JOSEFA BEZERRA DA SILVA

**PAPEL DAS CITOCINAS E QUIMIOCINAS NA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA MURINA NA INFECÇÃO POR *Leptospira interrogans*
sorovar Copenhageni**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia – USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia

São Paulo
2012

JOSEFA BEZERRA DA SILVA

**PAPEL DAS CITOCINAS E QUIMIOCINAS NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA
MURINA NA INFECÇÃO POR *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia – USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Elizabeth A.L.Martins

Versão Corrigida. A versão original encontra-se
arquivada no Setor de Comunicação do ICB.

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Da Silva, Josefa Bezerra.

Papel das citocinas e quimiocinas na resposta imunológica murina na infecção por *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni / Josefa Bezerra da Silva. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Elizabeth Angélica Leme Martins.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Interação patógeno hospedeiro.

Versão do título para o inglês: The role of cytokines and chemokines in the murine immune response in infection by *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni.

Descritores: 1. *Leptospira* 2. Lepstopirose 3. Quimiocinas 4. Camundongos C3H/HeJ I. Martins, Elizabeth Angélica Leme II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB032/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
 Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/IPT

Candidato (a): Josefa Bezerra da Silva

Título da Dissertação: Papel das citocinas e quimiocinas na resposta imunológica murina na infecção por *Leptospira interrogans* sorovar copenhageni

Orientador (a): Elizabeth A.L.Martins

A comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Tese de Doutorado, Em sessão pública realizada a ...../...../..... considerou,
 (   ) Aprovado (a)   (   ) Reprovado (a)

Examinador (a): Assinatura.....

Nome: .....

Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura.....

Nome: .....

Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura.....

Nome: .....

Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura.....

Nome: .....

Instituição:.....

Presidente : Assinatura.....

Nome: .....

Instituição:.....

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da expressão de citocinas na resposta imunológica de camundongos C3H/HeJ e Balb/c infectados com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni" **protocolo nº 560/08**, sob a responsabilidade de Elizabeth A. E. Martins e Josefa B. da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **10/12/2008**.

We certify that the research entitled "Evaluation of cytokines and chemokines on immunologic response in mice infected with *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni", protocol nº 560/08, under the responsibility of Elizabeth A. E. Martins and Josefa B. da Silva, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 12/10/2008.

A CEUAIB autorizou a(s) mudança(s) solicitada(s) pela pesquisadora, ou seja, um aditivo para as espécies de camundongos e hamsters.

Vigência do Projeto: 01/2009 – 12/2011	Nº de animais/espécie Total para o projeto
	80 Hamster <i>Mesocricetus auratus</i> Machos
	140 camundongos Balb/c Machos
	140 camundongos C3H/HeJ Machos
	140 camundongos C3H/HePas

Centro de Biotecnologia

São Paulo, 14 de maio de 2010.

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

A minha família pelo apoio
e a minha filha Micaela da Silva
Luízar por compreender a minha
ausência em alguns momentos.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Elizabeth Martins do Laboratório de Biotecnologia Molecular III, Instituto Butantan, pela colaboração, supervisão, sugestões e confiança em mim depositada.

Ao Dr. Paulo Lee Ho do Laboratório de Biotecnologia Molecular I, Instituto Butantan, pelas sugestões valiosas contribuindo para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Dr. Sílvio Vasconcelos da Faculdade de Medicina Veterinária – USP, pelas sugestões e fornecimento da estirpe de *L. interrogans* para a realização desta pesquisa.

À Dra. Telma Zorn e a doutoranda Ambart Covarrubias do Laboratório de Biologia da Reprodução e Matriz Extracelular – USP, pela colaboração nas análises histopatológicas e sugestões valiosas.

À Dra. Martha Pereira e a sua equipe em especial a Tatiana V. Ramos do Centro Colaborador da OMS para Leptospirose – FIOCRUZ, RJ, pelo apoio, colaboração e ensinamentos nesta área.

Aos colegas Enéas de Carvalho, Regiane Favaro Degan e Ana Tung do Laboratório de Biotecnologia Molecular I – Instituto Butantan, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca do ICB/USP, pela eficiência nos serviços prestados.

Aos funcionários da Secretária de Pós-Graduação - USP/Instituto Butantan/IPT, pela atenção e pelos serviços prestados.

Aos colegas do Instituto Butantan, pela colaboração e pela convivência agradável.

A todos aqueles que contribuíram direto ou indiretamente durante o desenvolvimento desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Da Silva JB. Papel das citocinas e quimiocinas na resposta imunológica murina na infecção por *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni. [Tese/Doutorado Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

A leptospirose é uma zoonose disseminada em todo o mundo, causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*. Os roedores infectados transportam as bactérias e as dispersam no ambiente através da urina, promovendo infecção no homem via contato com a pele. A bactéria se dissemina através do sistema circulatório, colonizando os órgãos alvos. A patogênese em humanos é observada principalmente no pulmão, fígado e rim. Diversos estudos têm avaliado os danos nos tecidos de diferentes espécies de camundongos infectados por *L. interrogans*, mas a importância do sistema imune inato na leptospirose é pouco conhecida. Neste estudo foi avaliada a expressão das citocinas TNF- α e TGF- β e quimiocinas CCL2/JE (MCP-1), CCL3/MIP-1 α (MIP-1 α), CXCL2/MIP-2 (MIP-2) e CXCL1/KC (IL-8) usando as linhagens de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c como modelos experimentais. Os animais foram infectados intraperitonealmente com 10^7 bactérias da estirpe virulenta de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. As amostras foram coletadas nos dias 1, 3, 5 e 7 após a infecção. O desenvolvimento da doença foi acompanhado observando-se a morte de animais da linhagem C3H/HeJ, enquanto os animais C3H/HePas apresentaram icterícia e os animais BALB/c não desenvolveram sintomas da doença. A infecção foi confirmada por PCR pela presença de DNA de *L. interrogans* nos órgãos dos animais. Cortes histológicos dos órgãos foram analisados após coloração com Hematoxilina e Eosina. A expressão relativa do mRNA da quimiocina CXCL2/MIP-2 e das citocinas TNF- α e TGF- β foram medidas por qPCR em pulmão, rim e fígado dos camundongos. As concentrações das proteínas foram medidas por ELISA em extratos dos tecidos e no soro dos animais. Elevação nos níveis das quimiocinas MCP-1 e IL-8 ocorreu em todos os órgãos e soro dos animais C3H/HeJ e BALB/c infectados. Os níveis de MIP-1 α foram menores que de MCP-1 e IL-8, apresentando ligeira elevação no fígado e no rim. O aumento dos níveis de transcritos e proteína CXCL2/MIP-2 foi detectado desde o primeiro dia da infecção sendo que na linhagem BALB/c alta expressão de mRNA foi observada no rim, fígado e pulmão no terceiro dia. Na linhagem C3H/HeJ a expressão de CXCL2/MIP-2 foi mais tardia com altos níveis de proteína no pulmão e rim no quinto dia. O aumento de transcritos de TNF- α foi detectado no rim e fígado das três linhagens analisadas. A expressão da proteína TNF- α ocorreu mais tardiamente nos animais C3H/HeJ no pulmão e rim. Os resultados demonstraram que a infecção por *L. interrogans* estimula a expressão prematura das citocinas TNF- α e TGF- β e das quimiocinas MCP-1, MIP-1 α , MIP-2 e IL-8 na linhagem BALB/c resistente à infecção. A análise histológica indica que estes mediadores podem estar relacionados com o influxo de diferentes células do sistema imune, desempenhando importantes funções na proteção contra leptospirose.

Palavras-chave: *Leptospira*. Leptospirose. Quimiocinas. Camundongos C3H/HeJ.

ABSTRACT

Da Silva JB. The role of cytokines and chemokines in the murine immune response in infection by *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. [PhD Thesis (Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by the highly invasive spirochetes *Leptospira*. Rodents infected by *Leptospira* become carriers and shed bacteria through their urine into water or soil, promoting infection in human beings via skin contact. The bacteria disseminate through the systemic circulation to colonize target organs. The pathogenesis in humans is mainly observed in lungs, livers and kidneys. Diverse studies are being evaluating the damages in tissues of different mice strains experimentally infected with *Leptospira* but the role of innate immune response in protection against leptospirosis is yet poorly understood. In this study we analyzed the expression of the cytokine TNF- α and TGF- β and chemokine CCL2/JE (MCP-1), CCL3/MIP-1 α (MIP-1 α), CXCL2/MIP-2 (MIP-2) and CXCL1/KC (IL-8) in experimental mice models, C3H/HeJ, C3H/HePas and BALB/c strains. The animals were infected intraperitoneally with 10^7 virulent cells of *L. interrogans* serovar Copenhageni and samples were collected at days 1, 3, 5 and 7. The development of the disease was followed, being observed mortality of C3H/HeJ mice whereas C3H/HePas presented jaundice and BALB/c mice remained asymptomatic. The infection was confirmed by the presence of leptospiral DNA in the organs of the animals, demonstrated by PCR. Sections of the organs were analyzed, after H&E stain. Relative transcription of mRNA of chemokine CXCL2/MIP-2 and the cytokine TNF- α were measured in lung, kidney and liver of the mice by qPCR. The protein concentration of these cytokine was measured in extracts of tissues and in serum of the animals, by ELISA. Increasing levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 occurred in all organs and sera of animals tested C3H/HeJ and BALB/c. The levels of MIP-1 α were smaller than MCP-1 and IL-8 in all analyzed organs, with a slight increase in liver and kidney. Increasing levels of transcripts and protein CXCL2/MIP-2 were detected since the first day of infection, with highest mRNA expression observed at third day of infection in kidney, liver and lung of BALB/c mice. In C3H/HeJ the expression of CXCL2/MIP-2 was delayed, showing highest protein concentration in lung and kidney at the 5th day. Increasing in TNF- α transcripts were detected after infection, in kidney and liver of animals of the three mice strains. The expression of TNF- α protein in C3H/HeJ was also delayed, being detected in kidney and lung. Our data demonstrated that *Leptospira* infection stimulates early expression of cytokine TNF- α and TGF- β and chemokine MCP-1, MIP-1 α , MIP-2 and IL-8 in the resistant mice strain BALB/c. Histological analysis indicates that the expression of those molecules can be related to the influx of distinct immune cells, which play a role in the naturally acquired protective immunity.

Keywords: *Leptospira*. Leptospirosis. Chemokines. Mice C3H/HeJ.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	-	micrograma
BSA	-	Albumina bovina sérica
CaCl	-	Cloreto de cálcio
cDNA	-	DNA complementar
CO ₂	-	Dióxido de Carbono
Ct	-	Cycle Threshold (sinal de fluorescência pode ser detectado)
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	-	deoxinucleotídeo trifosfato
ELISA	-	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (Ensaio de adsorção imunoenzimático)
EMJH	-	Meio Ellinghausen McCullough Johnson e Harris
GAPDH	-	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase)
HE	-	Hematoxilina Eosina
i.p.	-	Intraperitoneal
Ig	-	Imunoglobulina
IL	-	Interleucina
kDa	-	Quilo Dalton
LPS	-	Lipolissacarídeos
M	-	Molar
MCP	-	Proteína quimiotática para macrófagos
MgCl	-	Cloreto de magnésio
Min	-	Minuto

MIP -	Proteína inflamatória de macrófagos
mM -	milimolar
NaCl -	Cloreto de Sódio
ng -	nanograma
OMPs -	Proteínas de membrana externa
pb -	pares de base
PBS -	Tampão fosfato (Phosphate Buffer Saline)
PCR -	Reação em cadeia pela polimerase
PMNs -	Neutrófilos polimorfonucleares
pmol -	picomol
qPCR -	PCR quantitativo
RNA -	Ácido Ribonucléico
sv -	sorovar
TGF -	Fator de transformação de crescimento
TNF -	Fator de necrose tumoral
toll -	“toll like”
Tris -	Hodroximetil amino-metano

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mutação de genes relacionados a fatores de virulência em *Leptospira* spp.....21

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores específicos para detecção de *L. interrogans* usados na reação de triplex PCR.....33

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores utilizados para detecção de expressão dos genes em estudo.....36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos casos confirmados de leptospirose nas regiões do Brasil no período de 2006 a 2010.....	18
Figura 2 - Aspectos morfológicos da célula de <i>Leptospira</i> spp.....	19
Figura 3 - Perfil eletroforético em gel de agarose 1,2%, mostrando a integridade do RNA total.....	39
Figura 4 - Avaliação da sobrevivência de camundongos das linhagens C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c.....	40
Figura 5 - Perfil eletroforético em gel de agarose do produto de amplificação por PCR de DNA de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni extraído de amostras de fígado e rim de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c.....	41
Figura 6 - Análise histopatológica de cortes de rins de camundongos.....	43
Figura 7 - Análise histopatológica de cortes de fígado de camundongos.....	45
Figura 8 - Análises histopatológica de cortes de pulmão de camundongos.....	47
Figura 9 - Níveis de proteína MIP-1 α medidos em diferentes órgãos e soro de camundongos C3H/HeJ e BALB/c infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	49
Figura 10 - Níveis de proteína MCP-1 em diferentes órgãos e soro de camundongos C3H/HeJ e BALB/c infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	51
Figura 11 - Níveis de proteína IL-8 medidos em órgãos e soro de camundongos C3H/HeJ e BALB/c infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	53
Figura 12 - Ilustração por eletroforese em gel de agarose a 2% do produto amplificado por PCR em Tempo Real – qPCR, a partir do cDNA de amostras de rim de C3H/HePas.....	54
Figura 13 - Níveis de CXCL2, proteína e mRNA medidos em rins de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	57
Figura 14 – Comparação dos níveis de CXCL2, proteína e mRNA, detectados em rim de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	58
Figura 15 - Níveis de CXCL2, proteína e mRNA medidos em fígado de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	59

Figura 16 – Comparação dos níveis de CXCL2, proteína e mRNA detectados em fígado de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	60
Figura 17 - Níveis de CXCL2, proteína e mRNA medidos em pulmão de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	61
Figura 18 – Comparação dos níveis de CXCL2, proteína e mRNA detectados em pulmão de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni	62
Figura 19 - Níveis de TNF- α proteína e mRNA medidos em rim de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	65
Figura 20 – Comparação dos níveis de TNF- α proteína e mRNA detectados em rim de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	66
Figura 21 - Níveis de TNF-alfa proteína e mRNA medidos em fígado de camundongo C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	67
Figura 22 - Comparação dos níveis de proteína e mRNA detectados em fígado de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni	68
Figura 23 – Níveis de TNF-alfa proteína e mRNA medidos em pulmão de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni	69
Figura 24 - Comparação dos níveis de proteína e mRNA detectados em pulmão de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	70
Figura 25 - Níveis de mRNA de TGF- β detectados em rim, fígado e pulmão de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Características gerais da bactéria, condições de cultivo e crescimento	18
1.2 Aspectos gerais da infecção	19
1.3 Mecanismos imunes na leptospirose	22
1.4 Citocinas e quimiocinas	23
1.5 Papel das citocinas TNF- α , TGF- β e das quimiocinas IL-8, MIP-2, MIP-1 α e MCP-1 nas interações celulares	25
2 MODELO ANIMAL NA LEPTOSPIROSE	28
3 JUSTIFICATIVA	29
4 OBJETIVOS	30
5 MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 Animais	31
5.2 Condições de cultivo e ativação da virulência da bactéria	31
5.3 Infecções experimentais	31
5.4 Extração e detecção de DNA de <i>L. interrogans</i> sorovar Colpenhageni nos órgãos de camundongos infectados	32
5.5 Análises morfológica de órgãos de camundongos infectados	33
5.6 Coleta das amostras para determinação de citocinas/quimiocinas utilizando testes Imunoenzimáticos (ELISA)	33
5.7 Coleta das amostras para extração do RNA total	34
5.8 Síntese do cDNA	34
5.9 Análise quantitativa – PCR em Tempo Real (qPCR)	34
5.10 Análise estatística	36
6 RESULTADOS	39
6.1 Avaliação da Integridade do RNA total extraído de camundongos	39
6.2 Avaliação do tempo de sobrevivência dos animais após a infecção	39
6.3 Confirmação da infecção através da detecção do DNA de <i>L. interrogans</i> nos órgãos dos camundongos infectados	40
6.4 Análise morfológica de órgãos de camundongos infectados	41
6.5 Análise da expressão de quimiocinas em camundongos infectados	48
6.5.1 Análise de MIP-1 α em camundongos	48

6.5.2 Análise de MCP-1 em camundongos	50
6.5.3 Análise de IL-8 em camundongos	52
6.5.4 Análise de MIP-2 em camundongos	54
6.5.5 Análise de TNF- α em camundongos	63
6.5.6 Análise de TGF- β mRNA em camundongos	71
7 DISCUSSÃO	73
8 CONCLUSÕES	82
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
REFERÊNCIAS	85
ANEXO A - Chemokines expression during <i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni infection in resistant BALB/c and susceptible C3H/HeJ mice.....	94
ANEXO B - Induction of TNF- α and CXCL-2 mRNAs in different organs of mice infected with pathogenic <i>Leptospira</i>	102

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose disseminada em todo o mundo. É causada por espiroquetas do gênero *Leptospira* altamente móveis. A leptospirose tem sido identificada como uma doença infecciosa re-emergente, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais. São relatados aproximadamente 500.000 casos graves a cada ano, com taxa de letalidade em torno de 10%. No entanto, o número de casos pode estar subestimado devido à dificuldade dos registros epidemiológico em algumas regiões e difícil diagnóstico (Ko et al., 2009; McBride et al., 2005; World Health Organization, 2011).

