

LARISSA MARIA FEITOSA GONÇALVES

**IMUNOPATOGENIA DA LESÃO RENAL NA INFECÇÃO POR  
LEPTOSPIRAS EM SUÍNOS INFECTADOS NATURALMENTE**

Orientador: Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa

TERESINA/PI, 2013

LARISSA MARIA FEITOSA GONÇALVES

**IMUNOPATOGENIA DA LESÃO RENAL NA INFECÇÃO POR  
LEPTOSPIRAS EM SUÍNOS INFECTADOS NATURALMENTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa

TERESINA/PI, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

G635i Gonçalves, Larissa Maria Feitosa.

Imunopatogenia da lesão renal na infecção por leptospiros em suínos infectados naturalmente / Larissa Maria Feitosa Gonçalves. – 2013.

56 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2013.

“Orientador: Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa”.

1. Suínos - Leptospirose . 2. Leptospiroses. 3. Rim - Patologia. 4. Imunopatogenia. I. Título.

CDD 636.408 96

IMUNOPATOGENIA DA LESÃO RENAL EM SUÍNOS NATURALMENTE  
INFECTADOS POR LEPTOSPIRAS

LARISSA MARIA FEITOSA GONÇALVES

Tese Aprovada em: 26/03/2013

Banca Examinadora:



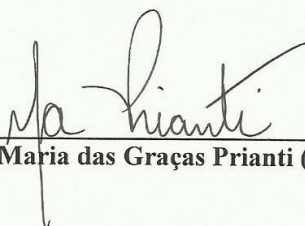
Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI



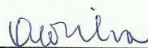
Profa. Dra. Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro (Interna) / DCCV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Marcia dos Santos Rizzo (Interna) / DCCV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Maria das Graças Prianti (Externa) / AUTÔNOMA



Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva (Externa) / UEMA

*Aos meus pais Salomão Xavier  
Gonçalves Filho e Maria Goreti  
Feitosa Gonçalves*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À DEUS e a Nossa Senhora, que iluminam o meu caminho;

Aos meus amados pais Salomão e Goreti, por terem investido na minha formação sem nunca terem medido esforços para que eu tivesse o melhor; por representarem o exemplo que sempre quis seguir e por estarem sempre ao meu lado me apoiando, pelo amor que doaram e por tudo que sou.

Aos meus queridos e amados irmãos e sobrinho Lya, Romero e Heitor pela presença constante em minha vida, pelo companheirismo, pelo amor que sempre nos uniu e pelos momentos felizes que sempre compartilhamos.

Ao meu marido Laio Lunardo, quem amo e admiro, por seu amor incondicional, dedicação e incentivo;

Aos demais membros da minha FAMÍLIA, pelo apoio e carinho necessários;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa durante o Doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa, exemplo de professor, pesquisador, competência e sabedoria, e por ter me oferecido a oportunidade de ser sua orientanda de doutorado;

Aos meus amigos, Karina Oliveira Drumond, Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro, Maria das Graças Prianti, Ângela Piauilino Campos, Micherlene da Silva Carneiro, Elis Rosélia Dutra de Freitas Siqueira Silva, Sônia Maria de Carvalho, pela imensa ajuda na colheita, processamento das amostras e realização das técnicas;

Aos professores da Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí;

Aos meus colegas de Pós-graduação e do Laboratório de Patologia Animal: Luciano, Luanna, Dayane, Lucilene, Geórgia, Chico, Simone, Fernando, Nilton, Raquel, Mayara, Dona Rosângela, pela amizade e momentos de descontração;

Aos membros da banca (Professoras: Márcia, Ana Lys, Prianti, e Ana Lúcia) que aceitaram participar da banca examinadora dessa Tese.

Ao Manoel de Jesus e Eduardo Brás, Técnicos do Laboratório de Histopatologia do Centro de Ciências Agrárias da UFPI, pela confecção das lâminas e realização das colorações histopatológicas;

Aos funcionários da Pós-Graduação, Luís Gomes da Silva, Daniela e Vicente, sempre prestativos;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!!!!**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	13
2 CAPÍTULO I: O papel de células T CD4 <sup>+</sup> e MHC de classe II na nefropatia da leptospirose em suínos.....	20
3 CAPÍTULO II: O papel de imunoglobulinas na nefropatia da leptospirose em suínos.....	40
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	53



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 01.** Figura 01. Rim. Suíno infectado naturalmente por *Leptospira* spp.. Infiltrado inflamatório na região cortical. Coloração: PAS. Obj: 40x.

**Figura 02.** Figura 02. Antígeno de *Leptospira* em células glomerulares (seta branca), células epiteliais tubulares (seta preta), e células epiteliais parietais da cápsula de Bowman (seta vermelha), em rim de suíno naturalmente infectado por *Leptospira* sp. Coloração: Imunoperoxidase. Obj: 40x.

**Figura 03.** Análise semiquantitativa da presença de antígeno de leptospira (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em tecido renal de suínos positivos na Imunoistoquímica. N = número de animais por grupo. \* $p < 0,05$  (Teste de Kruscal-Wallis e Student-Newman-Keuls Method).

**Figura 04.** Figura 04. Imunocoloração de células T CD4<sup>+</sup> em células epiteliais tubulares, células glomerulares (células mesangiais) e em células intersticiais, em rim de suíno naturalmente infectado por *Leptospira* spp. Coloração: Imunoperoxidase. Obj: 40x.

**Figura 05.** Análise quantitativa da marcação de moléculas de CD4<sup>+</sup> (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em suínos infectados e não infectados. N = N° de animais por grupo. \* $p < 0,05$  (Teste t de Student).

**Figura 06.** Análise quantitativa da marcação de moléculas de CD4<sup>+</sup> (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em suínos infectados e não infectados. N = N° de animais por grupo. \* $p < 0,05$  (Teste de Mann Whitney).

