars and a new serovar. *Eur J Epidemiol.* 1997; 13(6): 691-7.

143. Lacerda HG, Monteiro GR, Oliveira CC, Suassuna FB, Queiroz JW, Barbosa JD et al. Leptospirosis in a subsistence farming community in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008; 102: 1233-1238.
144. Lecour H, Miranda M, Magro C, Rocha A, Gonçalves V. Human leptospirosis-a review of 50 cases. *Infection.* 1989; 17: 8-12.
145. Lee SH, Kim S, Park SC, Kim MJ. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. *Infect Immun.* 2002; 70:315-322.
146. Levett PN & Smythe L. International Committee on systematic of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae. *Intern J System and Evolutionary Microbiol.* 2008; 58: 1049-1050.
147. Levett PN, Morey RE, Galloway RI, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol.* 2005; 54(Pt 1): 45-9.
148. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14:296-326.
149. Li C, Motaleb MA, Sal M, Goldstein SF, Chacon N. Gyration, rotation, periplasmic flagella: the biology of spirochete motility. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2000; 2: 345-354.
150. Li LW, Liu YY, Yan J, Mao YF, Luo YH, Li SP. Apoptosis and ultrastructural lesions in Vero and J774A.1 cells induced by *Leptospira interrogans*. *Zhejiang da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2005; 34(1):4-8.
151. Li LW, Ojcius DM, Yan J. Comparison of invasion of fibroblasts and macrophages by high- and low-virulence *Leptospira* strains: colonization of the host-cell nucleus and induction of necrosis by the virulent strain. *Arch.Microbiol.* 2007; 188: 591-98.
152. Li S, Ojcius DM, Liao S, Li L, Xue F, Dong H et al. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of humano or mouse origin. *Innate Immun.* 2010; 16(2):80-92.

153. Li SJ, Hu Y, Yan, J Mao YF, Li LW. Upregulation of FasL/Fas expression and FasL/Fas-associated apoptosis in J774.1 cells induced by *Leptospira interrogans*. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2008; 37(6): 551-557.
154. Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, Leisenring WM, Bulger EM, Neff MJ, et al. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *J Am Med Assoc*. 2008; 300: 413-422.
155. Lin CL, Wu MS, Yang CW, Huang CC et al. Leptospirosis associated with hypokalaemia and thick ascending limb dysfunction. *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14: 193-195.
156. Lingappa J, Kuffner T, Tappero J, Whitworth W, Mize A, Kaiser R et al. HLA-DQ6 and ingestion of contaminated water: possible gene-environment interaction in an outbreak of leptospirosis. *Genes Immun*. 2004; 5: 197-202.
157. Liu Y, Zheng W, Li L, Mao Y, Yan J. Pathogenesis of leptospirosis: interaction of *Leptospira interrogans* with in vitro cultured mammalian cells. *Med Microbiol Immunol*. 2007; 196: 233-239.
158. Lowanitchapat A, Payungporn S, Sereemasun A, Ekpo P, Phulsuksombati D, Poovorawan Y et al. Expression of TNF- α , TGF- β , IP-10 and IL-10 mRNA in kidneys of hamsters infected with pathogenic *Leptospira*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2009, doi: 10.1016/j.cimid. 2009.05.001
159. Luyt CE, Deback C, Aubriot-Lorton MH, Nieszkowska A, Trouillet JL, et al. Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 May 1; 175(9):935-42.
160. MacClain JBL, Ballou WR, Harrison SM, Steinweg DL. Doxycycline therapy for leptospirosis. *Ann Intern Med* 1984; 100: 696-698.
161. Maciel EA, Athanazio DA, Reis EA, Cunha FQ, Queiroz A, Almeida D et al. High serum nitric oxide levels in patients with severe leptospirosis. *Acta Trop*. 2006; 100:256-260.