São descritos mais de 250 sorovares patogênicos e que são potencialmente capazes de infectar seres humanos. Os roedores são considerados os principais reservatórios de *Leptospira spp.*. Estes animais, uma vez infectados, eliminam a bactéria através da urina, contaminando o solo e a água. A população humana se infecta principalmente pelo contato da pele com água ou solo contaminado. Após a infecção, as bactérias se disseminam através da circulação sistêmica para colonizar órgãos-alvo entre eles o fígado, pulmões e rins.

Os sintomas clínicos podem variar de manifestações leves ou assintomáticas a formas graves, com falência múltipla dos órgãos (síndrome de Weil). O tratamento com antibiótico durante os estágios iniciais da infecção pode ser eficaz na maioria dos casos, mas infecções não tratadas precocemente podem levar a danos teciduais graves (Bharti et al., 2003; Faine et al., 1999).

No Brasil, os surtos de leptospirose têm sido detectados com maior frequência nos períodos chuvosos e em regiões de alagamento, principalmente onde as condições de saneamento são precárias (Sarkar et al., 2002). O Brasil encontra-se no décimo sétimo lugar entre os países com alta incidência de leptospirose (Pappas et al., 2008). Segundo dados registrados pelo Ministério da Saúde e Secretária de Vigilância Sanitária (2010) no Brasil foram notificados e confirmados 22.536 casos no período de 2005 a 2010 (Figura 1), com taxa anual de 3.756 casos e aproximadamente 10% de letalidade. A adoção de medidas preventivas e de controle é fundamental para uma mudança do quadro atual.

Figura 1- Distribuição dos casos confirmados de leptospirose nas regiões do Brasil no período de 2006 a 2010.

Fonte: Ministério da Saúde, (2010).

1.1 Características gerais da bactéria, condições de cultivo e crescimento

As espiroquetas constituem um grupo de bactérias que incluem patógenos clinicamente importantes, tais como os agentes causais da doença de Lyme, sífilis e leptospirose.

Os agentes etiológicos da leptospirose compreendem um grupo complexo de espécies patogênicas pertencentes a classe *Espirochetaceae*, ordem *Spirochaetales* e gênero *Leptospira*. São bactérias em forma de espiral, longas, finas e flexíveis e são altamente móveis. *Leptospira* spp. exibem movimentos característicos, auxiliados pela forma em espiral e por dois filamentos axiais ou flagelos com inserções polares, localizados no espaço periplasmático entre a membrana citoplasmática e o envoltório externo (Bharti et al., 2003; Faine et al., 1999).

Semelhante a outras espiroquetas, a parede celular de *Leptospira* spp. apresenta-se como bactérias Gram-negativas com a membrana citoplasmática nitidamente associada com o peptidoglicano da região periplasmática, a qual é recoberta por uma membrana ou envelope externo (Figura 2). Os principais componentes da membrana externa são fosfolipídios, proteínas de membrana externa (OMPs) e lipopolissacarídeos (LPS) (Cullen et al., 2004). *Leptospira* spp. apresentam LPS com baixo potencial de toxicidade, quando comparado com outras bactérias Gram-negativas (Faine et al., 1999; Ko et al., 2009; Que-Gewirth et al., 2004).

Figura 2 - Aspectos morfológicos da célula de *Leptospira* spp..

Legenda : Micrografia de *Leptospira* sp. (A).
Estrutura esquemática da parede bacteriana (B).
Fonte: adaptado de: Ko, et al. (2009).

O gênero *Leptospira* inclui espécies patogênicas e saprófitas, são microrganismos aeróbios obrigatórios, embora baixas concentrações de CO₂ são essenciais na fase inicial de crescimento. *Leptospira* spp. podem ser cultivadas em meios líquidos, semi-sólidos e sólidos, porém, o crescimento *in vitro* é fastidioso. A temperatura ideal para o cultivo situa-se na faixa de 28-30 °C. A faixa de pH ótimo para o crescimento é em torno de 7,2-7,6, e o tempo de geração de culturas adaptadas ao meio é em média de 6 a 8h. Entretanto, espécies de *Leptospira* patogênicas isoladas de mamíferos podem se duplicar em um tempo médio de 14 a 18 h (Faine et al., 1999).

1.2 Aspectos gerais da infecção

Acredita-se que a leptospirose seja a zoonose mais disseminada no mundo. As regiões de clima tropical são mais favoráveis à sobrevivência da bactéria no meio ambiente e a veiculação hídrica representa o principal mecanismo de transmissão de *Leptospira* spp. dos animais infectados para o homem, sendo frequentemente associados com surtos epidêmicos.

Os roedores são portadores naturais, com ampla dispersão geográfica e participam direta ou indiretamente na cadeia de transmissão da leptospirose para os humanos. A leptospirose frequentemente causa um amplo espectro de manifestações clínicas em humanos com infecções que variam de assintomáticas a formas graves em que na maioria dos casos levam a óbito. As alterações patológicas mais significativas são encontradas nos pulmões, fígado e rins, causando insuficiência renal, icterícia e hemorragia pulmonar com alta letalidade (Faine et al., 1999).

As infecções naturais se iniciam com a penetração das bactérias através da pele ou membranas mucosas, seguindo-se uma fase de bacteremia com rápida disseminação de *Leptospira* spp. para diversos órgãos e sistemas. Nesta fase que dura em média de quatro a sete dias, as bactérias podem ser encontradas no sangue, líquido e na maioria dos tecidos. Na segunda fase, são detectados anticorpos séricos específicos e eliminação de *Leptospira* spp. na urina (Faine et al., 1999; Levett, 2001).

Os fatores de virulência de *Leptospira* spp. são expressos por estirpes patogênicas apenas em hospedeiros suscetíveis. Devido à habilidade de invadir os tecidos do hospedeiro, *Leptospira* spp. possuem uma variedade de potenciais fatores de virulência que podem facilitar a invasão, adesão e colonização. Alguns sorovares produzem proteínas citotóxicas, causando alterações histopatológicas com elevado número de macrófagos e polimorfo nucleares nos infiltrados intersticiais (Bharti et al., 2003; Levett, 2001).

O LPS de *Leptospira* spp. é um antígeno imunodominante na infecção, entretanto, ele difere do LPS de outras bactérias Gram-negativas em diversas propriedades bioquímicas e biológicas. A baixa toxicidade do LPS de *Leptospira* spp. pode estar relacionado às diferenças estruturais na molécula de lipídio A que difere de outras bactérias (Que-Gewirth et al., 2004).

As espécies de *Leptospira* patogênicas ligam-se a vários componentes do hospedeiro, principalmente componentes da matriz extracelular tais como; laminina, colágeno, elastina e proteoglicanas. São capazes de se ligar às células endoteliais, monócitos/macrófagos e células epiteliais de rim (Barbosa et al., 2006; Breiner et al., 2009; Choy et al., 2007; Lin et al., 2009; Thomas e Higbie, 1990).

Diferentes técnicas têm sido utilizadas para identificar padrão de transcrição de genes requeridos para adaptação no hospedeiro os quais seriam fatores de virulência. Relatos demonstram a influência de gradiente de temperatura, osmolaridade e concentração de íons de ferro na regulação de diferentes genes utilizados em mecanismos de evasão da bactéria para o sistema imune do hospedeiro (Cullen et al., 2002; Haake et al., 1998; Lo et al., 2006; Lo et al., 2010; Matsunaga et al., 2007; Nally et al., 2001, Patarakul et al., 2010).

Várias proteínas têm sido associadas à patogênese de *Leptospira* spp. por exercer papel fundamental no desenvolvimento da doença e por serem conservadas entre os sorovares patogênicos e ausentes nas espécies saprofíticas. Alguns mutantes foram produzidos para alguns destes genes e a virulência testada em modelo animal, como ilustrado na tabela abaixo (Adler et al., 2011).

Tabela 1- Mutação de genes relacionados a fatores de virulência em *Leptospira* spp..

Mutated gene	Lai/Copenhageni locus tag	Serovar	Function of product ^a	Animal model	Infection route ^b	Attenuated	Reference
<i>lipL32</i>	^c LA2637/LIC11352	Manilae	Adhesion to ECM	Hamster, rat	IP, C	No	(Murray et al., 2009c)
<i>perR</i>	LA1857/LIC12034	Manilae	Oxidative stress response	Hamster	IP	No	(Lo et al., 2010; Murray et al., 2009a)
<i>ligB</i>	^c LA3778/LIC10464	Copenhageni	Adhesion to ECM	Hamster, rat	IP	No	(Croda et al., 2008)
<i>lenB</i>	^c LA3103/LIC10997	Manilae	Binds Factor H, adhesion to ECM	Hamster	IP	No	(Murray et al., 2009a)
<i>lenE</i>	^c LA4324/LIC13467	Manilae	Adhesion to ECM	Hamster	IP	No	(Murray et al., 2009a)
Unnamed	^c LA4161/LIC13320	Manilae	Metalloprotease	Hamster	IP	No	(Murray et al., 2009a)
<i>cheD</i>	LB125/LIC20101	Manilae	Chemotaxis signal transduction	Hamster	IP	No	(Murray et al., 2009a)
<i>cheX</i>	LA2469/LIC11488	Manilae	Inhibitor MCP methylation	Hamster	IP	No	(Murray et al., 2009a)
<i>clpA-1</i>	^c LA1879/LIC12017	Manilae	Endopeptidase Clp, ATP-dependent proteolytic subunit	Hamster	IP	No	This study
Unnamed	^c LA2117/LIC11801	Manilae	Anti-sigma factor antagonist	Hamster	IP	No	(Murray et al., 2010a)
<i>loa22</i>	LA0222/LIC10191	Lai	OmpA family protein	Guinea pig, hamster	IP	Yes	(Ristow et al., 2007)
<i>fliY</i>	LA2613/LIC11370	Lai	Flagella motor switch	Guinea pig	IP	Yes	(Liao et al., 2009)
<i>hemO</i>	LB186/LIC20148	Manilae	Heme oxygenase	Hamster	IP	Yes	(Murray et al., 2009b)
<i>la1641</i>	^c LA1641/LA12143	Manilae	LPS synthesis	Hamster	IP, C	Yes	(Murray et al., 2010b)
<i>Lman1408</i>	^c No orthologue	Manilae	LPS synthesis	Hamster	IP	Yes	(Murray et al., 2010b)

Nota: ^a Função descrita na referência.

^b IP = intraperitoneal, C = conjuntiva.

^c Genes ausentes em *L. biflexa*.

Fonte: adaptado de: Adler, et al. (2011).

O micro ambiente das lesões teciduais, particularmente os sítios onde são encontradas evidências de reações inflamatórias (septos alveolares, sinusóides hepáticos e espaço porta no fígado, nefrite túbulo-intersticial nos rins) sugerem a participação de citocinas e quimiocinas em etapas importantes no processo patológico e/ou recuperação das lesões, ou no agravamento da injúria, desencadeando mecanismos de autoimunidade (Nally et al., 2004; Pereira et al., 2005).

Diferentes pesquisas têm sido conduzidas visando o desenvolvimento de vacinas contra leptospirose. O sequenciamento das espécies *L. interrogans* sorovares Lai (Ren et al., 2003) e Copenhageni (Nascimento et al., 2004), a espécie *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo (Bulach et al., 2006) e a espécie saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc (Picardeau et al., 2008), representa um novo campo para desenvolvimento de novas vacinas e estratégias de diagnósticos. Vários estudos têm apontado a importância dos mecanismos imunes na resposta imune do hospedeiro na infecção, porém, até o momento muito pouco foi esclarecido.

A elucidação dos fatores imunológicos envolvidos na leptospirose poderá facilitar o desenvolvimento de vacinas eficazes contra a infecção e a utilização de estratégias rápidas e eficientes para o diagnóstico prematuro da doença.

1.3 Mecanismos imunes na Leptospirose

O sistema imune inato constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro, desempenhando um papel fundamental no reconhecimento e eliminação de patógenos. O desenvolvimento da leptospirose e progressão da doença é influenciado por fatores de susceptibilidade inerentes ao hospedeiro, características de virulência da espécie e do sorovar de *Leptospira* spp. e o número de bactérias infectantes (Faine et al., 1999; Ganoza et al., 2006). Entretanto, os fatores de imunidade inata e adquirida que influenciam no desenvolvimento da infecção e progressão da doença precisam ser amplamente investigados.

Na patologia da leptospirose humana os rins, fígado e pulmão são os principais alvos. A fase aguda da doença renal é caracterizada por nefrite túbulo intersticial podendo progredir para um quadro de fibrose em estágio crônico da doença (Yang, 2007). Células do epitélio renal expressam receptores do tipo toll, incluindo toll2 e toll4 e têm sido associados como importantes no controle da leptospirose.

A melhor compreensão dos mecanismos relacionados à patogênese da doença pode determinar a base para novas intervenções terapêuticas, além de permitir a identificação de biomarcadores relacionados à severidade da doença. Várias pesquisas estão sendo realizadas no intuito de novas descobertas de antígenos eficazes na prevenção da doença. Somando-se a estes estudos, outros trabalhos estão sendo desenvolvidos na tentativa de esclarecer o papel das quimiocinas e citocinas na leptospirose em diferentes modelos experimentais. Neste trabalho, foi analisada a presença de quimiocinas e citocinas na resposta à infecção por *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

A ativação dos mecanismos imunes do hospedeiro por *Leptospira* spp. tem sido apontado em diferentes estudos. Na leptospirose a maioria dos anticorpos produzidos pelo hospedeiro é contra a molécula de LPS. Como consequência, imunização passiva com anticorpos policlonais e monoclonais contra a molécula de LPS é capaz de conferir proteção contra a doença (Jost et al., 1986).

O LPS de *Leptospira* spp. é reconhecido pelas células humanas através dos receptores do tipo toll2 (toll like receptor-2) ao invés de toll4, que é um receptor usual de reconhecimento de LPS de bactérias Gram-negativas (Werts et al., 2001). Porém existem controvérsias na literatura com relação aos receptores envolvidos nas vias de sinalização na leptospirose. Lipoproteínas de *Leptospira* spp. induzem a ativação do sistema imune através da via dependente do receptor do tipo toll2 (Yang et al., 2006). A ativação de receptores do tipo toll2 e toll4 em células de camundongos também foi relatado por Nahori et al. (2005),

indicando que existem diferenças específicas das espécies com respeito à ativação dos receptores do tipo “toll”.

As principais classes de imunoglobulinas envolvidas na proteção do hospedeiro são IgM e IgG. *Leptospira* spp. são fagocitadas por macrófagos na presença de anticorpos específicos. Componentes bacterianos são eliminados após a morte dos microrganismos, estimulando a produção de citocinas pelo sistema imune, as quais vão mediar inflamação e danos aos tecidos (Diament et al., 2002; Klimpel et al., 2003; Vernel-Pauillac et al., 2006).