**Figura 07.** Marcação de MHC de classe II em células epiteliais tubulares, células glomerulares (células mesangiais), células intersticiais e cápsula de Bowman, em rim de suíno naturalmente infectado por *Leptospira* spp. Coloração: Imunoperoxidase. Obj: 40x.

**Figura 08.** Análise quantitativa da marcação de MHC de classe II (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em suínos infectados e não infectados. N = N° de animais por grupo.  $p = 0,1037$  (Teste t de Student).

## CAPÍTULO II

**Figura 01.** Rim. Suíno infectado naturalmente por *Leptospira* spp.. Infiltrado inflamatório mononuclear na região cortical. Coloração: PAS. Ob: 40x.

**Figura 02.** Antígeno de *Leptospira* em células glomerulares, células epiteliais tubulares e células epiteliais parietais da cápsula de Bowman, em rim de suíno naturalmente infectado por *Leptospira* sp. Coloração: Imunoperoxidase. Ob: 40x.

**Figura 03.** IgG no glomérulo de suíno naturalmente infectado por *Leptospira* spp. Coloração: Imunoperoxidase. Ob: 40x.

**Figura 04.** IgM no glomérulo de suíno naturalmente infectado por *Leptospira* spp. Coloração: Imunoperoxidase. Ob: 40x.

**Figura 05.** IgA no glomérulo suíno naturalmente infectado por *Leptospira* spp. Coloração: Imunoperoxidase. Ob: 40x.

**Figura 06.** Análise semiquantitativa da marcação de IgM (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em suínos infectados e não infectados. N = N° de animais por grupo. \*p < 0,05 (Teste de Mann Whitney).

**Figura 7.** Análise semiquantitativa da marcação de IgA (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em suínos infectados e não infectados. N = N° de animais por grupo. \*p < 0,05 (Teste de Mann Whitney).

**Figura 8.** Análise semiquantitativa da marcação de IgG (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em suínos infectados e não infectados. N = N° de animais por grupo. \*p < 0,05 (Teste de Mann Whitney).

## LISTA DE TABELA

### CAPÍTULO II

**Tabela 01.** Resultados da sorologia, com os sorovares encontrados, da análise semi-quantitativa de antígeno de *Leptospira* spp., da marcação de IgG, IgM e de IgA, em rim de suínos naturalmente infectados. Imunoperoxidase

## RESUMO

As leptospiroses são doenças zoonóticas que provocam lesões, principalmente, nos rins, caracterizada como nefrite túbulointersticial. O mecanismo de lesão é complexo e pouco compreendido. Estudos apontam para ação direta da bactéria sobre células do hospedeiro com produção de toxinas e enzimas proteolíticas, mas, também é observada a participação da imunidade inata e adquirida na lesão renal. Objetivou-se com este estudo pesquisar a imunopatogenia das leptospiroses em suínos infectados naturalmente. Para este estudo foram colhidos os soros e fragmentos de rim de 139 suínos. Pela técnica de soroaglutinação microscópica obteve-se oito amostras positivas para um ou mais sorovares de *Leptospira interrogans*. A técnica de PCR detectou sete suínos positivos. Dentre as alterações histopatológicas observadas, nefrite intersticial linfocitocitária foi a mais encontrada, de distribuição focal, peritubular e perivascular, e intensidade variando de mínima a moderada; foi observado também fibrose de intensidade mínima a média, vasculite, tumefação de endotélio vascular, degeneração de células epiteliais tubulares, atrofia de túbulos, congestão da região medular, tumefação do tufo glomerular e hiperplasia difusa. A imunocoloração para a molécula CD4<sup>+</sup> e MHC de classe II foi observada em células glomerulares, células intersticiais e em células epiteliais tubulares tanto nos suínos infectados, quanto nos não infectados. Depósitos de IgG, IgM e IgA foram observados em um padrão granular, no endotélio de capilares glomerulares, com marcação focal, global e segmentar; no endotélio dos capilares intertubulares; na cápsula de Bowman e em células epiteliais tubulares, tanto nos suínos infectados, como nos não infectados. Os resultados mostram que células epiteliais tubulares, células T CD4<sup>+</sup>, IgM e IgA estão envolvidas na mediação imune da lesão renal na leptospirose em suínos, no entanto, MHC II e IgG não apresentam um papel claro.

**Palavras-chave:** Suíno, Leptospiroses, Rim, Imunopatogenia.

## ABSTRACT

The leptospirosis are zoonotic diseases that cause lesions mainly in the kidneys, characterized as tubulointerstitial nephritis. The mechanism of injury is complex and poorly understood, studies point to the direct action of the bacteria on host cells to produce toxins and proteolytic enzymes, but is also observed participation of innate immunity and acquired in renal injury. The objective of this study was to investigate the immunopathogenesis of leptospirosis in pigs naturally infected. For this study, sera and renal tissue of 139 pigs were collected. By microscopic agglutination test there was obtained eight samples positive for one or more *Leptospira interrogans* serovar. The PCR detected seven positive pigs. Among the histopathological changes observed, interstitial nephritis was found most frequently, focal distribution, peritubular and perivascular, and intensity ranging from minimal to moderate; fibrosis was also observed in intensity varied from minimal to average, vasculitis, swelling of vascular endothelial, degeneration of tubular epithelial cells, tubular atrophy, congestion of the medullary region, swelling of the glomerular tuft and diffuse hypercellularity. Immunostaining for the molecule CD4 + and MHC class II was observed in glomerular cells, interstitial cells and tubular epithelial cells in both the infected pigs as well as in uninfected. Deposits of IgG, IgM and IgA were observed in a granular pattern in the endothelium of glomerular capillaries with marking focal, segmental and global, the endothelium of capillaries intertubulares, Bowman's capsule and tubular epithelial cells in both infected and uninfected pigs. The results show that tubular epithelial cells, CD4<sup>+</sup> T cells, IgM and IgA are involved in mediating immune renal injury in leptospirosis in pigs, however, MHC II and IgG did not show a clear role.