162. Maciel EA, Carvalho L, Nascimento SF, Matos RB, Gouveia EL, Reis MG et al. Household transmission of *Leptospira* infection in urban slum communities. *PLoS Neglected Trop Dis*. 2008;2(1): e154.
163. Marangoni A, Accardo S, Aldini R, Guardigli M, Cavrini F, Sambri V et al. Production of reactive oxygen species and expression of inducible nitric oxide synthase in rat isolated Kupffer cells stimulated by *Leptospira interrogans* and *Borrelia burgdorferi*. *World J Gastroenterol*. 2006; 12 (19): 3077-3081.
164. Marangoni A, Aldini R, Sambri V et al. Uptake and killing of *Leptospira interrogans* and *Borrelia burgdorferi*, spirochetes pathogenic to humans, by reticuloendothelial cells in perfused rat liver. *Infect Immun*. 2000; 68:5408-5411.
165. Marinho M, Oliveira-Júnior IS, Monteiro CMR, Perri SH, Salomão R. Pulmonary disease in hamsters infected with *Leptospira interrogans*: histopathologic findings and cytokine mRNA expressions. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 80: 832- 836.
166. Marinkovic S, Jahreis GP, Wong GG. IL-6 modulates the synthesis of a specific set of acute phase proteins *in vivo*. *J Immunol*. 1989; 142(3): 808-812.
167. Marotto PC, Nascimento CM, Eluf Neto J et al. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome and factors associated with mortality. *Clin Infect Dis*. 1999; 29: 1561-63.
168. McBride AJ, Pereira FA, Da Silva ED, de Matos RB, Da Silva ED, Ferreira AG et al. Evaluation of the EIE-IgM-Leptospirose assay for the serodiagnosis of leptospirosis. *Acta Trop*. 2007; 102: 206-211.
169. McBride AJA, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2005; 18: 376-386.
170. McClain JB, Ballou WR, Harrison SM, Steinweg DL. Doxycycline therapy for leptospirosis. *Ann Intern Med*. 1984; 100: 696-698.

171. McDunn JE, Turbull IR, Palpitiya AD, Tong A, MacMillan SK, Osborne DF et al. Splenic CD4+ T cells have a distinct transcriptional response six hours after the onset of sepsis. *J Am J Coll Surg*. 2006; 203(3): 365-75.
172. Meakins JL, Pietsch JB, Bubenick O, Kelly R, Rodett R, Grodon J et al. Delayed hypersensitivity: indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma. *Ann Surg*. 1977; 186: 241-250.
173. Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity. *N Engl J Med*. 2000; 343(5):338-344.
174. Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospirae. *Microb Pathog*. 2005; 39(4): 139-47.
175. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira spp*. In clinical samples. *J Clin Microbiol*. 1992; 30:2219-24.
176. Merien F, Baranton G, Perolat P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect Immun*. 1997; 65:729-738.
177. Merien F, Truccolo J, Baranton g, Perolat P. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. *FEMS Microbiol Lett*. 2000; 185:17-22.
178. 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*. 1998; 169:95-102.
179. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Vendt F, Debard AL et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med*. 2006; 32: 1175-1183.

180. Muensoongnoen J, Phulsuksombati D, Parichatikanond P, Sangian N, Pilakasiri C, Sripaoraya K et al. A histopathological study of hearts and spleens of hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leptospira interrogans*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2006; 37(4):720-8.
181. Nahori MA, Fournié-Amazouz E, Que-Gewirth NS, Balloy V, Chignard M, Raetz CR et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol*. 2005; 175(9):6022-31.
182. Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. *Infect Immunol*. 2001; 69:7550-8.
183. Naiman BM, Blumberman S, Alt D, Bolin CA, Brown R, Zuerner R et al. Evaluation of type 1 immune response in naïve and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. Involvement of WC1+ $\gamma\delta$ and CD4 T cells. *Infect Immunol*. 2002; 70:6147-6157.
184. Nally JE, Chantranuwat C, Wu XY, Fishbein MC, Pereira MM, Da Silva JJ et al. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Pathol*. 2004; 164:1115-1127.
185. Nally JE, Chow E, Fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. *Infect Immunol*. 2005; 73:3251-3260.
186. Nally JE, Timoney JF, Stevenson B. Temperature-regulated protein synthesis by *Leptospira interrogans*. *Infect Immunol*. 2001; 69: 400-04.
187. Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA et al. Comparative genomics of two *Leptospira*

- interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol.* 2004; 186: 2164-2172.
188. Nascimento AL, Verjovski-Almeida S, Van Sluys MA et al. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37: 459-477.
 189. Navarre WW, Zychlinsky A. Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. *Cell Microbiol.* 2000; 2:265-73.
 190. Navarro CE, Kociba GJ. Hemostatic changes in dogs with experimental *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection. *Am J Vet Res.* 1982; 43: 904-6.
 191. Netea MG, Van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Toll like receptors and host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol.* 2004; 75(5): 749-55.
 192. Nicodemo AC, Duarte MI, Alves VA, Takakura CF, Santos RT, Nicodemo EL. Lung lesions in human leptospirosis: microscopic, immunohistochemical and ultrastructural features related to thrombocytopenia. *Am J Trop Med Hyg.* 1997; 56:181-87.
 193. Niwattayakul K, Kaewtasi S, Chueasuwanchai S, Hoontrakul S, Chareonwat S, Suttinont C et al. An open randomized controlled trial of desmopressin and pulse dexamethasone as adjunct therapy in patients with pulmonary involvement associated with severe leptospirosis. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(8):1207-12.
 194. Ohteki T. Critical role for IL-15 in innate immunity. *Curr Mol Med.* 2002; 2 (4): 371-380.
 195. Opal SM, Fischer CJ Jr, Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med.* 1997; 25: 1115-1124.

196. Panaphut T, Domrongkitchaiporn S, Vibhagool A, Thinkamrop B, Susaengrat W. Ceftriaxone compared with sodium penicillin G for treatment of severe leptospirosis. *Clin Infect Dis*. 2003; 36: 1507-13.
197. Park SK, Lee SH, Rhee YK, Kang SK, Kim KJ, Kim MC et al. Leptospirosis in Chonbuk Province of Korea in 1987: a study of 93 patients. *Am J Trop Med Hyg*. 1989; 41: 345-351.
198. Paster BJ, Dewhirst FE, Weisburg WG, Tordoff LA, Fraser GJ, Hespell RB et al. Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J Bacteriol*. 1991; 173: 6101-6109.
199. Paster BJ. Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J. Bacteriol*. 1999; 173: 6101-6109.
200. Pereira MM, Andrade J, Marehewsky RS, Dos Santos RR. Morphological characterisation of lung and kidney lesions in C3H/HeJ mice infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae: defect of CD4+ and CD8+ T-cells are prognosticators of the disease progression. *Exp Toxicol Pathol*. 1998; 50: 191-198.
201. Pereira MM, Matsuo MG, Bauab AR, Vasconcelos SA, Moraes ZM, Baranton G et al. A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans* sensu stricto is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2000; 45:245-248.
202. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One*. 2008; 3(2): e1607.
203. Pick L. Sur pathologischen anatomie des infektiösen icterus. *Berl klin W chnschr*. 1917; 54: 451-455.
204. Praditpornsilpa K, Sangjun N, Kittikowit W, Phulsuksombati D, Avihingsanon Y, Kansanabuch T et al. Alleviation of renal and pulmonary injury by immunomodulation in leptospirosis: hamster model. *J Med Assoc Thai*. 2006; 89: S178-87.