A participação de complexos imunes desencadeando inflamação tem sido postulada por alguns autores, mas não confirmada por outros (Galli et al., 1985). Abdulkader et al., (2002), demonstraram elevados níveis de anticorpos (IgG, IgM, e IgA) em pacientes com manifestações graves na leptospirose. Os mesmos autores sugeriram a participação de mecanismos imunológicos na patogênese das formas graves da doença, baseados nas observações de pacientes que apresentaram níveis elevados de anticorpos principalmente IgG.

1.4 Citocinas e quimiocinas

Citocinas são importantes moléculas sinalizadoras, secretadas por diferentes tipos de células. Estão envolvidas na inflamação, imunidade, diferenciação, divisão celular e reparo de fibrose. As citocinas apresentam ação localizada ou podem ser transportadas pela circulação e atuar em outros órgãos e tecidos em sítios distantes no organismo.

O termo quimiocinas foi proposto por Lindley et al., (1993) apud Baggiolini e Loetscher (2005). São moléculas com função de quimiotaxia e são agrupadas na grande família das citocinas, porém são diferenciadas como pequenas proteínas quimioatraentes. São produzidas por leucócitos e por vários tipos de células teciduais e são consideradas moléculas chaves na regulação e migração de leucócitos para os tecidos infectados, desempenhando funções importantes nos mecanismos fisiológicos, patológicos e nas diferentes vias dos processos inflamatórios.

Aproximadamente 40 quimiocinas já foram identificadas em humanos e diferentes estudos revelam a importância destas proteínas na coordenação e modulação da resposta imune, no desenvolvimento de linfócitos B e T e na angiogênese. O recrutamento e ativação de células inflamatórias durante processos infecciosos é complexo envolvendo a participação de citocinas e quimiocinas como ligantes aos seus receptores específicos, iniciando o processo de sinalização intracelular e transcrição de genes importantes para os processos de defesa do hospedeiro (Graham et al., 2009; Segerer et al., 2000; Tzouvelekis et al., 2005).

A presença de citocinas tem sido descrita na leptospirose, assim como na sepse bacteriana clássica. Na fase aguda da leptospirose os níveis de TNF são aumentados e o aumento está associado à gravidade da doença. Níveis elevados de TNF- α também foram observados em células mononucleares do sangue periférico estimuladas com glicoproteínas (GLP) extraídas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. A expressão de TNF- α na resposta inflamatória pode induzir a secreção de outras citocinas essenciais no controle das infecções, mas que, em excesso, podem desencadear mecanismos de lesão tecidual (Diament et al., 2002; Estavoyer et al., 1991; Petros et al., 2000).

As citocinas do tipo TNF- α são moléculas reguladoras de muitos eventos biológicos, incluindo diferenciação e proliferação celular, desenvolvimento e morte de tecidos, assim como importantes funções na inflamação e resposta imune inata do hospedeiro. A produção de TNF- α em várias infecções bacterianas tem sido documentada (Ma et al., 2010), inclusive em infecções ocasionadas por *Leptospira* spp. (Chierakul et al., 2004; Estavoyer et al., 1991; Tajiki e Salomao, 1996;). O aumento de TNF- α em pacientes acometidos por leptospirose e os altos níveis desta citocina no plasma sanguíneo contribuíram para a severidade da doença e mortalidade (Estavoyer et al., 1991; Tajiki e Salomão, 1996).

Na leptospirose, vasculite são as lesões características, nas quais resultam em comprometimento das funções celulares (Faine et al., 1999). Extravasamento de fluidos celulares e presença de poucas *Leptospira* spp. são encontrados na leptospirose, sugerindo o envolvimento de fatores imunes do hospedeiro e fatores de virulência de *Leptospira* spp. contribuindo no agravamento da infecção. (Estavoyer et al., 1991; Tajiki e Salomão, 1996).

As quimiocinas são proteínas solúveis com massa molecular de aproximadamente 7-15 kDa. Com base na presença e localização de resíduos de cisteínas na porção N-terminal da proteína, as quimiocinas são classificadas em quatro subfamílias, denominadas de CXC, CC, C e CX3C (Segeer et al., 2000). As quimiocinas mais estudadas são as pertencentes aos grupos das quimiocinas CC, que apresentam duas cisteínas adjacentes próximas à porção amino terminal, e as quimiocinas CXC, nas quais dois resíduos de cisteínas equivalentes estão separados por um aminoácido qualquer (Strieter et al., 1995). Ambos os grupos têm sido reconhecidos como importantes mediadores na inflamação e infecção.

As quimiocinas, entre elas as da família CC (CCL2/MCP-1 e CCL3/MIP-1) e CXC (CXCL1/IL-8 e CXCL2/MIP-2) têm sido reconhecidas como importantes mediadores na infecção. As quimiocinas CXC podem ser produzidas por células epiteliais dos túbulos renais em humanos e são relatadas como indutoras do deslocamento de neutrófilos

polimorfonucleares (PMNs) promovendo inflamação intersticial nas infecções renais (Graham et al., 2009; Hung et al., 2006).

O efeito de quimiocinas nos processos inflamatórios tem sido enfatizado em relação a diversas doenças infecciosas. Referente à leptospirose, existem poucos relatos da indução e expressão de algumas quimiocinas em experimento *in vitro* e *in vivo*, sugerindo importante papel destes mediadores na resposta inflamatória do hospedeiro (Chassin et al., 2009; Vernel-Pauillac et al., 2006; Viriyakosol et al., 2006; Yang, 2007).

1.5 Papel das citocinas TNF- α , TGF- β , e das quimiocinas CXCL1/KC (IL-8), CXCL2/MIP-2, CCL3/MIP-1 α e CCL2/MCP-1 nas interações celulares

A ativação das funções celulares é dependente da interação de mediadores inflamatórios com receptores presentes na superfície das células alvo. Diferentes citocinas e quimiocinas participam da ativação e migração de leucócitos do sangue periférico para os tecidos inflamados, aumentando ou reduzindo a reatividade e alterando a expressão de receptores celulares (Seeger et al., 2000).

Dentre as citocinas liberadas nos tecidos nas fases iniciais da infecção estão os membros da família das citocinas quimioatraentes, conhecidas como quimiocinas. Proteína inflamatória de macrófagos 1- α (MIP-1 α), pertence ao grupo das quimiocinas CC, é produzida principalmente por monócitos, células T, fibroblastos e mastócitos. A função principal desta proteína é atrair monócitos, macrófagos, células dendríticas e células T. O aumento na expressão de MIP-1 α foi correlacionado à mortalidade de camundongos infectados com *Klebsiella pneumoniae*, evidenciando importante papel desta quimiocina na patogênese da infecção pulmonar por patógenos bacterianos. Há evidências semelhantes em relação ao papel das mesmas quimiocinas em modelos de endotoxemia e Borreliose de Lyme. Embora os mecanismos envolvidos na patogênese da infecção por *Leptospira* spp. não sejam absolutamente semelhantes aos modelos de *K. pneumoniae*, endotoxemia ou Borreliose de Lyme, acredita-se que estas quimiocinas podem ter um papel relevante na patogênese das infecções causadas por *L. interrogans* (Grygorczuk et al., 2004; Standiford et al., 1995).

A proteína quimiotática para macrófagos (MCP-1), pertence ao grupo das quimiocinas CC, é produzida por diferentes tipos de células, cujos alvos são macrófagos, células dendríticas, células T, células NK e basófilos. As atividades *in vivo* se associam a atração de monócitos, ativação de macrófagos, e apresenta-se elevada em diversas patologias renais.

Acredita-se que as células do epitélio tubular estimuladas podem representar a principal fonte de MCP-1 na patogênese de doenças renais crônicas (Yang, 2007).

A proteína inflamatória dos macrófagos-2 (MIP-2), pertence ao grupo das quimiocinas C-X-C, apresenta propriedades quimiotáticas e ativadoras de células PMN. Em modelo murino, esta molécula atua como mediadora do afluxo destas células em resposta à administração intraperitoneal de diferentes patógenos bacterianos entre eles *Mycobacterium bovis*. Além disso, ela pode atuar modulando a adesão celular e alterações vasculares. Estudos demonstram que linfócitos T, sob estímulo antigênico produzem MIP-2 que atraem neutrófilos para o local da inflamação (Appelberg, 1992). Em estudo de peritonite séptica grave em camundongos, Walley et al. (1997) observaram aumento expressivo de MIP-2 no soro, lavado peritoneal e homogenato de pulmão em comparação com outras quimiocinas estudadas.

A interleucina 8 - IL-8 (CXCL1/KC), pertence ao grupo das quimiocinas C-X-C, é produzida por diferentes tipos de células, monócitos, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e hepatócitos. A principal função biológica é induzir a migração de células efetoras, principalmente os neutrófilos para os tecidos adjacentes. Níveis elevados de IL-8 têm sido relatados em diversos processos infecciosos, sugerindo importante papel deste mediador na resposta inflamatória, principalmente das vias respiratórias e doenças causadas por outras espiroquetas (Andrew et al., 1999; Dean et al., 1993; Grygorczuk et al., 2004; Thornton et al., 1990).

O TNF- α é produzido principalmente por fagócitos mononucleares, células NK e células T. Esta proteína estimula a adesão de leucócitos a células endoteliais. Nos processos patológicos, está associado à inflamação, choque séptico, esclerose múltipla, entre outras. Exerce ainda importante efeito antibacteriano, sendo um potente ativador de células polimorfonucleares e de macrófagos, aumentando a liberação de proteases e expressão de moléculas de adesão. A atividade antimicrobiana de macrófagos parece ser dependente da expressão de TNF (Springer, 1990). Esta citocina é produzida rapidamente após injúria patogênica, dando início a uma cascata de citocinas que podem ter efeito benéfico e/ou negativo para o hospedeiro. Na fase aguda da leptospirose, os níveis de TNF- α se encontram elevados e se correlacionam à gravidade da doença (Diamant et al., 2002; Tajiki e Salomão, 1996).

Fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) é produzido por vários tipos de células, plaquetas e macrófagos ativados, é secretada como proenzima que se ativa após

proteólise. TGF- β_1 , β_2 e β_3 quando ativados são quimiotáticos para fibroblastos e induzem a produção de colágeno e fibronectina pelos fibroblastos. Tian et al. (2006), demonstraram a ação de TGF- β em experimento *in vitro* com OMP de *Leptospira* spp, verificando acúmulo de componentes da matriz extracelular. Este fato sugere um papel importante desta citocina nas diferentes vias da resposta imunológica e regeneração dos tecidos afetados na leptospirose.

2 MODELO ANIMAL NA LEPTOSPIROSE

Pereira et al. (1998), demonstraram pela primeira vez a susceptibilidade de camundongos C3H/HeJ à infecção letal por *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Posteriormente, outros autores confirmaram os estudos prévios, reafirmando que a mesma linhagem representa um modelo experimental de leptospirose aguda letal, sendo propícia para o desenvolvimento de estudos imunológicos (Koizumi e Watanabe, 2003; Viriyakosol et al., 2006). Até então, os principais modelos experimentais eram “hamsters e cobaias”. Todavia, a alta susceptibilidade dos mesmos a isolados clínicos altamente virulentos dificulta a análise aprofundada dos aspectos imunológicos.

Os camundongos C3H/HeJ são hiporesponsivos ao LPS de bactérias. Uma mutação no gene que codifica o receptor Toll4 em camundongos C3H/HeJ leva a um defeito na produção de citocinas induzidas por LPS em macrófagos peritoneais. Todavia, as quimiocinas podem ser diferencialmente produzidas por macrófagos de diferentes origens no camundongo. Wang, et al. (2000), demonstraram a expressão diferencial e regulação dos genes que codificam a expressão de MIP-1 α e MIP-2 em macrófagos alveolares e peritoneais de camundongos C3H/HeJ. Aparentemente a mutação no gene não impede a produção de quimiocinas por macrófagos desta linhagem. Acredita-se que possa haver expressão diferencial de citocinas em resposta a estímulos com LPS, de modo que, a relativa susceptibilidade da linhagem C3H/HeJ à infecção letal pode estar associada à baixa resposta ao LPS.

É importante mencionar ainda que entre várias linhagens de camundongos previamente testadas, esta é a única cujas alterações histopatológicas mimetizam a leptospirose humana. Todavia, há necessidade de maiores investigações para esclarecer a participação de quimiocinas e citocinas induzidas pela infecção experimental em linhagens susceptíveis e resistentes a leptospirose.

3 JUSTIFICATIVA

Os mecanismos envolvidos na imunidade e patogênese da leptospirose não estão bem elucidados. A hipótese de que as quimiocinas e citocinas podem exercer papel relevante nos mecanismos de resistência à infecção e/ou nas lesões induzidas por *Leptospira* spp. deve ser avaliada *in vivo*, considerando que estas moléculas atuam em múltiplos estágios nas interações celulares e nos processos inflamatório agudo e crônico. Admite-se que o tipo e número de células inflamatórias recrutadas dependem do tipo e quantidade de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e receptores celulares expressos. Os conhecimentos enfatizando o tipo, níveis de expressão e os efeitos de quimiocinas e citocinas na resposta imunológica e inflamatória, são extremamente relevantes para a compreensão dos processos patológicos ocasionados por *Leptospira* spp.. As informações obtidas com os modelos experimentais propostos podem ser de fundamental importância para a compreensão da patogênese na leptospirose e para subsidiar investigações posteriores na busca de novas alternativas para o tratamento da doença e desenvolvimento de vacinas eficazes.

4 OBJETIVOS

Analisar o padrão de expressão das quimiocinas MIP-1 α , MCP-1, KC, MIP-2 e citocinas TNF- α , TGF- β , correlacionando com as lesões nos principais órgãos afetados, rim, fígado e pulmão, durante a infecção de camundongos isogênicos das linhagens C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c com *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos das linhagens C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c com 3-4 semanas de idade, em geral seis grupos de cinco animais para cada linhagem. As linhagens C3H/HeJ, C3H/HePas foram procedentes do departamento de patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. A linhagem BALB/c foi proveniente do Centro de Criação de Animais do Instituto Butantan. Os procedimentos de manuseio, manutenção e experimentação com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto Butantan. (Protocolo nº: 560/08).

5.2 Condições de cultivo e ativação da virulência da bactéria

Foram utilizadas estirpes de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, a virulência da bactéria foi estabelecida e mantida através de inoculações em hamsters com três a quatro semanas de idade. Seguindo-se um período de 6 a 10 dias após a infecção o fígado e o rim foram macerados e as bactérias reisoladas por cultivo em meio líquido Ellinghausen McCullough Johnson e Harris (EMJH) (Ellinghausen e McCullough, 1965), adicionado de suplemento a base de BSA (Difco). Essas bactérias foram utilizadas para os experimentos subsequentes, com no máximo três passagens *in vitro*, por cultivo em meio líquido EMJH, sob condições de aerobiose a temperatura de 29 a 30 °C. As culturas reisoladas foram observadas durante um período de 15 a 25 dias, e após o crescimento da bactéria, foi efetuada uma passagem em meio líquido EMJH. Após seis dias de cultivo as bactérias foram contadas em câmara de Petroff-Hausser e as concentrações de bactérias nas suspensões foram ajustadas e inoculadas por via intraperitonal (i.p) em hamsters e em camundongos nos demais experimentos.

5.3 Infecções experimentais

Grupos de trinta camundongos por linhagem; C3H/HeJ, BALB/c e C3H/HePas, foram usados, sendo vinte e cinco infectados intraperitonealmente com 10^7 bactérias e cinco animais não infectados de cada linhagem mantidos como controle. Em paralelo, quatro hamsters com

3-4 semanas de idade foram infectados com a mesma dose para confirmar a virulência das bactérias. Amostras de sangue, fígado, rins, pulmões e baço de cinco camundongos foram coletadas nos dias 0 (animais controle), 1, 3, 5 e 7 após a inoculação. Nos experimentos para determinação do tempo de morte os animais foram infectados (i.p.) com 10^8 bactérias e o desenvolvimento da doença e mortalidade foi observado diariamente, durante 15 dias.