**Keywords:** Swine, Leptospirosis, Rim, Immunopathogenesis.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As leptospiroses são doenças zoonóticas de distribuição mundial, relatadas em seres humanos, suínos, bovinos, eqüinos, caprinos, cães, e em diversas espécies de animais silvestres (TAGLIABUE; FARINA, 1995).

A enfermidade é causada por bactérias patogênicas da ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e gênero *Leptospira* (BARANTON, 1995). Na classificação sorológica realizada desde 1915, o gênero *Leptospira* é dividido em duas espécies: a *Lepstopira interrogans*, que compreende as estirpes patogênicas, e *Leptospira biflexa*, que compreende as estirpes saprófitas (SOTO, 2007).

Estudos taxonômicos recentes, baseados na homologia do DNA, têm proporcionado à descrição de treze genomoespécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. alstonii* (genomoespécie 1), *L. borgpetersenii*, *L. inadae*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. terpstrae* (genomoespécie 3), *L. weilii*, *L. wolffii* e mais de 260 sorovares, e as genomoespécies saprófitas incluem: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae* (genomoespécie 5), *L. kmetyi*, *L. vanthielii* (genomoespécie 4) e *L. wolbachi*, que contém mais de 60 sorovares (ADLER; MOCTEZUMA, 2009).

As leptospiroses são bactérias aeróbias obrigatórias, que medem 0,1µm de diâmetro e 6 a 20 µm de comprimento. Apresentam morfologia filamentosa, espiralada, com movimentos rotacionais e de dobramento (helicoidal) o que possibilita motilidade ativa (BARANTON, 1995). Por causa de seu reduzido diâmetro, as leptospiroses são melhores visualizadas em microscópio de campo escuro ou microscópio de contraste de fase (FAINE et al., 1999).

A variante sorológica ou sorovar é a unidade taxonômica do gênero. O grande número de variantes sorológicas existentes dificulta os estudos, pois podem ocorrer variações regionais, bem como variações nas espécies estudadas. Há especificidade de sorovares por determinados hospedeiros vertebrados, podendo haver um mesmo hospedeiro infectado por um ou mais sorovares e os animais podem atuar como hospedeiros de manutenção para alguns sorovares e hospedeiros acidentais para outros, nos quais a infecção pode ser grave ou fatal (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; RIET-CORREA et al., 2007).

A cadeia epidemiológica da leptospirose envolve três elos: a fonte de infecção, as vias de transmissão e o hospedeiro susceptível (BROD; FEHLBERG, 1992). Os animais domésticos de manutenção são considerados hospedeiros primários importantes para a persistência dos focos de

infecção e o homem, hospedeiro acidental e terminal, sendo pouco eficiente na perpetuação da doença (BADKE, 2001).

A doença é mais incidente em países de clima tropical, provavelmente devido ao aumento da sobrevivência das leptospiros em ambientes com temperaturas que variam de 25 a 30°C e condições climáticas úmidas, onde podem persistir por semanas a meses. Em regiões de clima temperado, a doença é sazonal, com grande incidência no verão e no período de maior densidade pluviométrica (VINETZ, 2001; BHARTI et al., 2003).

A infecção por leptospiros em suínos tem sido descrita em todo o mundo. O primeiro registro de leptospirose em suínos foi feito por Wagener em 1942 que descreveu, na Alemanha, a transmissão da doença de um suíno para o homem (GUIDA, 1948). No Brasil a infecção já foi registrada nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais, Goiás, Rio de Janeiro, Ceará, Pernambuco, Maranhão e Piauí (FAVERO et al., 2002; SOTO et al., 2007; GONÇALVES et al., 2011).

Os suínos podem ser hospedeiros de manutenção, especialmente quando infectados pelos sorovares *Pomona*, *Bratislava* e *Tarassovi*, ou hospedeiros acidentais, quando infectados pelos sorovares *Icterohaemorrhagiae*, *Canícola*, *Autumnalis*, *Hardjo* e *Grippotyphosa* (GONÇALVES; COSTA, 2011). Na infecção por um sorovar específico do suíno, há uma adaptação hospedeiro-parasita, os sinais clínicos são pouco evidentes ou não se manifestam, e as leptospiros são mantidas no trato urinário por longo período, de onde são transportadas pela urina, em condições viáveis, para infectar outros animais e homem. Já na infecção acidental, quando os suínos são infectados por um sorovar adaptado a outra espécie, os sinais clínicos são bem evidentes, no entanto a permanência no trato urinário ocorre por pouco tempo e há também transporte de menor número de leptospiros pela urina (OLIVEIRA, 1999; SHIMABUKURO et al., 2003).

Os estudos realizados de 1973 a 2011 revelaram que os principais sorovares encontrados infectando suínos foram *Pomona*, *Grippotyphosa*, *Pyrogenes*, *Canícola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Autumnalis*, *Ballum* e *Javanica* (SOTO et al., 2007; GONÇALVES; COSTA, 2011).

A transmissão pode ocorrer de forma direta ou indireta. A transmissão direta ocorre pelo contato com sangue e ou urina de animais doentes, por transmissão venérea e placentária. A transmissão indireta resulta do contato com a urina e descargas uterinas de animais infectados, fetos abortados e fômites, por meio do solo, alimentos ou água contaminada (OLIVEIRA; LIMA, 1996). As leptospiros podem penetrar no organismo através das mucosas, da pele íntegra

(imersa em água) ou da pele com solução de continuidade (LEVETT, 2001; RIET-CORREA et al., 2007).