205. Que-Gewirth NL, Ribeiro AA, Kalb SR, Cotter RJ, Bulach DM, Adler B et al. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR. *J Biol Chem.* 2004; 279: 25420-29.
206. Radaelli E, Del Piero F, Aresu L, Sciarrone F, Vicari N, Mattiello S et al. Expression of major histocompatibility complex class II antigens in porcine leptospiral nephritis. *Vet Pathol.* 2009; 46: 800-9.
207. Raghavan UM, Palaniappan RU, Ramanujam S, Chang YF. Leptospirosis: pathogenesis, immunity and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2007; 20:284-92.
208. Rajan G, Sleight JW. Lymphocyte counts and the development of nosocomial sepsis. *Intensive Care Med.* 1997; 23: 1187.
209. Raoul D, Jaendel P, Mailloux M, Rougier Y. Thrombocytopenia and renal failure in leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1983; 32: 1464.
210. Raptis L, Pappas G, Akritidis N. Use of ceftriaxone in patients with severe leptospirosis. *Int J Antimicrob Agents.* 2006; 28(3): 259-61.
211. Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RD, Santana, Mohr S, Melendez AX et al. Impact of environmental and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2: e228
212. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H et al . Unique and physiological pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole genome sequencing. *Nature.* 2003; 422: 888-893.
213. Resendes AR, Majó N, Segalés J, Espadamala J, Mateu E, Chianini F et al. Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues. *Vet Immunol Pathol.* 2004; 99:203-13.
214. Ressler RA, Griffith ME, Beckius ML, Pimentel G, Miller RS, Mende K et al. Antimicrobial susceptibilities of geographically diverse clinical human isolates of *Leptospira*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(8):2750-4.

215. Ristow P, Bourby P, da Cruz McBride FW, Figueira CP, Huerre M, Ave P. The OmpA-like protein loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog.* 2007; 3: 894-903.
216. Ristow P, Bourhy P, Kerneis S, Schmitt C, Prevost MC, Lilenbaum W et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology.* 2008; 154:1309-1317.
217. Romero EC, Bernardo CC, Yasuda PH. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2003; 45(5):245-248.
218. Romero EC, Yasuda PH. Molecular characterization of *Leptospira* sp. strains isolated from human subjects in São Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: a public health tool. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101: 373-378.
219. Roy S, Biswas D, Vijayachari P, Sugunan AP, Sehgal SC. Antigenic and genetic relatedness of *Leptospira* strains isolated from the Andaman Island in 1929 and 2001. *J Med Microbiol.* 2003; 52(Pt 10): 909-11.
220. Rugman FP, Pinn C, Palmer MF, Waite M, Hay CR. Anticardiolipin antibodies in leptospirosis. *J Clin Pathol.* 1991; 44: 517-519.
221. Russel JA. Management of sepsis. *N Engl J Med.* 2006; 355: 1699-1713.
222. Sacramento E, Lopes AA, Costa E, Passos OL, Costa YA, Matos ED. Electrocardiographic alterations in patients hospitalized with leptospirosis in the Brazilian city of Salvador. *Arq Bras Cardiol.* 2002; 78: 267-70.
223. Salkade HP, Divate S, Deshpande JR, Kawishwar V, Chaturvedi R, Kandalkar BM et al. A study of autopsy findings in 62 cases of leptospirosis in a metropolitan city in India. *J Postgrad Med.* 2005; 51: 169-173.
224. Santiago M, Martinelli R, Ko A, Reis EA, Fontes RD, Nascimento EG et al. Anti-beta2 glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in