5.4 Extração e detecção de DNA de *L. interrogans* sorovar Copenhageni nos órgãos de camundongos infectados

As amostras de fígado e rim de camundongos infectados foram coletadas, imediatamente submersas em nitrogênio líquido e mantidas a temperatura de -80°C . Posteriormente, foi efetuada a extração do DNA total utilizando o kit de extração de DNA – (DNeasy tissue - QIAGEN), de acordo com os procedimentos do fabricante. Após a extração o DNA genômico foi visualizado em gel de agarose e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop-1000 (ThermoScientific). Alíquotas de 600 ng do DNA purificado foram usadas na reação de PCR. Como controle positivo foi utilizado alíquotas de 4 ng de DNA de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Os oligonucleotídeos específicos para *Leptospira* spp. (Tabela 2), foram desenhados previamente (da Silva et al., 2011; Gravekamp et al., 1993; Kawabata et al., 2001). Os três pares de iniciadores foram usados na mesma reação de triplex PCR na concentração de 20 pmoles para cada iniciador, 10 mM dNTP mix, 1,25 μL de MgCl_2 25 mM, 1 unidade de Go Taq DNA polimerase (Promega) e 1 x do tampão Go Taq DNA polimerase®, para um volume final de 25 μL por reação. As condições de amplificação consistiram de 30 ciclos de desnaturação a $95^{\circ}\text{C}/30\text{s}$, anelamento a $50^{\circ}\text{C}/30\text{s}$ e extensão a $72^{\circ}\text{C} / 1 \text{ min}$. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,5%.

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores específicos para detecção de *L. interrogans* usados na reação de triplex PCR.

Iniciador	Orientação	Sequência	Fragmento (nº pb)	Referência
FlaB	→	TCTCACCGTTCTCTAAAGTTCAAC	793	Gravekamp, <i>et al.</i> , (2003)
	←	CTGAATTCGGTTTCATATTGCC		
34_516	→	GGAAAGATAAGTTTAAGATT	516	da Silva, <i>et al.</i> , (2011)
	←	CATAAAAATCATAGAACCAATC		
G1/G2	→	CTGAATCGCTGTATAAAAGT	285	Kawabata, <i>et al.</i> , (2001)
	←	GGAAAACAAATGGTCGGAAG		

Nota: pb = pares de base.

5.5 Análises morfológica de órgãos de camundongos infectados

A análise morfológica foi realizada em rins, fígado e pulmão de três animais de cada linhagem, coletados no 7^o dia após a infecção e animais controles (não infectados). Os órgãos foram fixados em solução tamponada de Paraformaldeído 4%, processados segundo procedimentos de rotina e incluídos em parafina. As amostras foram cortadas em micrômetro com espessura de 5 µm, posteriormente os cortes foram aderidos a lâminas de vidro com 0,1% de poly-L-lysina (Sigma, St. Lois, MO) e em seguida foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). Os cortes histológicos foram analisados e as imagens foram capturadas com microscópio Nikon Eclipse E600 acoplado com câmera digital Nikon DP-72 (Nikon, Japan).

5.6 Coletas das amostras para determinação de citocinas/quimiocinas utilizando testes imunoenzimáticos (ELISA)

Os órgãos foram coletados e imediatamente macerados segundo metodologia previamente descrita (Greenberger et al., 1995), usando 1,5 mL de tampão de lise (150 mM de NaCl, 15mM de Tris, 1mM CaCl₂ e 1mM de MgCl₂), 0,5% de Triton X-100, com pH final de 7,4. As amostras de macerados foram mantidas no gelo, centrifugadas e o sobrenadante coletado e mantido a -80 °C. Para a separação do plasma sanguíneo, o sangue total foi coletado por punção cardíaca, e o coágulo separado por centrifugação. A determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas MIP-1α, MCP-1, KC, TNF-α, TGF-β e MIP-2 foram analisadas por ELISA em duplicatas utilizando kits comerciais R&D Systems (R&D Systems,

Inc. McKinley Place NE, Minneapolis, USA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

5.7 Coletas das amostras para extração do RNA total

Amostras de rim, fígado e pulmão de animais infectados e não infectados foram coletadas e imediatamente colocadas em nitrogênio líquido. Posteriormente as amostras foram armazenadas a -80°C . O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen). Após a extração o RNA foi diluído em água e mantido a -80°C . A concentração e a pureza do RNA foram medidas em espectrofotômetro Nanodrop-1000 (ThermoScientific). A integridade do RNA foi constatada por eletroforese em gel de agarose 1,2% em 10 mL de tampão MOPS (10x) (Figura 2). Após aquecimento e resfriamento da agarose a aproximadamente 50°C , foram adicionados 5 mL de formaldeído 37%.

5.8 Síntese do cDNA

Alíquotas de 2 μg de RNA de cada amostra foram submetidas ao tratamento com DNase. As amostras foram tratadas com 5U da enzima DNase I (fermentas), tampão MgCl e incubadas a 37°C , durante 40 minutos, segundo as recomendações do protocolo do fabricante. As amostras tratadas com DNase foram transcritas para cDNA usando o kit SuperScript III (Invitrogen). A reação foi padronizada segundo as orientações descritas no manual, exceto para o volume de enzima SuperScript III RT, sendo que para cada reação foram utilizados 100U e RNase H 1U. Após a síntese, o cDNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 1000 e mantido a -80°C .

5.9 Análise quantitativa - PCR em Tempo Real (qPCR)

A análise da transcrição dos genes selecionados foi realizada por PCR em tempo real (qPCR-PCR quantitativo). Os iniciadores selecionados para este estudo (Tabela 3) foram desenhados utilizando software Primer expresso (Applied Biosystems, Inglaterra) com base nas seqüências obtidas a partir da base de dados “GenBank”, números de acesso: NM_009140 (CXCL2-MIP-2), NM_013693 (TNF- α), NM_011577 (TGF- β) e NM_008084 (GAPDH). Os iniciadores foram analisados quanto ao conteúdo de GC, TM (Temperatura de Melting), complementaridade entre os iniciadores (dímeros) e formação de estruturas tipo “Hairpin”,

utilizando os programas Gene Runner versão 3.05 e IDT SciTools OligoAnalyzer 3.1. A análise quantitativa da expressão dos genes selecionados foi efetuada por PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR), usando equipamento da Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System. As reações de qPCR foram realizadas em triplicatas e cada reação consistiu de 6,5 µL do reagente Syber Green Master Mix (Applied Biosystems), 0,5 µL de cada primer (a 10 µmol) e 100 ng de cDNA para um volume final de 12 µL por reação.

Como controle negativo, para cada gene testado, foram efetuadas reações sem adição de cDNA. Amostras de RNA tratadas com DNase também foram submetidas à análise por qPCR para demonstrar a ausência de possível contaminação com DNA genômico. As condições de reação foram às seguintes: aquecimento inicial 50 °C/2 min seguido de um ciclo de 95 °C/10 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C/15s e 60 °C/1 min. Os dados para a análise da temperatura de dissociação foram coletados em um ciclo de 95 °C/15 segundos, seguido por 60 °C/1 min e 95 °C/15 segundos. O controle da reação de qPCR foi visualizado em gel de agarose 2%, conforme ilustrado na figura 3. A expressão relativa de cada gene selecionado foi analisada usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, descrito por Livak et al. (2001).

Os dados para determinação do Ct (cycle Threshold) foram coletados na fase exponencial de fluorescência da reação. O Ct corresponde ao ciclo onde o sinal de fluorescência pode ser detectado acima do sinal de ruído do aparelho. Os valores do Ct específico para cada gene foram normalizados com os valores do Ct do gene GAPDH analisado com a mesma amostra de cDNA e na mesma corrida. Todas as reações foram analisadas em triplicatas e os resultados representam a média de dois experimentos consecutivos. A eficiência de reação (E) foi calculada para cada par de oligonucleotídeos utilizando o programa LingRegPCR, considerando um intervalo ótimo de eficiência entre 1,8 a 2,2.

Tabela 3 – Sequência dos iniciadores utilizados para detecção de expressão dos genes em estudo.

Gene	nº de acesso-GenBank	Orientação	Sequência
CXCL2	NM_009140	Forward	CGCTGTCAATGCCTGAAGAC
		Reverse	ACACTCAAGCTCTGGATGTTCTTG
TNF- α	NM_013693	Forward	CACAAGATGCTGGGACAGTGA
		Reverse	TCCTTGATGGTGGTGCATGA
TGF- β	NM_011577	Forward	CCAGCCGCGGGACTCT
		Reverse	TTCCGTTTCACCAGCTCCAT
GAPDH	NM_008084	Forward	CGGCCGCATCTTCTTGTG
		Reverse	CCGACCTTCACCATTTTGTCTAC

Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2012).

5.10 Análise estatística

A análise de significância estatística foi realizada utilizando os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os dados foram considerados estatisticamente significantes com valores de $p \leq 0.1$.

O Delineamento experimental está descrito nos protocolos 1 e 2

Protocolo 1- Delineamento experimental 1

Protocolo 2 – Delineamento experimental 2

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação da integridade do RNA total extraído de camundongos

Foi observada a integridade do RNA total (Figura 3), após a extração utilizando o reagente trizol. Ilustrando as bandas correspondentes a subunidade ribossomal 28S, 18S e 5,8S,

Figura 3 – Perfil eletroforético em gel de agarose 1,2%, mostrando a integridade do RNA total.

Nota: Perfil representativo da extração com o reagente trizol a partir de amostras de rim, fígado e pulmão de camundongos das linhagens C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c.

6.2 Avaliação do tempo de sobrevivência dos animais após a infecção

Neste estudo foram utilizadas três linhagens de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c. Como ilustrado na Figura 4, durante o período de coleta dos dados observamos a mortalidade e relatamos a morte dos camundongos da linhagem C3H/HeJ a partir do 4^o dia após a infecção. Em geral os animais da linhagem C3H/HePas não apresentaram sinais aparentes da doença (como pêlo eriçado, perda de peso e diminuição na ingestão de alimentos), porém um animal morreu, enquanto todos os animais da linhagem BALB/c sobreviveram até o final dos experimentos.

Figura 4 - Avaliação da sobrevivência de camundongos das linhagens C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c.

Nota: Os dados representam a soma dos resultados obtidos em três experimentos independentes. Os animais foram infectados com 1×10^8 células de *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

6.3 Confirmação da infecção através da detecção do DNA de *L. interrogans* nos órgãos dos camundongos infectados

Nos experimentos de coleta das amostras (protocolo 2), os camundongos foram infectados com 10^7 bactérias e a presença de DNA foi avaliado nos diferentes órgãos dos animais. Na linhagem BALB/c não foram observados sinais da doença nos animais infectados, demonstrando maior resistência á infecção, quando comparado com as linhagens C3H/HeJ e C3H/HePas. A linhagem C3H/HeJ que é deficiente para o receptor toll4, apresentou sinais da doença como pelo eriçado, perda de peso, icterícia e morte após o 5^o dia da infecção. Não foi observada a morte de animais da linhagem C3H/HePas inoculados com 10^7 bactérias, porém os animais apresentaram icterícia após o quinto dia da infecção.

A presença de DNA de *L.interrogans* foi detectada no fígado e rins dos animais infectados. Como demonstrado no produto de amplificação por PCR (Figura 5), a linhagem C3H/HeJ apresentou maior quantidade de DNA de *Leptospira* spp. no fígado e rins no 7^o dia após a infecção, quando comparado com a linhagem BALB/c.

Figura 5 – Perfil eletroforético em gel de agarose do produto de amplificação por PCR de DNA de *L. interrogans* sorovar Copenhageni extraído de amostras de fígado e rim de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c.

Legenda: M = marcador molecular; C=controle positivo usando DNA (4 ng) da cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni; Foram usados 600 ng de DNA de amostras de tecido ou 1200 ng de DNA de fígado e rim de BALB/c do dia 7. Linhas 0 = DNA de animal não infectado; 3 e 7= amostras de animais infectados coletadas nos dias 3 e 7 respectivamente. A amplificação foi efetuada com a mistura do DNA extraído separadamente de órgãos de 3 animais de cada linhagem.

Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2012).

6.4 Análise morfológica de órgãos de camundongos infectados

Os cortes de rim, fígado e pulmão de camundongos das linhagens C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c foram analisados para observar possíveis alterações morfológicas causadas pela infecção por *L. interrogans* (Figura 6).

A análise histológica dos rins de camundongos BALB/c mostrou dilatação dos espaços intersticiais com presença de poucos leucócitos. Foi observada necrose de células epiteliais nos túbulos proximais e distais (Figura 6B). As células necróticas observadas foram menos numerosas do que o observado nas linhagens C3H/HeJ e C3H/HePas. Não foram observadas alterações morfológicas significativas na região glomerular nas linhagens BALB/c e C3H/HePas (Figura 6).

Nas amostras de rim da linhagem C3H/HePas a principal observação foi a dilatação dos túbulos proximal, resultando na desorganização estrutural do órgão. Também foi observado tumefação de células epiteliais, bem como, necrose e células apoptóticas nos túbulos renais. Além disso, foi observado aumento de leucócitos ao redor dos túbulos (Figura 6D).

Na linhagem C3H/HeJ as características morfológicas proeminentes observadas no rim foram mudanças degenerativas do citoplasma com tumefação celular. Nesta linhagem foram observados maiores danos, caracterizados por aumento de necrose tubular, perda do núcleo e fragmentação das células, além de perda da coesão celular em algumas áreas, quando comparado as linhagens BALB/c, C3H/HePas. Os cortes de rim da linhagem C3H/HeJ apresentaram poucos leucócitos dentro e ao redor dos túbulos. Entretanto, severas alterações foram observadas nos glomérulos, identificado como um grupo de células degeneradas (Figura 6F).

Figura 6 – Análise histopatológica de cortes de rins de camundongos.

Legenda: Representativo de 3 animais de cada linhagem. BALB/c (A-B), C3H/HePas (C-D), e C3H/HeJ (E-F).

Observa-se estruturas normais dos rins, túbulos (+) e glomérulos (►) de BALB/c (A), C3H/HePas (C) e C3H/HeJ (E) não infectados. (B) Cortes de rim de BALB/c infectado, mostrando dilatação dos espaços intersticiais (→), infiltração de leucócitos ao redor dos túbulos (*). (D) Cortes de rim de C3H/HePas infectado, mostrando desorganização dos túbulos (#), intensa infiltração de leucócitos ao redor dos túbulos (*). (F) Cortes de rim de C3H/HeJ infectado, mostrando necrose de células do epitélio tubular (N). Presença de poucos leucócitos dentro e ao redor dos túbulos (*). Degeneração glomerular (►) presente no corte histológico. Escala: 50 µm.

Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2012).

Nas amostras de fígado dos animais BALB/c não foram observadas alterações na organização dos hepatócitos. Foi observado dilatação dos vasos sinusoidais e hipertrofia de células de Kupffer. A presença de células inflamatórias, principalmente neutrófilos foi observada nos vasos sinusoidais (Figura 7^a-C).

Na linhagem C3H/HePas, similar a linhagem BALB/c não foram observadas alterações evidentes na estrutura dos hepatócitos. Entretanto na linhagem C3H/HePas observou-se o aumento de leucócitos e dilatação dos sinusoides hepáticos quando comparado com as outras linhagens. Além disso, foi observado hipertrofia das células de Kupffer (Figura 7D-F).

Nas amostras de fígado da linhagem C3H/HeJ foi observado menor dilatação dos sinusoides hepáticos quando comparado a linhagem C3H/HePas e BALB/c. Em algumas áreas próximo a veia central algumas áreas aparecem distorcidas e/ou interrompidas na linhagem C3H/HeJ. Nesta linhagem observaram-se poucos leucócitos e menor número de células de Kupffer hipertróficas quando comparado com as linhagens C3H/HePas e BALB/c (Figura 7G-I).

Figura 7 – Análise histopatológica de cortes de fígado de camundongos.