A penetração das leptospiras nos suínos ocorre principalmente através de soluções de continuidade da pele e superfícies mucosas. O período de incubação é de 2 a 5 dias, com posterior disseminação hematogena, com localização e proliferação nos órgãos parenquimatosos, principalmente fígado e rins (SOTO et al., 2007; MONAHAN, CALLANAN e NALLY, 2009). A leptospiremia dura em torno de dois a três dias, caracterizada por uma fase febril e já no quarto dia, as leptospiras estão presentes nos rins, onde se localizam nos túbulos renais, principalmente no túbulo proximal, causando nefrite intersticial (CORREA; CORREA, 1992). As leptospiras tendem a persistir em locais como túbulos renais, olhos e útero, onde a ação dos anticorpos é mínima (SOTO et al., 2007) devido a ausência de ativação de complemento (MONAHAN, CALLANAN e NALLY, 2009).

As leptospiroses em suínos se manifestam, basicamente, nas formas aguda e crônica. Na aguda, frequentemente ocorre febre e mastite focal nos animais adultos; nos leitões, pode ocorrer febre, anorexia, hemoglobinúria, casos de encefalite, acessos convulsivos e alta mortalidade (FAINE et al., 1999). A forma crônica é mais comum nos animais adultos e se manifesta clinicamente por infertilidade, abortamentos, natimortos e leptospirúria, sendo mais evidentes nas fêmeas (BASTOS, 2006).

As lesões provocadas por *Leptospira* spp. são observadas, principalmente, nos rins, mas também são afetados, fígado, útero, coração e pulmões, onde as leptospiras chegam por via hematogena (YANG, WU e PAN, 2001). A lesão renal caracteriza-se por alterações túbulo-intersticiais, como nefrite intersticial, com prevalência de linfócitos e macrófagos, localização predominantemente na região cortical, mas, também, na região córtico-medular e medular, de distribuição focal, localização perivascular, periglomerular e peritubular e intensidade variando de mínima a moderada. Em glomérulos observa-se hiperplasia focal de células mesangiais, tufo glomerular lobulado com espessamento da membrana basal do capilar glomerular e presença de material protéico na cápsula de Bowman em menor quantidade. Em alguns túbulos constata-se atrofia focal e também fibrose renal (GONÇALVES et al., 2011). Nefrite intersticial multifocal também pode ser encontrada, acompanhadas de manchas brancas no parênquima renal (BOQVIST et al., 2003).

O mecanismo de lesão provocado pelas leptospiras nos hospedeiros é complexo e pouco compreendido. Os estudos apontam para ação direta da bactéria sobre células do hospedeiro com produção de toxinas e enzimas proteolíticas, e consequente lesão tecidual (FAINE et al., 1999;



DAHER et al., 2010). Essa ação está relacionada à inibição da expressão de genes que codificam proteínas do citoesqueleto de células endoteliais e da matriz extracelular, proporcionando uma maior motilidade e disseminação das leptospiros no organismo humano (MARTINEZ-LOPEZ, FAHEY e COBURN, 2010).

Por outro lado, tanto o sistema imune inato (DAHER et al., 2010) quanto adquirido (CHASSIN et al., 2009), participam da mediação da ação das leptospiros sobre o organismo do hospedeiro. A membrana externa da leptospira contém componentes antigênicos como, lipoproteínas, lipopolissacarídeos e os peptídeoglicanos, que podem causar lesões. Na leptospirose, a LipL32 é a mais importante proteína de membrana externa (OMPs) que afeta diretamente as células dos túbulos proximais, aumentando consideravelmente a expressão de genes e de proteínas pró-inflamatórias, tais como óxido nítrico sintase induzível (iNOS), proteína 1 quimiotática para monócitos (CCL2/MCP-1), RANTES (CCL5/Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). A estimulação de iNOS e CCL2-MCP-1 pelo LipL32, depende da presença de receptores Toll-like (TLRs) em células dos túbulos proximais. Esses receptores reconhecem distintos padrões moleculares associados a patógenos, incluindo lipopolissacarídeos da parede celular de leptospiros, agindo como primeira linha de defesa da imunidade inata por meio de um estímulo inflamatório inicial (DAHER et al., 2010).

Duas famílias de receptores, os Toll-like (TLRs) e Nod-like (NLRs) desempenham papel importante na patogênese das leptospiros (MOGENSEN, 2009). Entre os TLRs, o TLR2 e TLR4 são os mais estudados na leptospirose. Lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram negativas é capaz de ativar TLR4, resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (MILLER, ERNST e BADER, 2005). Em humanos, há ativação de macrófagos por meio do TLR2 devido a interação com lipopolissacarídeo da leptospira (WERTS et al., 2001). Em camundongos (C57BL/6J), que são resistentes à leptospirose, o LPS é reconhecido por TLR2 e TLR4 (NAHORI et al., 2005), sendo importantes no controle da infecção. Camundongos deficientes de TLR2 e TLR4, infectados com *Leptospira interrogans*, morrem rapidamente de insuficiência hepática e renal (CHASSIN et al., 2009).

As leptospiros são patógenos extracelulares e a resposta imune adquirida depende da produção de anticorpos e ativação da via clássica do sistema complemento. Estudos mostram que após infecção experimental em rato (*Rattus norvegicus*) ocorre disseminação da infecção para quase todos os tecidos em uma fase precoce, seguida de eliminação das leptospiros, provavelmente facilitada por imunoglobulinas anti-leptospiros circulantes (IgM e IgG)

(MONAHAN, CALLANAN, e NALLY, 2009). No entanto, os rins podem ser imunologicamente favorecidos para a colonização por leptospiras, se imunoglobulinas anti-leptospiras presentes nos túbulos e bexiga urinária são inábeis para matar a bactéria. Isso ocorre, possivelmente, devido a ausência de ativação do sistema complemento. É conhecido que o genoma de leptospiras patogênicas codificam um grupo de proteínas chamadas proteínas Len (leptospiral endostatin-Like = endostatina leptospiral símile), algumas com propriedades de se ligarem a proteínas reguladoras do sistema complemento, como, por exemplo, o fator H. Esse grupo de proteínas estão ausentes em leptospiras não patogências, o que sugere a hipótese que essas proteínas promovem a evasão imune da bactéria. Ressalta-se que esse mecanismo de evasão ocorre apenas no rim, já que nos demais órgãos a ação imunológica contra leptospiras parece ser eficiente (STEVENSON et al., 2007; MONAHAN, CALLANAN e NALLY, 2009).