- leptospirosis, syphilis and Kala-azar. *Clin Resp Reumatol*. 2001; 19(4): 425-30.
225. Sasaki DN, Pang L, Minette HP, Wakida CK, Fujimoto WJ, Maines SJ et al. Active surveillance and risk factors for leptospirosis in Hawaii. *Am J Trop Med Hyg*. 1993; 48:35-43.
226. Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Ricaldi JN, Torres S, Silva H et al. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity with quantification of leptospiral burden. *Clin Infect Dis*. 2005; 40:343-351.
227. Seguro AC, Lomar AV, Rocha AS. Acute renal failure of leptospirosis: nonoliguric and hypokalemic forms. *Nephron*. 1990; 55: 146-151.
228. Sehgal SC, Murhekar MV, Sugunan AP. Outbreak of leptospirosis with pulmonary involvement in North Adaman. *Indian J Med Res*. 1995; 102: 9-12.
229. Sehgal SC, Sugunan AP, Murhekar MV, Sharma S, Vijayachari P. Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. *Int J Antimicrob Agents*. 2000; 13: 249-55.
230. Shenoy VV, Nagar VS, Chowdhury AA, Bhalgat PS, Juvele NI. Pulmonary leptospirosis: an excellent response to bolus methylprednisolone. *Postgrad Med J*. 2006; 82: 602-6.
231. Shimizu T, Matsusaka E, Nagakura N, Takwanagi K, Masuzawa T, Iwamoto Y et al. Chemical properties of of lipopolysaccharide-like substance (LLS) extracted from *Leptospira interrogans* serovar canicola strain Moulton. *Microbiol immunol*. 1987; 31: 717-725.
232. Shimizu T, Matsusaka E, Takayanagi K, Masuzawa T, Iwamoto Y, Morita T et al. Biological activities of lipopolysaccharide-like substance (LLS) extracted from *Leptospira interrogans* serovar canicola strain Moulton. *Microbiol immunol*. 1987; 31: 727-735.

233. Silva EF, Santos CS, Athanazio DA, Seyffert N, Seixas FK, Cerqueira GM et al. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. *Vaccine* 2008; 26(31):3892-6.
234. Silva JJ, Dalston MO, Carvalho JE, Setubal S, Oliveira JM, Pereira MM. Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35: 395-99.
235. Simpson FG, Green KA, Haug GJ, Brookes DL. Leptospirosis associated with severe pulmonary haemorrhage in far North Queensland. *Med J Aust.* 1998; 169: 151-153.
236. Singh SS, Vijayachari P, Sinha A, Sugunan AP, Rashid MA, Sehgal SC. Clinical epidemiology study of hospitalized cases severe leptospirosis. *Indian J Med Res.* 1999; 109: 94-99.
237. Siriwanij T, Suttinont C, Tantawichien T, Chusil S, Kanjanabuch T, Sitprija V. Haemodynamics in leptospirosis: effects of plasmapheresis and continuous veno-venous haemofiltration. *Nephrology (Carlton)* 2005; 10:1-6.
238. Sitiprija V. Renal dysfunction in leptospirosis: a view from the tropics. *At Clin Pract Nephrol.* 2006; 12: 658-659.
239. Slack AT, Kalambaheti T, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL, Steigerwalt AG et al. *Leptospira wolfii* sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008; 58: 2305-2308.
240. Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD. The epidemiology of leptospirosis and the emergence of *Leptospira borgpetersenii* serovar Arborea in Queensland, Australia, 1998-2004. *Epidemiol Infect.* 2006; 134: 1217-1225.
241. Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ et al. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic leptospira spp. *BMC Infect Dis.* 2002; 2:13.