Legenda: Representativo de 3 animais de cada linhagem. BALB/c (**A,B,C**), C3H/HePas (**D,E,F**), e C3H/HeJ (**G,H,I**). Observam-se estruturas normais de animais não infectados BALB/c (**A**), C3H/HePas (**D**) e C3H/HeJ (**G**) mostrando estrutura da Veia Central (CV) e placas de hepatócitos preservados. (**B-C**) – Cortes de fígado de BALB/c infectado, mostrando placas de hepatócitos bem preservadas (►), infiltrado inflamatório nos sinusóides capilares (*). (**E-F**) – Cortes de fígado de C3H/HePas infectado mostrando infiltrado inflamatório (*) e dilatação dos sinusóides (→). (**H-I**) – Cortes de fígado de C3H/HeJ infectado mostrando dilatação dos sinusóides hepáticos quase livres de leucócitos (→). Escala: (**C,F,I**) 20 µm, (**A,B,D,E,G,H**) 50 µm.

Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2012).

Nas amostras de pulmão da linhagem BALB/c as principais mudanças observadas foram espessamento dos septos alveolares e aumento de células inflamatórias e edema. Além disso, foram observados alguns leucócitos e hemácias presentes nos sacos alveolares (Figura 8B).

Na linhagem C3H/HePas não foram observadas alterações no parênquima nas amostras de pulmão dos animais infectados, entretanto os septos alveolares apresentaram-se moderadamente espessos (Figura 8D).

Nos animais infectados da linhagem C3H/HeJ foi observada hemorragia intensa presente nos sacos alveolares. A estrutura do septo intra-alveolar foi descaracterizada e fragmentada. Não foi observada infiltração proeminente de leucócitos nos animais infectados quando comparado com as linhagens BALB/c e C3H/HePas (Figura 8F).

Figura 8 – Análise histopatológica de cortes de pulmão de camundongos.

Legenda: Representativo de 3 animais de cada linhagem. (A,C,E) – Estrutura normal de cortes de pulmão de animais não infectados, mostrando septo intra-alveolar (IS) e sacos alveolares (AS). (B) – Cortes de pulmão de BALB/c infectado, mostrando tumefação dos septos alveolares (#). (D) – Cortes de pulmão de C3H/HePas infectado, mostrando tumefação dos septos alveolares (#) e células inflamatórias (*). (F) Cortes de pulmão de C3H/HeJ infectado, mostrando hemorragia severa nos alvéolos pulmonares (►). Observa-se aumento de células inflamatórias (*). Escala: 20 μ m.

Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2012).

6.5 Análise da expressão de quimiocinas em camundongos infectados

6.5.1 Análise de MIP-1 α em camundongos

A infecção com 10^7 células de *L interrogans* sorovar Copenhageni induziu aumento da expressão de CCL3/MIP-1 α nos rins e fígado de animais das linhagens C3H/HeJ e BALB/c (Figura 9). O aumento de MIP-1 foi observado nos rins (Figura 9A), com declínio após o 5^o dia da infecção na linhagem C3H/HeJ. Foi observada elevação nos níveis de CCL3/MIP-1 α no fígado desde o primeiro dia pós infecção e estes níveis foram mantidos até o 7^o dia na linhagem C3H/HeJ e 15^o na linhagem BALB/c (Figura 9B). Por outro lado, não foi observado aumento significativo no pulmão dos animais da linhagem C3H/HeJ (Figura 9C), enquanto na linhagem BALB/c foi detectado um pico de CCL3/MIP-1 α no 3^o dia pós infecção nas amostras de pulmão. Elevados níveis de expressão de CCL3/MIP-1 α também foram observados em BALB/c, no baço entre o 3^o e 5^o dia, e no soro no dia 1, fato não observado na linhagem C3H/HeJ (Figura 9D e 9E).

Figura 9 - Níveis de proteína MIP-1 α medidos em diferentes órgãos e soro de camundongos C3H/HeJ e BALB/c infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

Legenda: A) Rim; B) Fígado, C) Pulmão, D) Baço, E) Soro. Os dados são a média $\pm$ desvio padrão de medidas em duplicata de amostras de 5 animais. * indica diferença significativa ($p \leq 0.05$).

Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2009).

6.5.2 Análise de MCP-1 em camundongos

O perfil de expressão de MCP-1 foi similar, elevando-se em todos os tecidos e soro dos animais C3H/HeJ e BALB/c (Figura 10). A expressão de MCP-1 nos rins, pulmão e soro (Figura 10A, C, E) de C3H/HeJ foi observada a partir do 1^o dia após a infecção, com manutenção dos níveis até o 7^o dia, quando foi observado morte destes animais, sugerindo que o aumento e manutenção dos níveis de MCP-1 podem estar correlacionados com a severidade e progressão da doença na linhagem C3H/HeJ. Na linhagem BALB/c os níveis de MCP-1 aumentaram com pico no 3^o e 5^o dia retornando aos níveis basais nos dias subsequentes. Nas amostras de fígado e baço da linhagem C3H/HeJ os valores absolutos foram menores do que os detectados em BALB/c (Figura 10B e D).

Figura 10 - Níveis de proteína MCP-1 em diferentes órgãos e soro de camundongos C3H/HeJ e BALB/c infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

Legenda: A) Rim; B) Fígado, C) Pulmão, D) Baço, E) Soro. Os dados são a média $\pm$ desvio padrão de medidas em duplicatas de amostras de 5 animais. * indica diferença significativa ($p \leq 0.05$).

Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2009).

6.5.3 Análise de IL-8 em camundongos

Com relação a IL-8, foi detectado aumento de expressão nos rins de C3H/HeJ (Figura 11A), porém em níveis mais baixos que o observado em BALB/c, onde houve elevação da concentração da citocina a partir do 1^o dia da infecção, atingindo valores absolutos 20 vezes maiores dos medidos em C3H/HeJ. No fígado a expressão de IL-8 foi elevada na linhagem C3H/HeJ permanecendo constante até o 7^o dia após a infecção (Figura 11B), semelhante ao observado em BALB/c, porém nestes os valores absolutos apresentaram-se mais elevados. Distinto padrão de variação de IL-8 foi observado no pulmão dos animais infectados (Figura 11C), sendo que níveis de IL-8 aumentaram em ambas as linhagens após infecção, mas retornaram a níveis basais na linhagem BALB/c, enquanto na linhagem C3H/HeJ permaneceram elevados. Um padrão similar de expressão foi observado no baço e soro de animais de ambas as linhagens (Figura 11 D e E).

Figura 11 - Níveis de proteína IL-8 medidos em órgãos e soro de camundongos C3H/HeJ e BALB/c infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

Legenda: A) Rim; B) Fígado, C) Pulmão, D) Baço e E) Soro. Os dados são a média $\pm$ desvio padrão de medidas em duplicatas de amostras de 5 animais. * indica diferença significativa ($p \leq 0.05$).

Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2009).

6.5.4 Análise de MIP-2 em camundongos

A importância de CXCL2/MIP-2 na leptospirose foi observada nas três linhagens de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectadas com 10^7 células de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. A expressão das proteínas foi medida por ELISA e a expressão relativa do mRNA foi medida por qPCR. Os genes foram amplificados na região esperada, conforme demonstrado em gel de agarose (Figura 12) após a amplificação por qPCR.

Figura 12 – Ilustração por eletroforese em gel de agarose a 2% do produto amplificado por PCR em Tempo Real – qPCR, a partir do cDNA de amostras de rim de C3H/HePas.

Legenda: M=marcador de peso molecular. Os números das linhas indicam o dia após a infecção com *L. interrogans* sorovar Copenhageni (1, 3, 5 e 7) em que os animais sofreram eutanásia e as amostras foram coletadas. 0=amostra de animal não infectado. A amplificação representa a mistura da triplicata de 1 animal.

A infecção pela bactéria claramente induziu aumento da proteína CXCL2/MIP-2 nos rins dos animais das três linhagens analisadas (Figura 13A). Baixos níveis desta quimiocina foram observados nos demais órgãos de camundongos C3H/HeJ. Nesta linhagem os maiores níveis foram detectados no 5^o dia, no rim (Figura 13 A) e no pulmão (Figura 17 A). Interessante destacar que em animais C3H/HeJ não foi detectado aumento de CXCL2/MIP-2 no fígado após a infecção (Figura 15 A). No pulmão das linhagens BALB/c e C3H/HePas o perfil de mRNA foi similar (Figura 17 B), entretanto na linhagem C3H/HePas os valores absolutos foram ligeiramente mais elevados (Figura 18 B e C).

Em camundongos da linhagem C3H/HePas o conteúdo de proteína CXCL2/MIP-2 mostrou-se elevado principalmente nos rins no 3^o dia após a infecção

(Figura 13 A), retornando aos níveis basais no 7^o dia. No fígado e pulmão foi detectado um pico de proteína CXCL2/MIP-2 no 3^o e 5^o dias após a infecção com *L. interrogans* sorovar Copenhageni, com significância estatística $p=0.064$ (Figura 15 A, 17A).

Neste estudo foi observado aumento significativo de proteína CXCL2/MIP-2 no rim e fígado de animais da linhagem BALB/c, com pico detectado no primeiro dia após a infecção (Figura 13 A e 15 A). No pulmão o pico de expressão da proteína foi detectado no 3^o dia após a infecção (Figura 17 A).

A proteína CXCL2/MIP-2 não foi detectada nas amostras de sangue em nenhuma das linhagens de camundongos avaliada.

Com relação à indução de transcrição de CXCL2/MIP-2, observamos aumento dos níveis de mRNA em todos os tecidos analisados a partir de 1 dia após a infecção nas 3 linhagens de camundongos, C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c (Figura 13 B, 15 B e 17 B). Os níveis dos transcritos de CXCL2/MIP-2 foram similares e elevados nos rins de camundongos das linhagens C3H/HeJ e C3H/HePas, aumentando cerca de 80 vezes no 7^o dia após a infecção (Figura 13 B). Nos rins de C3H/HeJ e C3H/HePas o perfil dos transcritos de CXCL2/MIP-2 foi diferente do perfil da proteína detectados no mesmo órgão (Figura 14 A e B). Na linhagem C3H/HePas observamos aumento dos níveis de mRNA até o 7^o dia após a infecção, enquanto os níveis de proteína diminuíram a partir do 3^o dia.

O aumento do conteúdo de transcrito de CXCL2/MIP-2 no fígado dos camundongos com o mesmo fundo genético foi similar, exceto que na linhagem C3H/HeJ observou-se um significativo pico no 3^o dia pós infecção, com aumento de cerca de 10 vezes em relação aos demais tempos analisados (Figura 15 B). De maneira diferente, a análise de transcritos no pulmão da linhagem C3H/HePas apresentou níveis de transcritos de CXCL2/MIP-2 no 3^o dia após a infecção (Figura 17 B), com valores absolutos maiores do que em BALB/c.

Aumento de mRNA de CXCL2/MIP-2 nos rins de BALB/c até o 3^o dia após a infecção foi observado. Diferentes das outras duas linhagens, em BALB/c os níveis de mRNA detectados diminuíram substancialmente (Figura 13 B). Nos rins da linhagem BALB/c os perfis de expressão da proteína e mRNA de CXCL2/MIP-2 foram similares (Figura 14 C), permitindo sugerir que os níveis desta quimiocinas foram estabilizados, retornando aos níveis basais após o controle da infecção. No fígado dos animais da linhagem BALB/c foram detectados níveis aumentados no primeiro dia após a infecção (Figura 15 B), com pico no 3^o dia com expressão relativa de mRNA de 20 vezes. Nesta

linhagem os perfis de proteína e mRNA de CXCL2/MIP-2 foram similares (Figura 16 C).

A elevação nos níveis de mRNA de CXCL2/MIP-2 foi prematuro no pulmão de BALB/c e C3H/HePas, quando comparado com a linhagem C3H/HeJ (Figura 17 B), atingindo aumento significativo no 3^o dia após a infecção. No BALB/c os níveis de mRNA retornaram aos níveis detectados no início da infecção, enquanto os níveis de proteínas permaneceram ligeiramente elevados (Figura 18 C).

Figura 13 - Níveis de CXCL2, proteína e mRNA medidos em rins de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

Figura 14 – Comparação dos níveis de CXCL2, proteína e mRNA, detectados em rim de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

Legenda: Os níveis de mRNA foram quantificados por qPCR e proteínas por ELISA. A) C3H/HeJ; B) C3H/HePas; C) BALB/c. Dados de mRNA representam a média $\pm$ desvio padrão de medidas em triplicatas em amostras de 6 animais de cada linhagem em 2 experimentos independentes. * indica $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.1$.

Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2012).

Figura 15 - Níveis de CXCL2, proteína e mRNA medidos em fígado de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

Legenda: A) Níveis de proteína; B) Expressão relativa dos níveis de mRNA. Os dados de proteína são a média $\pm$ desvio padrão de dosagens em duplicatas de amostras de 5 animais. Dados de mRNA representam a média $\pm$ desvio padrão de medidas em triplicatas em amostras de 6 animais de cada linhagem de 2 experimentos independentes. * indica $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.1$.

Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2012).

Figura 16 – Comparação dos níveis de CXCL2, proteína e mRNA detectados em fígado de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

Legenda: Os níveis de mRNA foram quantificados por qPCR e proteínas por ELISA. A) C3H/HeJ; B) C3H/HePas; C) BALB/c. Dados de mRNA representam a média $\pm$ desvio padrão de medidas em triplicatas em amostras de 6 animais de cada linhagem de 2 experimentos independentes. * indica $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.1$.

Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2012).

Figura 17 - Níveis de CXCL2, proteína e mRNA medidos em pulmão de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

A) Proteína em pulmão

B) mRNA em pulmão

Legenda: A) Níveis de proteína; B) Expressão relativa dos níveis de mRNA. Dados de proteína são a média $\pm$ desvio padrão de dosagens em duplicatas de amostra de 5 animais. Dados de mRNA representam a média $\pm$ desvio padrão de medidas em triplicatas em amostras de 6 animais de cada linhagem de 2 experimentos independentes. * indica $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.1$.

Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2012).

Figura 18 – Comparação dos níveis de CXCL2, proteína e mRNA detectados em pulmão de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

Legenda: Os níveis de mRNA foram quantificados por qPCR e proteínas por ELISA. A) C3H/HeJ; B) C3H/HePas; C) BALB/c. Dados de mRNA representam a média $\pm$ desvio padrão de dosagens medidas em triplicatas em amostras de 6 animais de cada linhagem de 2 experimentos independentes.* indica $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.1$.
Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2012).

6.5.5 Análise de TNF- α em camundongos

Nas três linhagens de camundongos estudadas foi constatada a indução de altos níveis de TNF- α nos rins, quando comparado com amostras de fígado e pulmão (Figura 19^a, 21A e 23A). Nos rins da linhagem C3H/HePas foi detectado um pico da proteína TNF- α no 3^o dia pós infecção, enquanto na linhagem C3H/HeJ o pico de expressão ocorreu no 5^o dia, retornando aos níveis basais nos dias subsequentes (Figura 19 A). Na linhagem BALB/c foi observado um perfil similar de expressão de proteína TNF- α no rim e no fígado, com valores ligeiramente mais elevados no rim (Figura 19 A e 21 A).

Foi observado significativo aumento de proteína TNF- α no pulmão da linhagem C3H/HeJ com um pico detectado no 5^o dia após a infecção (Figura 23 A). Na linhagem C3H/HePas também foi observado aumento do conteúdo de proteína TNF- α no pulmão, porém com grande variação entre as amostras analisadas (aumento não significativo no teste de Mann-Whitney (Figura 23 A). No pulmão da linhagem BALB/c não foi detectado aumento significativo no conteúdo de proteína TNF- α (Figura 23A).

Não foi detectado aumento dos níveis de TNF- α no sangue comparando com aqueles detectados nas amostras controle das três linhagens de camundongos analisados.

Após a infecção com *L. interrogans* sorovar Copenhageni, ocorreu elevação da transcrição de TNF- α no rim, fígado e pulmão dos animais das linhagens C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c (Figura 19B, 21B e 23B). Nas amostras de rins, um pico de mRNA de TNF- α foi detectado no 3^o dia após a infecção. Os níveis de TNF- α -mRNA foram mantidos até o 7^o dia nos animais das linhagens C3H/HeJ e C3H/HePas, enquanto em BALB/c observou-se clara diminuição (Figura 19B). Nos rins das linhagens com o mesmo fundo genético, C3H/HeJ e C3H/HePas, foram observados perfis similares de mRNA e proteína TNF- α (Figura 20A e B).