A resposta imune humoral é o principal mecanismo de defesa contra a leptospirose. No início da infecção são produzidas imunoglobulinas do tipo IgM para o controle da infecção. Após alguns dias, imunoglobulinas do tipo IgG são produzidas e provocam lise das leptospiras circulantes. Os anticorpos aderem ao lipopolissacarídeo da bactéria num processo de opsonização, preparando-as para serem fagocitados por macrófagos, o que resulta na diminuição dos sinais clínicos. No entanto, a bactéria permanece nos rins, sendo excretada na urina por vários meses após a infecção (COSTA et al., 1981; MONTEIRO, 2003). Nesse tipo de resposta imune, há uma maior participação de IgG e IgM, seja após infecção natural ou imunização, no entanto no homem observa-se uma maior produção de imunoglobulinas da classe IgM (ADLER et al., 1980; PETCHCLAI et al., 1991).

Complexos imunes circulantes podem estar correlacionados com a severidade dos sintomas. Sugere-se que o aumento na severidade da doença de Weil, possa ser resultante de uma resposta imune humoral intensa, já que falência renal, trombocitopenia e alterações pulmonares aparecem na fase imune da doença (GALLI et al., 1985; ABDULKADER et al., 2002). Em um estudo experimental realizado com cobaias, foi observado grande quantidade de antígeno de leptospira, na fase tardia da infecção, localizado principalmente no interstício, enquanto os depósitos de imunoglobulinas G (IgG) e complemento 3 (C3) foram visualizados em glomérulos e nas paredes de pequenos vasos sanguíneos (YASUDA et al., 1986), sugerindo que as lesões renais observadas na leptospirose possam ser mediadas por complexo imune (LAI et al., 1982).

Complexo de histocompatibilidade principal tipo II (MHC II) é uma molécula transmembrana, necessária para apresentação de antígenos para células T CD4<sup>+</sup> (DAVIS; BJORKMAN, 1988). A expressão constitutiva de MHC II já foi relatada em células dendríticas,

macrófagos e células B (DAAR et al., 1984). Essas células são capazes de endocitar antígenos estranhos e expressá-los no complexo MHC II que são exibidos na superfície celular. Em certas situações, as células epiteliais tubulares podem expressar MHC de classe II funcionando então como células apresentadoras de antígenos (APCs) não profissionais (ABBATE et al., 1998; VILAFRANCA, WOHLSEIN, TRAUTWEIN, 1995).

Células epiteliais tubulares renais (TECs) desempenham um papel central na reação inflamatória local, por meio da produção de citocinas e quimiocinas (VAN KOOTEN, DAHA, VAN ES, 1999) e como células apresentadoras de antígenos (APCs) não profissionais, podem regular a ativação local de células T (KELLEY; SINGER, 1993; VAN KOOTEN, WOLTMAN e DAHA, 2000). Alguns estudos têm demonstrado que as TECs podem induzir uma baixa resposta de células T, sugerindo um papel na manutenção de TECs na tolerância periférica a auto-antígenos (SINGER et al., 1993; NEILSON, 1993). Essa ativação de células T resulta de sinais co-estimulatórios estimulantes e inibitórios. As moléculas co-estimulatórias B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86), são predominantemente expressas por APCs profissionais (células dendríticas e monócitos) e, também, podem ser expressas por células epiteliais tubulares (SINGER, 1993; YOKOYAMA, 1994; FRASCA, 1998).

A expressão de MHC II em células epiteliais tubulares em suínos infectados por leptospiros, já foi detectada em túbulos da região cortical, em áreas de nefrite intersticial, bem como em túbulos com alterações regenerativas, sugerindo que essa molécula desempenha um papel tanto na estimulação da reação inflamatória como na resposta imune sistêmica (Radaelli et al., 2009).

O estudo da resposta imune na leptospirose pode fornecer informações importantes para compreender os mecanismos de ação da bactéria, bem como, para o desenvolvimento de uma vacina adequada, e também, para a aplicação de um tratamento mais eficaz e para prevenção da doença (LOWANITCHAPAT et al., 2009).

Várias espécies de animais são susceptíveis a sorovares diferentes de leptospiros. Essa variabilidade de espécies animais susceptíveis e de sorovares, pode definir padrões de respostas peculiares do hospedeiro frente à infecção, como pode ocorrer com a espécie suína, para a qual nenhum estudo foi realizado até o momento que esclarecesse em definitivo o papel da resposta imune humoral e celular na lesão renal.

Tendo em vista que o rim é um dos órgãos de localização preferencial de leptospiros, com destacada participação na modulação da infecção, e que é a partir deste órgão que ocorre a disseminação e infecção de outros animais, inclusive do homem, este estudo teve como objetivo

pesquisar a imunopatogenia renal na leptospirose em suínos, enfatizando a identificação de marcadores do sistema imune envolvidos na lesão renal.

Esta tese apresenta a seguinte estrutura formal: uma Introdução contendo uma Revisão de Literatura e os objetivos; capítulo I, contendo o artigo intitulado **“O papel de células T CD4<sup>+</sup> e MHC de classe II na nefropatia da leptospirose em suínos”**, que será submetido ao periódico: **Veterinary Immunology and Immunopathology**; capítulo II, contendo o artigo intitulado **“O papel de imunoglobulinas na nefropatia da leptospirose em suínos”**, este artigo será submetido ao periódico: **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**.

Os artigos foram formatados conforme exigência dos periódicos científicos em que serão encaminhados para publicação.