242. Solbrig MV, Sher JH, Kula RW. Rhabdomyolysis in leptospirosis (Weil's disease). *J Infect Dis.* 1987; 156: 692-93.
243. Spichler A, Ko AI, Silva EF, De Brito T, Silva AM, Athanazio D et al. Reversal of renal tubule transporter downregulation during severe leptospirosis with antimicrobial therapy. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77: 1111- 1119.
244. Spichler A, Moock M, Chapola EG, Vinetz J. Weil's disease: an unusually fulminant presentation characterized by pulmonary hemorrhage and shock. *Braz J Infect Dis.* 2005; 9: 336-340.
245. Spichler AS, Athanazio D, Buzzar M, Castro B, Chapolla E, Seguro A. Using death certificate reports to find severe leptospirosis cases, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13:1559-1561.
246. Spichler AS, Vilaça PJ, Athanazio DA, Albuquerque JO, Buzzar M, Castro B et al. Predictors of lethality in Severe leptospirosis in urban Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 79(6): 911-914.
247. Stevenson B, Choy HA, Pinne M, Rotondi ML, Muller MC, Demoll E et al. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS One* 2007; 2(11): e1188.
248. Stimson AM. A note on an organism found in yellow fever tissues. *Pub Health Rep.* 1907; 22: 541.
249. Suvas S, Rouse BT. Treg control of antimicrobial T cell response. *Current opinion in immunology.* 2006; 18:344-348.
250. Tajiki H, Salomão R. Association of plasma levels of tumor necrosis factor alpha with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 1996; 23:1177-78.
251. Tajiki MH, Nakama AS, Salomao R. The ratio levels of IL10/TNF alpha and its relationship to disease severity and survival in patients with leptospirosis. *Braz J Infect Dis.* 1996; 1:138-141.
252. Tassinari WS, Pellegrini DCP, Sabroza PC, Carvalho MS. Distribuição espacial da leptospirose no Município do Rio de

- Janeiro, Brasil, ao longo dos anos de 1996-1999. *Cad Saúde Pública*. 2004; 20(6): 1721-1729.
253. Thiermann AB. Use of solid medium for isolation of leptospirosis of the hebdomadis serogroup from bovine milk and urine. *Am J Vet Res*. 1981; 42: 2143-2145.
 254. Thomas DD, Higbie LM. *In vitro* association of leptospires with host cells. *Infect Immun*. 1990; 58:581-585.
 255. Tian YC, Chen YC, Hung CC, Chang CT, Wu MS, Phillips AO et al. Leptospiral outer membrane protein induces extracellular matrix accumulation through a TGF β 1/Smad-dependent pathway. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 2792-2798.
 256. Tinsley KW, Grayson MH, Swanson PE. Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells. *J Immunol*. 2003; 171: 909-914.
 257. Torre D, Ciola M, Martegani R, Zeroli C, Fiori GP, Ferrario G et al. Aseptic meningitis caused by *Leptospira australis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994; 13(6): 496-7.
 258. Trevejo RT, Rigau-Perez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquin-Gonzalez C, Amador JJ et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis*. 1998; 178:1457-1463.
 259. Triverdi SV, Chavda RK, Wadia PZ, Sheth V, Bhagade PN, Trivedi SP et al. The role of glucocorticoid pulse therapy in pulmonary involvement in leptospirosis. *J Assoc Physicians India*. 2001; 49: 901-3.
 260. Triverdi SV, Vasava AH, Bhatia LC, Patel TC, Patel NK, Patel NT. Plasma exchange with immunosuppression in pulmonary alveolar haemorrhage due to leptospirosis. *Indian J Med Res*. 2010; 131: 429-433.

261. Triverdi SV, Vasava AH, Patel TC, Bhatia LC. Cyclophosphamide in pulmonary alveolar hemorrhage due to leptospirosis. *Indian J Criticare Med.* 2009; 13(2): 79-84.
262. Truccolo J, Serais O, Merien F, Perolat P. Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. *FEMS Microbiol Lett.* 2001; 204:317-321.
263. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol.* 2004;7: 35-40.
264. Tu V, Adler B, Faine S. The role of macrophages in the protection of mice against leptospirosis: in vitro and in vivo studies. *Pathology.* 1982; 14(4):463-8.
265. Tuero I, Vinetz JM, Klimpel GR. Lack of demonstrable memory T cell responses in humans who have spontaneously recovered from leptospirosis in the Peruvian Amazon. *J Infect Dis.* 2010;201:420-427.
266. Turnbull IR, Buchman TG, Javadi P, Woolsey CA, Hotchkiss RS, Karl IE, Coopersmith CM. Age disproportionately increases sepsis-induced apoptosis in the spleen and gut epithelium. *Shock.* 2004; 22(4):364-8
267. Uhlenhuth P, Fromme W. Zur aetiologie der sog. Weil'schen krankheit (austeckende Gelbsucht). *Berl klin W chnschr.* 1916; 53: 269-273.
268. Uip DE, Amato Neto V, Duarte MS. Diagnóstico precoce da leptospirose por demonstração de antígenos através de exame imuno-histoquímico em músculo da panturrilha. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1992; 34: 375-381.
269. Van der Poll T, Opall SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis.* 2008; 8: 32-43.
270. Van Kooyk Y & Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 697-709.