Foi observado um menor conteúdo de mRNA de TNF- α nas amostras de rim de animais BALB/c no 5^o e 7^o após a infecção, quando comparado com as amostras das linhagens C3H/HeJ e C3H/HePas (Figura 19B). Este fato poderia indicar que a infecção na linhagem BALB/c havia sido controlada e os mecanismos imunes estabilizados.

Nas amostras de rim de animais da linhagem BALB/c, um pico de TNF- α -mRNA foi detectado no 3^o dia após a infecção, atingindo cerca de 50 vezes em relação ao controle não infectado, declinando nos dias subsequentes. Entretanto os níveis de proteínas permaneceram estáveis (Figura 20C), exceto um pequeno declínio no 5^o dia.

Foi observado um pequeno aumento nos níveis de mRNA de TNF- α no 3^o dia após a infecção, nas amostras de fígado de animais C3H/HeJ e C3H/HePas (Figura 21 B). Nessas linhagens os perfis de mRNA e proteína mostraram-se similares (Figura 22 A e B).

No fígado de animais BALB/c foi observado perfil de TNF- α mRNA similar ao observado nos animais da linhagem C3H/HePas (Figura 21 B), entretanto, na linhagem BALB/c os valores absolutos foram mais elevados, em torno de 20 vezes, no 3^o dia após a infecção, declinando nos dias subsequentes. Na linhagem BALB/c os perfis de mRNA e proteína foram similares, entretanto ocorreu declínio proeminente no conteúdo de mRNA após o terceiro dia de infecção (Figura 22 C).

Nas amostras de pulmão de animais das três linhagens analisadas foram observados perfis similares, com pequeno aumento nos níveis de mRNA e proteína TNF- α após a inoculação com *L. interrogans* sorovar Copenhageni, embora esta elevação não tenha sido estatisticamente significativa (Figura 23B e 24 A, B, C), exceto pelo pico de proteína observado no 3^o dia no C3H/HeJ.

Figura 19 - Níveis de TNF- α proteína e mRNA medidos em rim de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

Legenda: A) Níveis de proteína; B) Expressão relativa dos níveis de mRNA. Dados de proteína são a média $\pm$ desvio padrão de duplicatas de 5 animais. Dados de mRNA representam a média $\pm$ desvio padrão de medidas em triplicatas em amostras de 6 animais de cada linhagem de 2 experimentos independentes. * indica $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$.

Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2012).

Figura 20 – Comparação dos níveis de TNF- α proteína e mRNA detectados em rim de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

Legenda: Os níveis de mRNA foram quantificados por qPCR e proteínas por ELISA. A) C3H/HeJ; B) C3H/HePas; C) BALB/c. Dados de mRNA representam a média $\pm$ desvio padrão de medidas em triplicatas em amostras de 6 animais de cada linhagem de 2 experimentos independentes. * indica $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.1$.

Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2012).

Figura 21 - Níveis de TNF-alfa proteína e mRNA medidos em fígado de camundongo C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

Legenda: A) Níveis de proteína; B) Expressão relativa dos níveis de mRNA. Dados de proteína são a média $\pm$ desvio padrão de duplicatas de 5 animais. Dados de mRNA representam a média $\pm$ desvio padrão de medidas em triplicatas em amostras de 6 animais de cada linhagem de 2 experimentos independentes. * indica $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$.

Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2012).

Figura 22 – Comparação dos níveis de TNF- α proteína e mRNA detectados em fígado de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

Legenda: Os níveis de mRNA foram quantificados por qPCR e proteínas por ELISA. A) C3H/HeJ; B) C3H/HePas; C) BALB/c. Dados de mRNA representam a média $\pm$ desvio padrão de medidas em triplicatas em amostras de 6 animais de cada linhagem de 2 experimentos independentes. * indica $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.1$.

Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2012).

Figura 23 - Níveis de TNF-alfa proteína e mRNA medidos em pulmão de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

Legenda: A) Níveis de proteína; B) Expressão relativa dos níveis de mRNA. Dados de proteína são a média $\pm$ desvio padrão de duplicatas de 5 animais. Dados de mRNA representam a média $\pm$ desvio padrão de medidas em triplicatas em amostras de 6 animais de cada linhagem de 2 experimentos independentes.* indica $p \leq 0.05$.
Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2012).

Figura 24 – Comparação dos níveis de TNF- α proteína e mRNA detectados em pulmão de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

Legenda: Os níveis de mRNA foram quantificados por qPCR e proteínas por ELISA. A) C3H/HeJ; B) C3H/HePas; C) BALB/c. Dados de mRNA representam a média $\pm$ desvio padrão de medidas em triplicatas em amostras de 6 animais de cada linhagem de 2 experimentos independentes.* indica $p \leq 0.05$.

Fonte: Adaptado de: Da Silva, et al. (2012).

6.5.6 Análise de TGF- β mRNA em camundongos

Na infecção dos camundongos das linhagens C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c com 10^7 células de *L. interrogans* sorovar Copenhageni foi observado aumento no conteúdo de mRNA de TGF- β em todos os órgãos analisados das três linhagens (Figura 25 A, B, C). O perfil de expressão nas amostras de rim dos animais C3H/HeJ e C3H/HeJ foi significativamente mais elevado no 5^o e 7^o dias pós infecção, enquanto na linhagem BALB/c o maior nível de expressão foi detectado no 3^o dia, com declínio nos dias subsequentes (Figura 25 A).

Nas amostras de fígado foram observados perfis similares de mRNA de TGF- β nas três linhagens de camundongos (Figura 25 B), exceto no 3^o dia em BALB/c, quando foram detectados valores ligeiramente superiores, porém sem significância estatística.

Nas amostras de pulmão, os níveis de mRNA de TGF- β foram ligeiramente mais elevados em C3H/HeJ no 3^o dia após a infecção, em relação aos animais C3H/HePas e BALB/c (Figura 25 C).

Figura 25 - Níveis de mRNA de TGF- β detectados em rim, fígado e pulmão de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

Legenda: Os níveis de mRNA foram quantificados por qPCR. A) Níveis de mRNA detectados no Rim; B) Níveis de mRNA detectados no fígado; C) Níveis de mRNA detectados no pulmão. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de medidas em triplicatas em amostras de 6 animais de cada linhagem em 2 experimentos independentes. * indica $p \leq 0.05$.

7 DISCUSSÃO

A imunidade na leptospirose está sendo estudada por diferentes grupos de pesquisa, em busca do melhor entendimento das interações patógeno hospedeiro e do desenvolvimento de novas formas de diagnósticos, prevenção e tratamentos. No presente estudo, camundongos resistentes e susceptíveis a infecção foram inoculados com *L. interrogans* e os níveis das citocinas TNF- α , TGF- β e quimiocinas MIP-1 α , MCP-1, IL-8 e MIP-2 foram avaliados, bem como uma possível correlação desses níveis com a severidade da doença e com os efeitos patológicos em diferentes órgãos.

A infecção foi confirmada pela presença de DNA de *Leptospira* spp. nos rins e fígado dos animais inoculados. A amplificação do DNA de *Leptospira* spp. foi maior usando amostras de rim quando comparado às amostras de fígado, correlacionando com a capacidade de colonização de *Leptospira* spp. neste órgão. Além disso, foi observada maior amplificação nos órgãos da linhagem C3H quando comparado com a linhagem BALB/c, correlacionando com a maior capacidade de controle da infecção nos animais desta linhagem. Resultados similares foram registrados recentemente por Matsui et al., (2011), que demonstraram aumento progressivo da carga bacteriana em modelo animal susceptível a leptospirose, enquanto uma rápida diminuição era observada em modelo animal resistente a infecção.

No presente estudo apesar dos animais da linhagem BALB/c não apresentarem sintomas da leptospirose, permaneceram portadores até o final do experimento. Contrariamente, camundongos C3H/HeJ apresentaram sinais da doença na fase inicial, ocorrendo a morte de alguns animais a partir do 5^o dia após a infecção, confirmando a susceptibilidade à leptospirose.

Como esperado, os animais C3H/HeJ, os quais possuem toll4 não funcional não apresentaram resistência à infecção por *L. interrogans*, enquanto BALB/c, toll4 funcional, foram resistentes, corroborando resultados prévios da literatura (Koizume e Watanabe, 2003; Nally et al., 2005, Pereira et al., 1998;). Estudos anteriores sugerem que animais com receptores toll-like 4 funcional apresentam maior capacidade de controle de infecção com doses subletais de *Leptospira* spp., mimetizando o estado de infecções naturais (Viriyakosol et al., 2006).

Os camundongos da linhagem C3H/HeJ apresentam uma mutação espontânea na porção citoplasmática do receptor toll-4, que resulta na substituição de prolina por

histidina. Devido a esta mutação, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas são hiporresponsivas ao LPS típico das bactérias gram-negativas (Akira e Hemmi, 2003).

Os aspectos gerais das alterações histopatológicas observadas no rim dos animais C3H/HeJ, susceptíveis a leptospirose, foram extensa necrose de células do epitélio tubular em contraste com a linhagem parental C3H/HePas e BALB/c. As diferenças morfológicas observadas quando comparando as três linhagens analisadas podem estar relacionadas às diferenças na progressão da doença. Está hipótese foi evidente quando C3H/HeJ foi comparado com a linhagem parental C3H/HePas ou BALB/c e o controle não infectado. De fato, alguns animais da linhagem C3H/HeJ quando infectados com *L. interrogans*, morrem na fase aguda da doença, possivelmente devido a falha renal aguda como consequência da extensiva necrose tubular resultante da deficiência imune.

Os resultados observados no modelo murino C3H/HeJ que recapitula a leptospirose humana, sugere um papel crítico da resposta imune inata, o que envolve a participação de quimiocinas e componentes relacionados.

Foram detectadas poucas células inflamatórias nas amostras de rim dos animais BALB/c analisados no sétimo dia após a infecção com *L. interrogans*. Estes resultados podem ser correlacionados com a observação do aumento dos níveis de CXCL2/MIP-2 e TNF- α mRNA e proteína a partir do primeiro e terceiro dia após a infecção. Estas observações podem indicar que o aumento e manutenção dos níveis destas e outras quimiocinas favoreceu o controle da infecção diminuindo a carga bacteriana na linhagem BALB/c resistente a infecção.

Nas amostras de fígado dos animais BALB/c e C3H/HePas as maiores alterações foram desprendimento das células e hipertrofia das células de Kupffer. Apesar das similaridades histopatológicas entre as duas linhagens foi observado um aumento de células inflamatórias nos capilares sinusoidais nas amostras de fígado de animais C3H/HePas. Somando-se a este fato foi observado um aumento de proteína CXCL2/MIP-2 e TNF- α , e também a expressão prematura de CCL2/MCP-1 e CXCL1/KC nas amostras de fígado de animais da linhagem BALB/c. A migração prematura de células inflamatórias e produção destes mediadores em BALB/c e C3H/HePas podem ter contribuído no controle da infecção.

Por outro lado, foram observadas injúrias hepáticas intensas nas amostras de fígado de animais da linhagem C3H/HeJ. Holub et al. (2009) demonstram que a maioria das bactérias quando se disseminam através do sistema circulatório, são controladas no

fígado, o que torna este órgão responsável pelo desenvolvimento de disfunção múltipla dos órgãos.

Nas linhagens BALB/c e C3H/HePas as alterações mais proeminentes no pulmão foi tumefação dos septos alveolares. Nos animais C3H/HeJ observou-se profusa hemorragia no parênquima pulmonar. Estas intensas alterações podem ter ocasionado falha respiratória levando os animais desta espécie à morte prematura, quando comparado com BALB/c e C3H/HePas. Parte dos casos fatais na leptospirose é atribuída a hemorragia nos órgãos em especial no pulmão, o que tem sido relevante causa de morte no Brasil (Spichler et al., 2008), porém a etiologia da hemorragia ainda não foi elucidada. Os mecanismos propostos para explicar a patologia pulmonar são a ação direta de toxinas e processos autoimunes do hospedeiro. Como o que ocorre com frequência em uveítes observada em equinos devido ao processo inflamatório ocasionados por reações de autoimunidade (Priya et al., 2008).

O número de bactérias relativamente baixo recuperado no pulmão sugere uma possível ação de toxinas produzidas em sítios distantes como no fígado ou ainda a atividade de outras moléculas como proteases e hemolisinas expressas pela bactéria que foram descritas no genoma de *Leptospira* spp. patogênicas e que podem estar envolvidas nos danos aos tecidos (Bulach et al., 2006; Nascimento et al., 2004; Ren et al., 2003).

Após detectar os diferentes perfis de citocinas em nossos experimentos e as diferenças na progressão da leptospirose nos três modelos animais estudados, procuramos discutir aqui possíveis correlações considerando os conhecimentos da literatura a respeito das atividades associadas a essas citocinas

A concentração de quimiocinas nos órgãos e soro de BALB/c, C3H/HeJ e C3H/HePas foi determinada durante a infecção com *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Cada linhagem apresentou um distinto padrão de expressão como resposta imune à infecção dependente das características genotípicas da espécie animal.

O aumento de MIP-1 α detectado neste estudo reflete a importância desta quimiocina nas infecções por *Leptospira* spp. As quimiocinas MIP-1 α e MCP-2 pertencentes à família das quimiocinas CC também foram relatadas em diferentes processos de inflamação pulmonar corroborando os nossos resultados (Tzouveleakis et al., 2005; Standiford et al., 1993). Outros estudos também relataram o aumento da expressão de MIP-1 α em outras doenças bacterianas, como meningites causadas por *L.*

monocytogenes e formas clínicas severas de Lyme Borreliose (Grygorczuch et al., 2004; Seebach et al., 1995). Apesar das infecções causadas por *Listeria* spp. e *Borrelia* spp. diferirem das infecções causadas por *Leptospira* spp. é possível que a indução controlada de MCP-1 α principalmente na linhagem BALB/c tenha favorecido o controle da infecção.

Os altos níveis de MCP-1 detectados em todos os órgãos de C3H/HeJ e BALB/c, foram ainda mais proeminentes em C3H/HeJ, mantidos até o 7^o dia da infecção. Este aumento e manutenção dos altos níveis de MCP-1 principalmente no pulmão, rim e soro, pode estar associado à exacerbação da infecção que ocasionou a morte dos animais C3H/HeJ, indicando o potencial desta quimiocina na indução da resposta inflamatória nestes órgãos e tecidos.

As diferenças nos níveis de expressão de MCP-1 foram dependentes do tempo de infecção. Este fato, aliado a incapacidade de regulação da expressão desta quimiocina na linhagem susceptível, sugere que MCP-1 participa diretamente na patologia e disfunção dos órgãos nos animais C3H/HeJ. Nesta linhagem susceptível, a baixa produção de MCP-1 em alguns órgãos como o fígado, está possivelmente relacionada com a não funcionalidade do receptor toll4, que impede o reconhecimento do LPS, bloqueando assim, a ativação da via de sinalização do sistema imune. Consequentemente ocorre baixa produção de citocinas e quimiocinas e consequente baixa migração de células importantes que atuam no controle da disseminação do patógeno. Por outro lado, na linhagem resistente BALB/c toll4 positiva, o reconhecimento prematuro das diferentes moléculas expressas na superfície de *Leptospira* spp. entre elas o LPS, contribuem na ativação precoce das vias de sinalização, desencadeando a resposta imune inata. Foi possível sugerir que MCP-1 exerce dupla função nas linhagens estudadas: na linhagem resistente a quimiocina contribui para o controle prematuro da infecção, enquanto na linhagem susceptível, a contínua produção de MCP-1 na fase mais aguda da infecção, em especial no rim e no pulmão, possivelmente contribui para as lesões teciduais.

De fato, à presença do receptor toll4 contribui para o bloqueio da disseminação de *Leptospira* spp. patogênica em infecção experimental (Viriyakosol et al., 2006). Yang et al., (2002) também demonstraram a participação de proteínas de membrana externa de *Leptospira* spp. patogênica na indução de MCP-1 por células de túbulos renais, correlacionando a participação desta quimiocina em injúrias renais na leptospirose.