1 **O papel de células T CD4<sup>+</sup> e MHC de classe II na nefropatia da leptospirose**  
2 **em suínos**

3  
4 Larissa M. F. Gonçalves<sup>a</sup>, Ângela P. Campos<sup>a</sup>, Karina O. Drumond<sup>a</sup>, Micherlene S.  
5 Carneiro<sup>b</sup>, Elis R. D. F. S. Silva<sup>b</sup>, Francisco A. L. Costa<sup>c,\*1</sup>

6 <sup>a</sup>Doutoranda em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Setor de Patologia Animal, Campos da  
7 Socopo, S/N, Teresina, PI, Brasil.

8 <sup>b</sup>Mestranda em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Setor de Patologia Animal, Campos da  
9 Socopo, S/N, Teresina, PI, Brasil.

10 <sup>c</sup>Professor Associado, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Setor  
11 de Patologia Animal, Campos da Socopo, S/N, Teresina, PI, Brasil.

12  
13 **ABSTRACT**

14 Leptospirosis are zoonoses that affect humans and animals. Interstitial nephritis is the  
15 major renal injury caused by leptospirosis. In triggering the local inflammatory reaction  
16 tubular epithelial cells play a central role, because they can act as antigen-presenting  
17 cells not professionals, regulating the local activation of T cells. To search the  
18 involvement of molecules CD4 and MHC class II in renal injury in pigs infected with

---

<sup>1</sup>\*Autor para correspondência: Tel.: (86)3215-5760; fax: (86)3215-5753.

Email: fassisle@gmail.com

19 *Leptospira* sp., Samples were taken from 139 pigs from the cities of Timon and  
20 Teresina-PI-MA. Interstitial nephritis, vasculitis and fibrosis were the most frequent  
21 alterations. Immunohistochemistry leptospira antigen detected in 43% of pigs, where  
22 the antigen was present mainly in tubular epithelial cells, glomerular and interstitial.  
23 Immunostaining for the molecule CD4<sup>+</sup> cells was observed in glomerular and interstitial  
24 cells and tubular epithelial cells in larger amount in uninfected animals (p <0.005,  
25 Mann-Whitney). The presence of MHC II was also observed in tubular epithelial cells,  
26 interstitial cells, glomerular cells and Bowman's capsule, with a trend of marking in  
27 larger quantity in pigs uninfected, however, no significant difference in relation to  
28 infected pigs.

29 **Keywords:** Leptospirosis, Immunopathogeny, Immunohistochemistry.

## 30 **1. Introdução**

31 As leptospiroses são zoonoses de importância global, causadas por leptospirosas  
32 patogênicas que acometem os animais domésticos, silvestres e o homem. Assumem  
33 caráter epidêmico em determinadas regiões, principalmente nos países tropicais e em  
34 desenvolvimento (Bharti et al., 2003).

35 As lesões provocadas por *Leptospira* spp. são observadas, principalmente, nos  
36 rins onde chegam por via hematogênica e multiplicam-se provocando lesões túbulo-  
37 intersticiais. Dos rins, são transportadas pela urina para o meio ambiente, em condições  
38 viáveis, para infectar outros animais e o homem (Yang et al. 2001).

39 A ação das leptospirosas sobre o organismo do hospedeiro é mediada tanto pelo  
40 sistema imune inato (Daher et al., 2010) quanto adquirido (Chassin et al., 2009). Como

41 patógenos extracelulares a resposta imune adquirida depende da produção de anticorpos  
42 e ativação da via clássica do sistema complemento. Após infecção experimental em rato  
43 (*Rattus norvegicus*) ocorre disseminação da infecção para quase todos os tecidos em  
44 uma fase precoce, seguida de eliminação das leptospiras, provavelmente facilitada por  
45 imunoglobulinas anti-leptospiras circulantes (IgM e IgG) (Monahan et al., 2009). No  
46 entanto no rim a resposta imune é diferente dos demais órgãos, pois o rim é  
47 imunologicamente desprotegido, visto que imunoglobulinas anti-leptospiras presentes  
48 nos túbulos são inábeis para matar a bactéria, devido a ausência de ativação do sistema  
49 complemento (Stevenson et al., 2007; Monahan et al., 2009).

50       Complexo de histocompatibilidade principal tipo II (MHC II) é uma molécula  
51 transmembrana, necessária para apresentação de antígenos para células T CD4<sup>+</sup> (Davis;  
52 Bjorkman, 1988). A expressão constitutiva de MHC II já foi relatada em células  
53 dendríticas, macrófagos e células B (Daar et al., 1984). Essas células são capazes de  
54 endocitar antígenos estranhos e expressá-los no complexo MHC II que são exibidos na  
55 superfície celular. Em certas situações, as células epiteliais tubulares podem expressar  
56 MHC de classe II funcionando então como células apresentadoras de antígenos (APCs)  
57 não profissionais (Vilafranca et al., 1995; Abbate et al., 1998).

58       Células epiteliais tubulares renais (TECs) desempenham um papel central na  
59 reação inflamatória local, por meio da produção de citocinas e quimiocinas (Van  
60 Kooten et al., 1999) e como células apresentadoras de antígenos (APCs) não  
61 profissionais, podem regular a ativação local de células T (Kelley; Singer, 1993; Van  
62 Kooten et al., 2000). Alguns estudos têm demonstrado que as TECs podem induzir uma  
63 baixa resposta de células T, sugerindo um papel na manutenção de TECs na tolerância

64 periférica a auto-antígenos (Singer et al., 1993; Neilson, 1993). Essa ativação de células  
65 T resulta de sinais co-estimulatórios estimulantes e inibitórios. As moléculas co-  
66 estimulatórias B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86), são predominantemente expressas por  
67 APCs profissionais (células dendríticas e monócitos) e, também, podem ser expressas  
68 por células epiteliais tubulares (Singer, 1993; Yokoyama, 1994; Frasca, 1998).