271. Vanasco NB, Schmeling MF, Lottersberger J, Costa F, Ko Al Tarabla HD. Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005). *Acta Trop.* 2008; 107: 255-258.
272. Venet F, Davin F, Guignant C, Larue A, Cazalis MA, Darbon R et al. Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock.* 2010; 34(4): 358-63.
273. Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med.* 2004; 32(11): 2329-2331.
274. Venet F, Tissot S, Debard AL, Faudot C, Crampé C, Pachot A et al. Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: correlation with severity and secondary septic shock. *Crit Care Med.* 2007; 35: 1910-1917.
275. Verma A, Arthiushin S, Matsunaga J et al. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* 2006; 73: 2659-2666.
276. Verma A, Rathinam SR, Priya CG, Muthukkaruppan VR, Stevenson B, Timoney JF. LruA and LruB antibodies in sera of humans with leptospiral uveitis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008; 15: 1019-1023.
277. Vernel-Pauillac F, Merien F. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 2006; 74: 4172-9.
278. Vieira ML, D'Atri LP, Schattner M, Habarta AM, Barbosa AS, Morais ZM et al. A novel leptospiral protein increases ICAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 276:172-180.
279. Vieira ML, Morais ZM, Gonçalves AP, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento ALTO. Lsa63, a newly identified surface protein of

- Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. *J Infect.* 2010; 60: 52-64.
280. Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci.* 2008; 33(4): 557-569.
 281. Vinetz JM, Glass GE, Flexner CE, Mueller P, Kaslow DC. Sporadic urban Leptospirosis. *Am Intern Med.* 1996; 125: 794-98.
 282. Vinetz JM. A mountain out of a molehill: do we treat acute leptospirosis, and if so, with what? *Clin Infect Dis.* 2003;36: 1514-15.
 283. Vinh T, Adler B, Faine S. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *J Gen Microbiol.* 1986; 132:103-109.
 284. Viriyakosol S, Matthias MA, Swancutt MA, Kirkland TN, Vinetz JM. Toll-like receptor 4 protects against lethal *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection and contributes to in vivo control of leptospiral burden. *Infect Immun.* 2006; 74: 887-895.
 285. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalde J, Girkontaite I. Immunossuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* 1997; 390: 350-351.
 286. Wagenaar JFP, Gasem MH, Goris MGA, Leeflang M, Hartskeerl RA, van der Poll T et al. Soluble ST2 levels are associated with bleeding in patients with severe leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; 3(6): e453.
 287. Walport MJ. Complement: first of two parts. *N Engl J Med.* 2001; 344 (14): 1058-1066.
 288. Wang B, Sullivan JA, Sullivan GW, Mandell GL. Role of specific antibody in interaction of leptospires with human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infection and immunity.* 1984; 46: 809-813.
 289. Wardle EN. Interferon gamma: actions and importance. *Br J Hosp Med.* 1987; 37: 446-8.