Moléculas geradas pelos microrganismos são os alvos de reconhecimento pelo sistema imune inato para diferenciar o que é próprio do não próprio nas infecções bacterianas. Estas moléculas são estruturas conservadas na maioria dos patógenos que também são essenciais para a sobrevivência dos mesmos nas infecções. O reconhecimento destas moléculas pelos receptores do sistema imune inato desencadeia o processo de ativação intracelular com fosforilação e desfosforilação das moléculas envolvidas nas diferentes vias de transdução dos sinais, levando à ativação dos fatores de transcrição nucleares e consequente transcrição do mRNA para a produção de vários fatores solúveis tais como as citocinas e óxido nítrico (Ransohoff, 2009; Uematsu e Akira, 2006). Por outro lado, a expressão desordenada destes mediadores induz um descontrole dos mecanismos anti-inflamatórios ocasionando danos aos tecidos. Conforme descrito por Sierra et al., (2010), embora a resposta inflamatória mediada por citocinas/quimiocinas seja uma das estratégias utilizadas pelo hospedeiro para controlar as infecções, quando produzidas em excesso ou descontroladamente podem causar danos aos tecidos afetados.

A importância da expressão controlada de MCP-1 em infecções por *Cryptococcus*, ativando o deslocamento de células $CD4^+$, monócitos/macrófagos, para o pulmão também foi relatada em prévios estudos. Por outro lado, a excessiva e continua produção de MCP-1, por estas e outras células, como células endoteliais e epiteliais, contribuem no agravamento de doenças pulmonares (Huffnagle et al., 1995; Tzouvelekis et al., 2005).

Com relação a IL-8, no presente estudo foi observado diferente padrão de expressão, dependente da linhagem de camundongo e órgão analisado. IL-8 é uma potente quimiocina que atua na migração de neutrófilos e está envolvida em uma gama de processos patológicos e fisiológicos do hospedeiro em infecções bacterianas (Zeilhofer e Schorr, 2000).

Como foi observado aumento e manutenção de IL-8 no pulmão da linhagem C3H/HeJ, este fato possivelmente promove a migração desordenada de leucócitos para o tecido infectado, contribuindo para as lesões observadas na leptospirose.

Apesar dos níveis de IL-8 detectados no rim da linhagem C3H/HeJ terem sido menores em valores absolutos, do que na linhagem BALB/c, a permanência dos níveis elevados até o 7^o dia sugere a participação desta quimiocina na manifestação dos efeitos graves da leptospirose nesta linhagem. Nefrite túbulo-intersticial é a principal manifestação renal na leptospirose e que pode estar relacionado com a indução

descontrolada de IL-8. Esta molécula pertencente ao grupo das quimiocinas CXC e é descrita como potencial indutor da migração de leucócitos para os tecidos infectados, como descritos em doenças renais (Tang et al., 1997).

Na leptospirose o papel de IL-8 ainda não foi esclarecido. Estudos recentes demonstraram a indução de IL-8 em experimento *in vitro* utilizando lipoproteínas de *L. interrogans* como indutores (Hsu et al., 2010). Este mecanismo específico possivelmente se repete nas infecções naturais por *Leptospira* spp. patogênicas.

Elevados níveis de IL-8 em lavado bronco alveolar em camundongos infectados com *S. aureus* também foi relatado por Bartlett et al. (2008), demonstrando que proteína A e peptidoglicano de *Staphylococcus* spp. induziu a expressão de IL-8 *in vivo* e *in vitro* (Bartlett et al., 2008). Apesar dos distintos fatores de virulência entre *Leptospira* spp. e *Staphylococcus* spp., é possível que fatores de virulência semelhantes possam atuar em *Leptospira* spp. gerando um gradiente quimiotático de quimiocinas CXC.

A rápida e eficiente produção de citocinas ocorre através de um controle preciso da transcrição dos genes e estabilidade do mRNA. O corrente método amplamente utilizado para analisar a produção de citocinas é a quantificação do mRNA correspondente por técnica de PCR em tempo real, principalmente, para avaliar o perfil de citocinas quando estas são pouco expressas ou presentes em pequenas amostras. Além disso, esta técnica permite a quantificação de expressão de citocinas quando a quantificação do nível de proteína não é possível e quando a utilização das técnicas mais comuns, como ELISA, não reflete um completo perfil de expressão (Listvanova et al., 2003).

Também foi avaliado a expressão de proteína e mRNA correspondentes a MIP-2 e TNF-alfa em órgãos de camundongos das linhagens C3H/HeJ, C3H/HePas e BALB/c infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Os animais da linhagem BALB/c apresentam altos níveis de expressão de proteína e de mRNA no rim e no fígado, logo nos primeiros dias pós inoculação, com declínio após o 3^o dia da infecção. Este evento sugere que na linhagem resistente a infecção foi rapidamente controlada, possivelmente mediada pelo aumento da produção desta e de outras quimiocinas, diminuindo a carga bacteriana. Considerando a progressão da doença na linhagem C3H/HeJ, é possível que os baixos níveis observados no rim e no fígado contribuam para o agravamento da doença, resultando na morte prematura destes animais em comparação às outras 2 linhagens estudadas.

Balamayooran et al. (2010a), Netea, et al. (2000) e Viriyakosol et al. (2006),

mostraram a participação de MIP-2 no acúmulo de neutrófilos durante infecção bacteriana e que a presença do receptor toll4 foi importante para a regulação dos níveis desta quimiocina nas linhagens de animais estudadas.

Chassin et al., (2009) aventam que a participação de células B é crucial na eliminação de *Leptospira* spp. É interessante destacar que estes linfócitos produzem citocinas/quimiocinas durante infecção ou inflamação, além de albergarem receptores do tipo toll2 e toll4 na sua superfície (Liang et al., 2011). No entanto, há evidências de que a não funcionalidade do receptor toll4 na linhagem C3H/HeJ impede a realização de uma resposta eficiente de defesa contra a invasão de *Leptospira* spp.. Beisiegel et al., (2009), também mostraram que animais deficientes na produção de óxido nítrico, quando infectados pela estirpe virulenta de *M. tuberculosis* apresentavam intenso infiltrado inflamatório pulmonar, composto predominantemente de células PMN, acompanhado de altos níveis das quimiocinas MIP-2, KC, IL-1, específicas para o recrutamento destas células. Deste modo, o excesso da ativação e recrutamento exacerbado de células inflamatórias para os pulmões resultava em lesão tecidual e consequente controle ineficiente contra a replicação do microrganismo naqueles animais deficientes na produção de óxido nítrico.

O processo inflamatório em si pode resultar em proteção ao hospedeiro, pois pode contribuir com o controle da carga do patógeno, tanto através dos mecanismos de imunidade inata como adaptativa. A inflamação, entretanto, deve ser controlada por mecanismos anti-inflamatórios, mediados por fatores solúveis ou celulares, para que não resulte em atividade lesiva aos tecidos (Loures et al., 2010).

Várias quimiocinas são imobilizadas por proteoglicanas de heparan sulfato (HSPGs) na superfície de células endoteliais. HSPGs são expressas na superfície da maioria das células, porém, são secretadas e depositadas na Matriz Extracelular (Massena et al., 2010). Foi possível inferir que as necroses observadas nos tecidos renais em infecções por *Leptospira* spp. possam resultar em rompimento e liberação dos componentes da matriz extracelular e consequente liberação de quimiocinas e outras moléculas proinflamatórias, contribuindo nos danos teciduais e desenvolvimento da patologia.

TNF- α é uma citocina amplamente estudada, produzida por diferentes tipos de células, entre elas, monócitos/macrófagos e células renais. É considerada uma citocina pró-inflamatória ou de fase aguda e desempenha funções importantes na vasodilatação, aumentando a permeabilidade vascular, apresentando ainda função reguladora da

expressão de moléculas de adesão celular (Balamayooran et al., 2010b).

O aumento de TNF- α detectado em camundongos infectados com *Leptospira* spp. corrobora os dados de outros pesquisadores que observaram o aumento dos níveis de mRNA de TNF- α em cultura celular quando estimulada com *Leptospira* spp. patogênica (Yang et al., 2000). Níveis elevados de TNF- α também foram relatados em casos de leptospirose humana e foram associados com o agravamento da doença (Tajiki e Salomão, 1996). Somando-se a isto, Li et al., (2010) demonstraram que *Leptospira* spp. virulenta induz apoptose e morte celular, dependendo do tipo de célula do hospedeiro.

Embora elevados níveis de TNF- α tenham sido observados no início da infecção, estes se apresentaram reduzidos ou indetectáveis com a progressão da doença. Um dos possíveis mecanismos de regulação da expressão de TNF- α foi proposto por Lahat et al., (2008). Estes autores descreveram que longo período de exposição a determinados agentes, tal como LPS, aumenta a degradação dos precursores da proteína nos lisossomos das células, enquanto os níveis de mRNA se mantêm estáveis, sugerindo um mecanismo de regulação negativa do TNF- α .

Outras linhas de pesquisas indicam que as regiões não transcritas (3' UTR) do mRNA são crucias para estabilidade e/ou degradação do mRNA. Algumas proteínas apresentam afinidade de ligação ao mRNA, ligando-se a regiões não transcritas (3' UTR) do mRNA, induzindo rápida degradação (Behm-Ansmant et al., 2007a, b; Werno et al., 2010). Este mecanismo de regulação do TNF- α foi também associado a vários mediadores inflamatórios, inclusive MIP-2. É possível que estes mecanismos estejam presentes nas linhagens de camundongos estudadas, com notável diferença no conteúdo de mRNA e proteína em alguns órgãos analisados.

A expressão de TGF- β pós-infecção por *Leptospira* spp. foi também investigada neste trabalho. Os níveis detectados foram mais elevados no rim nas 3 linhagens estudadas. Na linhagem BALB/c o aumento dos níveis de mRNA detectados no 3^o dia, foram semelhante ao perfil observado na linhagem C3H/HePas entretanto na linhagem BALB/c os níveis diminuíram nos dias subsequente, fato não observado nas outras linhagens. Esta citocina possui um largo espectro de atividades, entre as quais se incluem a capacidade de estimular ou inibir o crescimento celular e a síntese de proteínas da matriz extracelular. Com isso podemos sugerir que no rim da linhagem resistente (BALB/c), o aumento de mRNA de TGF- β na fase inicial, como também

observado para outras citocinas estudadas, reflete diretamente o controle da infecção, enquanto que na linhagem susceptível C3H/HeJ a detecção do pico tardiamente, no 5^o dia, e a tendência de manutenção dos níveis de TGF- β no rim estaria contribuindo para o quadro patológico.

Tian et al. (2010), mostraram que TGF- β desempenha papel fundamental, sendo um mediador crítico no desenvolvimento de doenças renais em vários modelos. A produção persistente desta citocina pode levar ao acúmulo de componentes da matriz extracelular contribuindo na progressão de fibrose nos tecidos danificados. O aumento de componentes de matriz extracelular, como colágeno tipo I e IV, foi correlacionado com os elevados níveis de TGF- β em cultura de célula, induzidos por proteínas de membrana externa (OMPs) de *Leptospira* spp. patogênica. OMPs de *Leptospira* spp. são fundamentais para invasão e aderência da bactéria ao hospedeiro. Estas lipoproteínas são abundantes na membrana externa de espiroquetas e têm sido implicadas na patogênese de nefrite túbulo-intersticial.

A expressão de TGF- β observadas no 3^o dia nas três linhagens analisadas são concordante com os resultados observados por Lowanitchapat et al., (2010) em modelos susceptível à leptospirose que observaram manutenção dos níveis de TGF- β nesses animais, fato também observado em nosso trabalho nas linhagens susceptível C3H/HeJ e parental C3H/HePas. Como mencionado, TGF- β tem capacidade de estimular ou inibir o crescimento celular e a síntese de proteínas da matriz extracelular, podendo atuar tanto como uma citocina anti-inflamatória, controlando a indução de mediadores pró-inflamatório, ou ativando a expressão de outras moléculas, causando lesões teciduais.

8 - CONCLUSÕES

Em BALB/c o aumento prematuro de MIP-1 α observado em todos os órgãos, principalmente no pulmão, baço e soro, possivelmente contribui para a resistência desta linhagem a leptospirose. Por outro lado, na linhagem C3H/HeJ os baixos níveis de MIP-1 α no pulmão, baço e soro possivelmente contribuem no agravamento da doença nesta linhagem.

Na linhagem BALB/c o aumento de MCP-1 em todos os órgãos, principalmente no fígado, baço e soro, desde o início da infecção, sugere a participação desta quimiocina no controle prematuro da doença e ativação dos mecanismos da imunidade inata. Os menores níveis de MCP-1 em fígado e baço da linhagem C3H/HeJ e elevados níveis no rim, pulmão e soro até o final da infecção podem estar relacionados com o agravamento da doença e susceptibilidade da linhagem C3H/HeJ.

Os valores mais elevados de IL-8, principalmente no fígado, rim e pulmão na linhagem BALB/c, podem contribuir para a resistência destes animais à infecção. Por outro lado, na linhagem C3H/HeJ os baixos níveis de IL-8 no rim, fígado e pulmão no início da infecção sugerem a relação desta quimiocina na susceptibilidade destes animais.

A expressão prematura em níveis intermediários de CXCL2/MIP-2 observados em todos os órgãos da linhagem BALB/c, especialmente no rim e fígado, possivelmente contribuem para a resistência desta linhagem. Em oposição, na linhagem C3H/HeJ mais baixos níveis de CXCL2/MIP-2 foram detectados tardiamente, no 5^o dia da infecção, no rim e no pulmão, e ainda mais, baixa expressão no fígado, podem estar contribuindo para o agravamento da doença. Na linhagem C3H/HePas níveis elevados de CXCL2/MIP-2 foram detectados, porém com produção tardia no fígado e rim, sugerindo a participação desta quimiocina nos efeitos patológicos observados nos órgãos de animais desta linhagem.

O aumento prematuro de TNF- α no fígado na linhagem BALB/c sugere a importância deste mediador na imunidade inata, contribuindo para o controle da infecção. Por outro lado, baixos níveis de TNF- α no fígado de C3H/HeJ e a expressão tardia evidencia sua importância na susceptibilidade da linhagem C3H/HeJ. Estes resultados sugerem que é importante a elevação dos níveis de TNF- α para controle da

infecção.

Na linhagem BALB/c, o aumento de TGF- β no rim e no fígado no início da infecção com diminuição nos dias subsequentes, sugere ser um fator importante no controle da doença e da resposta inflamatória. No rim de C3H/HeJ e C3H/HePas foi observado o aumento da citocina, porém a manutenção dos níveis de TGF- β pode estar contribuindo para as lesões observadas neste órgão.

A expressão das citocinas/quimiocinas analisadas foi dependente da fase da infecção do órgão e da linhagem de camundongo infectada. Em geral BALB/c apresenta elevação dos níveis de citocinas no estágio inicial da infecção, enquanto as linhagens C3H/HeJ e C3H/HePas apresentam produção tardia e níveis diferencialmente elevados nos órgãos, possivelmente afetando o controle da infecção. O mecanismo de controle na linhagem BALB/c, estaria relacionado com a ativação prematura de diferentes vias da resposta imune inata, com participação dos mediadores estudados, contribuindo para diminuição da carga bacteriana.

Apesar do aumento de algumas citocinas/quimiocinas em determinados órgãos da linhagem C3H/HeJ, estes eventos não foram suficientes para controlar a doença.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho trouxe novas informações sobre a síntese de mediadores inflamatórios em modelo experimental *in vivo* em infecção por *Leptospira* spp. Patogênicas. Mostramos que a expressão das citocinas/quimiocinas analisadas foi dependente da fase da infecção, do órgão e da linhagem de camundongo infectada.

Como visão geral, foi possível inferir que a expressão prematura dos mediadores analisados favorece o controle da infecção na linhagem resistente BALB/c. Por outro lado, apesar do aumento de algumas citocinas/quimiocinas em determinados órgãos da linhagem susceptível C3H/HeJ, estes eventos não foram suficientes para controlar a doença e danos aos tecidos desses animais infectados. Talvez uma menor ativação inicial do sistema imune inato ocorra nos animais “toll4” deficientes, permitindo evasão da bactéria do sistema imune do hospedeiro.