69 A expressão de MHC II em células epiteliais tubulares em suínos infectados por  
70 leptospiras, já foi detectada em túbulos da região cortical, em áreas de nefrite  
71 intersticial, bem como em túbulos com alterações regenerativas, sugerindo que essa  
72 molécula desempenha um papel tanto na estimulação da reação inflamatória como na  
73 resposta imune sistêmica (Radaelli et al., 2009).

74 O presente estudo teve como objetivo identificar as moléculas T CD4<sup>+</sup> e MHC de  
75 classe II e avaliar o envolvimento das mesmas na lesão renal em suínos naturalmente  
76 infectados por leptospiras.

## 77 **2. Material e Métodos**

### 78 *2.1 Animais*

79 Foram colhidas amostras de sangue e fragmentos de rim de 139 suínos adultos,  
80 machos e fêmeas, abatidos nas cidades de Teresina-PI e Timon-MA.

### 81 *2.2 Colheita e processamento do material*

82 Amostras de sangue foram colhidas no momento da sangria dos animais e  
83 posteriormente foi obtido o soro, que foi armazenado a -20°C até o processamento. Em  
84 seguida foram colhidos fragmentos de rim de aproximadamente 0,5 cm de espessura,



85 fixados em formol neutro a 10%, tamponado com fosfato 0,01M pH 7,2 (formol  
86 tamponado) e em solução de Duboscq-Brasil por 60 minutos e posteriormente mantidos  
87 em formol tamponado até o processamento. Outros fragmentos de rim foram  
88 conservados em meio RPMI com glicerol a 10% para a realização da técnica de PCR.

89 Os fragmentos de rins foram processados seguindo técnicas de rotina do  
90 laboratório de histopatologia do Setor de patologia Animal da UFPI e os cortes corados  
91 com hematoxilina-eosina (H-E), ácido periódico de Schiff (PAS), tricrômico de Masson  
92 (Masson) e ácido periódico prata metanamine (PAMS).

### 93 *2.3 Detecção de aglutininas anti-Leptospiras*

94 A detecção de anticorpos anti-leptospiras foi realizada pela técnica de  
95 Soroaglutinação Microscópica (SAM) em laboratórios credenciados. O critério adotado  
96 para o soro ser considerado como reagente foi de 50% de Leptospiras aglutinadas por  
97 campo microscópico em aumento de 100 vezes. O sorovar registrado foi aquele que  
98 apresentou maior título, sendo as demais aglutinações consideradas reações cruzadas.

### 99 *2.4 Análise imunoistoquímica*

#### 100 *2.4.1 Detecção de antígeno de leptospiras, células T CD4<sup>+</sup> e MHC classe II*

101 Lâminas preparadas com adesivo Silane A174 (Pharmacia, USA) foram  
102 desparafinadas. Em seguida procedeu-se o bloqueio de peroxidase endógena e  
103 desmascaramento de antígeno em forno microondas em solução Tris HCl pH 1. As  
104 lâminas foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho anti-leptospira (produzido  
105 no Setor de Patologia Animal da Universidade Federal do Piauí) e com anticorpo  
106 monoclonal anti- CD4<sup>+</sup> (VMRD INC, PT90A) e anticorpo monoclonal anti-MHC II

107 (AbD Serotec, K274.3G8) de suíno. A amplificação da reação foi feita com o sistema  
108 “EnVision<sup>+</sup>”, peroxidase (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA, K4003), para  
109 detecção de antígeno de leptospira e com o sistema “EnVision<sup>+</sup>”, peroxidase (Dako  
110 Corporation, Carpinteria, CA, USA, K4001), para detecção de células T CD4<sup>+</sup> e MHC  
111 de classe II. A revelação das reações foi feita com solução de Diaminobenzidine/Plus,  
112 líquido, K047 (Diagnostic BioSystems, USA) e contracoloração com hematoxilina de  
113 Harrys (QEEL, SP).

114 Os parâmetros utilizados para definir as imunocolorações foram: intensidade da  
115 coloração, identificação do tipo de célula imunocorada, distribuição das células  
116 imunocoradas e localização, sendo que uma coloração leve foi considerada negativa.

### 117 *2.5 Análise morfológica*

118 Para análise quantitativa de células T CD4<sup>+</sup> e MHC de classe II, foram capturados  
119 30 campos aleatórios por corte de tecido renal de 11 e nove suínos infectados  
120 respectivamente, e cinco suínos não infectados, por meio de sistema de análise de  
121 imagem computadorizada (Leica Qwin D-1000, versão 4.1. do Setor de Patologia  
122 Animal/BIOLAI/UFPI).

123 A análise estatística foi realizada no programa SigmaStat 3.5 (Systat Software,  
124 Inc., EUA, 2006) utilizando-se os testes de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls,  
125 para comparação entre grupos e os testes de Mann-Whitney e teste T de Student, para  
126 comparação entre dois grupos. Adotou-se o nível de significância de  $p < 0,05$ .

127 Os achados histopatológicos, que classificou a natureza da lesão e a presença de  
128 antígeno de *Leptospira* sp. dos 21 suínos infectados e seis suínos não infectados

129 (controles), foram avaliados semi-quantitativamente em uma escala de 0 a 5, onde 0 =  
130 normal; 1 = mínima; 2 = média, 3 = moderada; 4 = moderadamente severa, e 5 = severa.

### 131 2.6 Detecção de DNA de *Leptospiras*

132 De tecido renal congelado, foi feita a extração e purificação de DNA utilizando-se  
133 o Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega), seguindo instruções do fabricante

134 Para amplificação do DNA de *Leptospira* spp. foram utilizados os  
135 oligonucleotídeos Lep-1 (5' GGCGGCGCGTCTTAAACATG 3') e Lep-2 (5'  
136 TTCCCCCATTTGAGCAAGATT 3') (Invitrogen<sup>®</sup>) desenhados por Mérien et al.  
137 (1992). O ciclo empregado foi o preconizado por Richtzenhain et al. (2002) .