290. Watt G, Padre LP, Tuazon ML, Calubaquib C, Santiago E, Ranoa CP, Laughlin LW. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. *Lancet*. 1988; i:433-435.
291. Watt G, Warrell DA. Leptospirosis and Jarisch-Herxheimer reaction. *Clin Infect Dis*. 1995; 20: 1437-1438.
292. Weil A. Ueber eine elgenthumliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einêrgehende acute infectionskrankheit. *Dtsch Arch Klin Med*. 1886; 39: 209-232.
293. Wen H, Hogaboam CM, Gauldie J, Kunkel SI. Severe sepsis exacerbates cell-mediated immunity in the lung due to an altered dendritic cell cytokine profile. *Am J Pathol*. 2006; 168: 1940- 1950.
294. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol*. 2001; 2: 346-52.
295. Wolf JW. The laboratory diagnosis of leptospirosis. C.C. Thomas, Springfield. Ill.1954.
296. Wu M, Yang C, Pan M, Chang C, Chen Y. Reduced renal Na⁺K⁺Cl⁻ co-transporter activity and inhibited NKCC2 mRNA expression by *Leptospira shermani*: from bed-side to bench. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19: 2472-2479.
297. Xue F, Yan J, Picardeau M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira spp.*: lessons learned from the genomes. *Microbes Infect*. 2009; 11: 328-333.
298. Yang CW, Hung CC, Wu MS, Tian YC, Chang CT, Pan MJ et al. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. *Kidney Int*. 2006; 69: 815-822.
299. Yang CW, Wu MS, Pan MI. Leptospirosis renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16: 73-77.
300. Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hsieh WJ, Vandewalle A, Huang CC. The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces

- tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13:2037-2045.
301. Yang CW. Leptospirosis renal disease: understanding the initiation by Toll-like receptors. *Kidney International*. 2007; 72: 918-25.
 302. Yang GG, Hsu YH. Nitric oxide production and immunoglobulin deposition in leptospiral hemorrhagic respiratory failure. *J Formos Med Assoc*. 2005; 104: 759-763.
 303. Yasuda PH, Hoshino-Shimizu S, Yamashiro EH, 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*. 1986; 29 (1): 35-43.
 304. Yersin C, Bovet P, Merien F, Clement J, Laille M, Van Ranst M. Pulmonary haemorrhage as a predominant cause of death in leptospirosis in Seychelles. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000; 94: 71-76.
 305. Younes-Ibrahim M, Buffin-Meyer B, Cheval L, Burth P, Castro-Faria MV, Barlet-Bas C et al. Na-K-ATPase: a molecular target for *Leptospira interrogans* endotoxin. *Braz J Med Biol Res*. 1997; 30: 213-223.
 306. Yukawa M, Mochizuki K, Kosaka T, Kamata H, Awaya A, Kobayashi H et al. Protective effects of serum thymic factor to *Leptospira interrogans* serovar Copanahageni infection in Mongolian gerbils. *Vet Microbiol*. 1994; 41:99-106.
 307. Zaki S, Spiegel RA. Leptospirosis. In: Nelson AM, Horsburgh Jr CR (eds). *Pathology of Emerging Infections Vol 2* American Society for Microbiology: Washington, DC, 1998, pp 73-92.
 308. Zaki SR, Shieh WJ. Leptospirosis associated with outbreak of febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. The epidemic Working Group at Ministry of Health in Nicaragua. *Lancet*. 1996; 347:535-536.

309. Zhang Y, Bao L, Zhu HL, Huang B, Zhang HD. OmpA-like protein Loa22 from *Leptospira interrogans* serovar Lai is cytotoxic to cultured rat renal cells and promotes inflammatory responses. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2010; 42: 70-79.
310. Zhang Y, Bao L, Zhu HL, Huang B, Zhang L, Zhang HD. Expression and identification of gene Loa22 from the virulent strain of serovar Lai of *L. interrogans* and its cytotoxicity to macrophages. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2008; 39(3): 351-4.
311. Zhang YX, Geng Y, Yang JW, Guo XK, Zhao GP. Cytotoxic activity and probable apoptotic effect of Sph2, a sphingomyelinase hemolysin from *Leptospira interrogans* strain Lai. *BMB Rep.* 2008; 41(2):119-25.