O melhor conhecimento do perfil de citocinas e quimiocinas, bem como as estratégias de evasão imune utilizadas por *Leptospira* spp. poderão contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos e alternativas profiláticas contra a leptospirose.

REFERÊNCIAS*

- 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(2):79-83.
- Adler B, Lo M, Seemann T, Murray GL. Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Vet Microbiol*. 2011;153(1-2):73-81.
- Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett*. 2003;85(2):85-95.
- Andrew PJ, Harant H, Lindley IJ. Up-regulation of interleukin-1 β -stimulated interleukin-8 in human keratinocytes by nitric oxide. *Biochem Pharmacol*. 1999;57(12):1423-9.
- Appelberg R. Macrophage inflammatory proteins MIP-1 and MIP-2 are involved in T cell-mediated neutrophil recruitment. *J Leukoc Biol*. 1992;52(3):303-6.
- Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines. In: Kaufmann SHE, Steward MW, editor *Topley & Wilson's Immunology*. 10th ed. ASM Press, 2005.
- Balamayooran G, Batra S, Fessler MB, Happel KI, Jeyaseelan S. Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs against bacteria. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010a;43(1):5-16.
- Balamayooran T, Balamayooran G, Jeyaseelan S. Toll-like receptors and NOD-like receptors in pulmonary antibacterial immunity. *Innate Immun*. 2010b;16(3): 201-10. Review
- Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO, et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infect Immun*. 2006;74(11):6356-64.
- Bartlett AH, Foster TJ, Hayashida A, Park PW. Alpha-toxin facilitates the generation of CXC chemokine gradients and stimulates neutrophil homing in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J Infect Dis*. 2008;198(10):1529-35.
- Behm-Ansmant I, Gatfield D, Rehwinkel J, Hilgers V, Izaurralde E. A conserved role for cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABPC1) in nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J*. 2007a;26(6):1591-601.
- Behm-Ansmant I, Kashima I, Rehwinkel J, et al. mRNA quality control: an ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. *FEBS Lett*. 2007b;581(15):2845-53.

De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Beisiegel M, Kursar M, Koch M, et al. Combination of host susceptibility and virulence of *Mycobacterium tuberculosis* determines dual role of nitric oxide in the protection and control of inflammation. *J Infect Dis*. 2009;199(8):1222-32.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(12):757-71.

Breiner DD, Fahey M, Salvador R, Novakova J, Coburn J. *Leptospira interrogans* binds to human cell surface receptors including proteoglycans. *Infect Immun*. 2009;77(12):5528-36.

Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(39):14560-5.

Chassin C, Picardeau M, Goujon JM, et al. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. *J Immunol*. 2009;183(4):2669-77.

Chierakul W, de Fost M, Suputtamongkol Y, et al. Differential expression of interferon-gamma and interferon-gamma-inducing cytokines in Thai patients with scrub typhus or leptospirosis. *Clin Immunol*. 2004;113(2):140-4.

Choy HA, Kelley MM, Chen TL, et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun*. 2007; 75(5):2441-50.

Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun*. 2002;70(5):2311-8.

Cullen PA, Haake DA, Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol Rev*. 2004;28(3):291-318.

Da Silva JB, Carvalho E, Covarrubias AE, et al. Induction of TNF- α and CXCL-2 mRNAs in different organs of mice infected with pathogenic *Leptospira*. *Microb Pathog*. (2012);doi:10.1016/j.micpath.2012.01.002

Da Silva JB, Carvalho E, Hartskeerl RA, Ho PL. Evaluation of the use of selective PCR amplification of LPS biosynthesis genes for molecular typing of *Leptospira* at the serovar level. *Curr Microbiol*. 2011;62(2):518-24.

Da Silva JB, Ramos TM, de Franco M, et al. Chemokines expression during *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni infection in resistant BALB/c and susceptible C3H/HeJ mice. *Microb Pathog*. 2009;47(2):87-93.

Dean TP, Dai Y, Shute JK, Church MK, Warner JO. Interleukin-8 concentrations are elevated in bronchoalveolar lavage, sputum, and sera of children with cystic fibrosis. *Pediatr Res*. 1993;34(2):159-61.

Diament D, Brunialti MK, Romero EC, Kallas EG, Salomao R. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. *Infect Immun*. 2002;70(4):1677-83.

Ellinghausen HC, McCullough WG. Nutrition of *Leptospira Pomona* and Growth of 13 Other Serotypes: A Serum-Free Medium Employing Oleic Albumin Complex. *Am J Vet Res*. 1965;26:39-44.

Estavoyer JM, Racadot E, Couetdic G, Leroy J, Groperrin L. Tumor necrosis factor in patients with leptospirosis. *Rev Infect Dis*. 1991;13(6):1245-6.

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

Galli M, Esposito R, Crocchiolo P, et al. Immune complexes in leptospirosis. *Infection*. 1985;13(3):156.

Ganoza CA, Matthias MA, Collins-Richards D, et al. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Med*. 2006;3(8):e308.

Graham KL, Zabel BA, Loghavi S, et al. Chemokine-like receptor-1 expression by central nervous system-infiltrating leukocytes and involvement in a model of autoimmune demyelinating disease. *J Immunol*. 2009;183(10):6717-23.

Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol*. 1993;139(8):1691-700.

Greenberger MJ, Strieter RM, Kunkel SL, et al. Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of *Klebsiella pneumoniae*. *J Immunol*. 1995;155(2):722-9.

Grygorczuk S, Pancewicz S, Zajkowska J, et al. Concentrations of macrophage inflammatory proteins MIP-1alpha and MIP-1beta and interleukin 8 (il-8) in lyme borreliosis. *Infection*. 2004;32(6):350-5.

Haake DA, Martinich C, Summers TA, et al. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infect Immun*. 1998;66(4):1579-87.

Holub M, Cheng CW, Mott S, et al. Neutrophils sequestered in the liver suppress the proinflammatory response of Kupffer cells to systemic bacterial infection. *J Immunol*. 2009;183(5):3309-16.

Hsu SH, Lo YY, Tung JY, et al. Leptospiral outer membrane lipoprotein LipL32 binding on toll-like receptor 2 of renal cells as determined with an atomic force microscope. *Biochemistry*. 2010;49(26):5408-17.

- Huffnagle GB, Strieter RM, Standiford TJ, et al. The role of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in the recruitment of monocytes and CD4+ T cells during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol*, 1995;155(10):4790-7.
- Hung CC, Chang CT, Chen KH, et al. Upregulation of chemokine CXCL1/KC by leptospiral membrane lipoprotein preparation in renal tubule epithelial cells. *Kidney Int*. 2006;69(10):1814-22.
- Jost BH, Adler B, Vinh T, Faine S, et al. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. *J Med Microbiol*. 1986;22(3):269-75.
- Kawabata H, Dancel LA, Villanueva SY, et al. *flaB*-polymerase chain reaction (*flaB*-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection and identification of *Leptospira* spp. *Microbiol Immunol*. 2001;45(6):491-6.
- Klimpel GR, Matthias MA, Vinetz JM, et al. *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(3):1447-55.
- Ko AI, Goarant C, Picardeau M, et al. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(10):736-47.
- Koizumi N, Watanabe H. Identification of a novel antigen of pathogenic *Leptospira* spp. that reacted with convalescent mice sera. *J Med Microbiol*. 2003;52(Pt 7):585-9.
- Lahat N, Rahat MA, Kinarty A, et al. Hypoxia enhances lysosomal TNF-alpha degradation in mouse peritoneal macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;295(1):C2-12.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):296-326.
- Li S, Ojcius DM, Liao S, et al. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. *Innate Immun*. 2010;16(2):80-92.
- Liang Y, Hasturk H, Elliot J, et al. Toll-like receptor 2 induces mucosal homing receptor expression and IgA production by human B cells. *Clin Immunol*. 2011;138(1):33-40.
- Lin YP, Greenwood A, Yan W, et al. A novel fibronectin type III module binding motif identified on C-terminus of *Leptospira* immunoglobulin-like protein, LigB. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;389(1):57-62.
- Listvanova S, Temmerman S, Stordeur P, et al. Optimal kinetics for quantification of antigen-induced cytokines in human peripheral blood mononuclear cells by real-time PCR and by ELISA. *J Immunol Methods*, 2003;281(1-2):27-35.

Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.

Lo M, Bulach DM, Powell DR, et al. Effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays. *Infect Immun*. 2006;74(10):5848-59.

Lo M, Murray GL, Khoo CA, et al. Transcriptional response of *Leptospira interrogans* to iron limitation and characterization of a PerR homolog. *Infect Immun*. 2010;78(11):4850-9.

Loures FV, Pina A, Felonato M, et al. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. *Infect Immun*. 2010;78(3):1078-88.

Lowanitchapat A, Payungporn S, Sereemasapun A, et al. Expression of TNF-alpha, TGF-beta, IP-10 and IL-10 mRNA in kidneys of hamsters infected with pathogenic *Leptospira*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2010; 33(5):423-34.

Ma J, Zhang YG, Xia Y, Sun J. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor modulates the expression of *Salmonella typhimurium* effector proteins. *J Inflamm (Lond)*. 2010;7:42.

Massena S, Christoffersson G, Hjertström E, et al. A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood*. 2010;116(11):1924-31.

Matsui M, Rouleau V, Bruyère-Ostells L, Goarant C. Gene expression profiles of immune mediators and histopathological findings in animal models of leptospirosis: comparison between susceptible hamsters and resistant mice. *Infect Immun*. 2011; 79(11):4480-92.

Matsunaga J, Lo M, Bulach DM, et al. Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. *Infect Immun*. 2007;75(6):2864-74.

McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*, 2005;18(5):376-86. Review.

Ministério da Saúde: Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br> acesso em 10/01/12

Nacional Center for Biotechnology Information. GenBank. [database]. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

Nahori MA, Fournié-Amazouz E, Que-Gewirth NS, et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol*. 2005;175(9):6022-31.

Nally JE, Chantranuwat C, Wu XY, Fishbein MC, 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(3):1115-27.

Nally JE, Fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA. Lethal infection of C3H/HeJ and C3H/SCID mice with an isolate of *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. *Infect Immun*. 2005;73(10):7014-7.

Nally JE, Timoney JF, Stevenson B. Temperature-regulated protein synthesis by *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*. 2001;69(1):400-4.

Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol*. 2004;186(7):2164-72.

Netea MG, Kullberg BJ, Van der Meer JW. Circulating cytokines as mediators of fever. *Clin Infect Dis*. 2000;31Suppl5:S178-84.

Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis*. 2008;12(4):351-7.

Patarakul K, Lo M, Adler B. Global transcriptomic response of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni upon exposure to serum. *BMC Microbiol*. 2010;10: 31

Pereira MM, Andrade J, Marchevsky RS, Ribeiro dos Santos R. Morphological characterization of lung and kidney lesions in C3H/HeJ mice infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae: defect of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells are prognosticators of the disease progression. *Exp Toxicol Pathol*. 1998;50(3):191-8.

Pereira MM, Da Silva JJ, Pinto MA, et al. Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;72(1):13-20.

Petros S, Leonhardt U, Engelmann L. Serum procalcitonin and proinflammatory cytokines in a patient with acute severe leptospirosis. *Scand J Infect Dis*. 2000;32(1):104-5.

Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, 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.

Priya CG, Rathinam SR, Muthukkaruppan V. Evidence for endotoxin as a causative factor for leptospiral uveitis in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(12):5419-24.

Que-Gewirth NL, Ribeiro AA, Kalb SR, 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 TLR2. *J Biol Chem*. 2004;279(24):25420-9.

- Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity*, 2009;31(5):711-21.
- Ren SX, Fu G, Jiang XG, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 2003;422(6934):888-93.
- Sarkar U, Nascimento SF, Barbosa R, et al. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66(5):605-10.
- Seebach J, Bartholdi D, Frei K, et al. Experimental *Listeria* meningoencephalitis. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and -2 are produced intrathecally and mediate chemotactic activity in cerebrospinal fluid of infected mice. *J Immunol*. 1995;155(9):4367-75.
- Seegerer S, Nelson PJ, Schlöndorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(1):152-76.
- Sierra B, Perez AB, Vogt K, et al. MCP-1 and MIP-1alpha expression in a model resembling early immune response to dengue. *Cytokine*, 2010;52(3):175-83.
- Spichler AS, Vilaça PJ, Athanazio DA, et al. Predictors of lethality in severe leptospirosis in urban Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79(6):911-4.
- Springer TA. Leucocyte adhesion to cells. *Scand J Immunol*. 1990;32(3):211-6.
- Standiford TJ, Kunkel SL, Lukacs NW, et al. Macrophage inflammatory protein-1 alpha mediates lung leukocyte recruitment, lung capillary leak, and early mortality in murine endotoxemia. *J Immunol*. 1995;155(3):1515-24.
- Standiford TJ, Rolfe MW, Kunkel SL, et al. Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in interstitial lung disease. *J Immunol*. 1993;151(5):2852-63.
- Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*. 1995;270(45):27348-57.
- Tajiki H, Salomao R. Association of plasma levels of tumor necrosis factor alpha with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis. *Clin Infect Dis*. 1996;23(5):1177-8.
- Tang WW, Qi M, Warren JS, Van GY. Chemokine expression in experimental tubulointerstitial nephritis. *J Immunol*. 1997;159(2):870-6.
- Thomas DD, Higbie LM. In vitro association of leptospires with host cells. *Infect Immun*. 1990;58(3):581-5.

Thornton AJ, Strieter RM, Lindley I, Baggiolini M, Kunkel SL. Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. *J Immunol*. 1990;144(7):2609-13.

Tian YC, Chen YC, Hung CC, et al. Leptospiral outer membrane protein induces extracellular matrix accumulation through a TGF-beta1/Smad-dependent pathway. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(10):2792-8.

Tian YC, Hung CC, Li YJ, et al. *Leptospira santarosai* Serovar Shermani detergent extract induces an increase in fibronectin production through a Toll-like receptor 2-mediated pathway. *Infect Immun*. 2011;79(3):1134-42.

Tzouvelekis A, Kouliatsis G, Anevlavis S, Bouros D. Serum biomarkers in interstitial lung diseases. *Respir Res*. 2005;6:78.

Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med (Berl)*. 2006;84(9):712-25.

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(7):4172-9.

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(2):887-95.

Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL. Elevated levels of macrophage inflammatory protein 2 in severe murine peritonitis increased neutrophil recruitment and mortality. *Infect Immun*. 1997;65(9):3847-51.

Wang MJ, Jeng KC, Shih PC. Differential expression and regulation of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-2 genes by alveolar and peritoneal macrophages in LPS-hyporesponsive C3H/HeJ mice. *Cell Immunol*. 2000;204(2):88-95.

Werno C, Schmid T, Schnitzer SE, et al. A combination of hypoxia and lipopolysaccharide activates tristetraprolin to destabilize proinflammatory mRNAs such as tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol*. 2010;177(3):1104-12.

Werts C, Tapping RI, Mathison JC, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol*. 2001; 2(4):346-52.

World Health Organization. Leptospirosis: an emerging public health problem. *Weekly Epidemiol Rec*. 2011;86(6):45-52.

Yang CW. Leptospirosis renal disease: understanding the initiation by Toll-like receptors. *Kidney Int*. 2007;72(8):918-25.

Yang CW, Hung CC, Wu MS, et al. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. *Kidney Int.* 2006;69(5): 815-22.

Yang CW, Wu MS, Pan MJ, et al. Leptospira outer membrane protein activates NF-kappaB and downstream genes expressed in medullary thick ascending limb cells. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(11):2017-26.

Yang OO, Garcia-Zepeda EA, Walker BD, Luster AD. Monocyte chemoattractant protein-2 (CC chemokine ligand 8) inhibits replication of human immunodeficiency virus type 1 via CC chemokine receptor 5. *J Infect Dis.* 2002;185(8):1174-8.

Zeilhofer HU, Schorr W. Role of interleukin-8 in neutrophil signaling. *Curr Opin Hematol.* 2000;7(3):178-82.

ANEXO A

ANEXO B