138 O produto amplificado (331 pb para o gene 16S RNAr de *Leptospira* sp.) foi  
139 submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídio,  
140 utilizando-se tampão de corrida TBE 10 X (0,9 M Tris, 0,9 M ácido bórico e 0,02 M  
141 EDTA). Para visualização das bandas foi utilizado um transluminador ultravioleta (300-  
142 320 nm) e fotografado em sistema de fotodocumentação MiniBIS Pro (DNR Bio-  
143 imaging Systems Ltd., Jerusalem, Israel) do Setor de Patologia Animal da UFPI.

144 Como controle positivo para a leptospirose foi utilizado DNA extraído de cultura  
145 de *Leptospira interrogans*, sorovar Icterohaemorrhagiae. Como controle negativo foi  
146 utilizado a mistura dos reagentes usados na reação da PCR sem DNA molde,  
147 completando-se o volume com 5 µL de água ultrapura. Para controle interno da reação  
148 foi utilizado a mistura dos reagentes usados na reação, porém com os primers para β-  
149 actina.

## 150 3. Resultados

151 Do total de 139 amostras de soro analisadas pela prova de SAM, oito (5,7%)  
152 foram reagentes para os sorovares: Grippotyphosa, Hardjo OMS, Canícola, Pyrogenes e  
153 Icterohaemorrhagiae.

154 As alterações túbulo-intersticiais encontradas foram nefrite intersticial,  
155 caracterizada pela presença predominante de linfócitos e macrófagos (Figura 01), de  
156 distribuição focal, peritubular e perivascular, com intensidade variando de mínima a  
157 moderada. Observou-se também fibrose de intensidade mínima a média; vasculite;  
158 tumefação de endotélio vascular; degeneração de células epiteliais tubulares; atrofia de  
159 túbulos; congestão da região medular; tumefação do tufo glomerular e  
160 hiperplasticidade. Nos suínos controles, tais alterações não foram observadas.

161

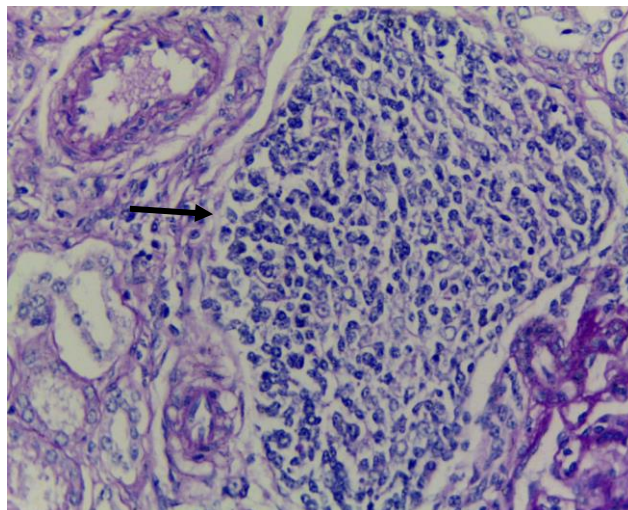
162

163

164

165

166



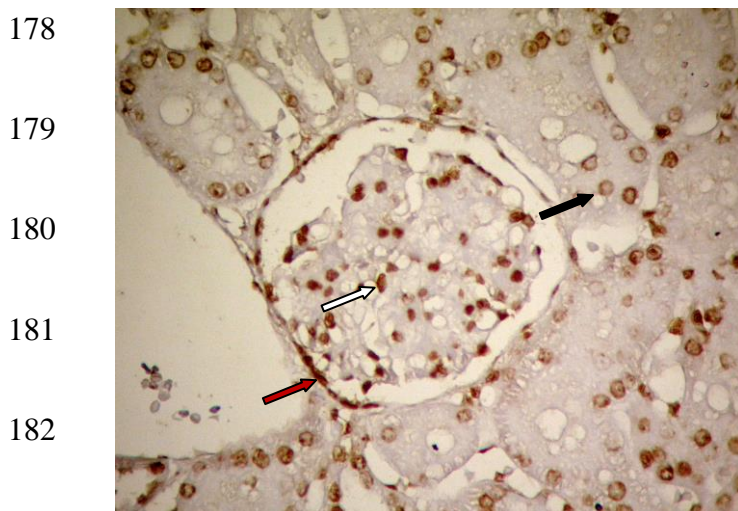
167

Figura 01. Rim. Suíno infectado naturalmente por *Leptospira* sp. Infiltrado inflamatório mononuclear (seta) na região cortical. Coloração: PAS. Obj: 40x.

168 A análise imunoistoquímica realizada detectou antígeno de leptospiras em 60  
169 (43%) dos 139 suínos. O antígeno se apresentava em um padrão celular, em células  
170 epiteliais tubulares, células glomerulares, células intersticiais (Figura 02), e como  
171 material particulado no interstício.

172 A avaliação semi-quantitativa da imunocoloração para antígeno de *Leptospira*  
 173 spp., nos diversos compartimentos renais de 23 suínos infectados, revelou que o  
 174 antígeno estava presente em maior quantidade nas células epiteliais tubulares, seguido  
 175 pelas células glomerulares, células intersticiais, células epiteliais parietais da cápsula de  
 176 Bowman e células inflamatórias (Figura 03).

177



183 Figura 02. Antígeno de *Leptospira* em células glomerulares (seta  
 184 branca), células epiteliais tubulares (seta preta), e células epiteliais  
 185 parietais da cápsula de Bowman (seta vermelha), em rim de suíno  
 186 naturalmente infectado por *Leptospira* sp. Coloração: Imunoperoxidase.  
 187 Obj: 40x.

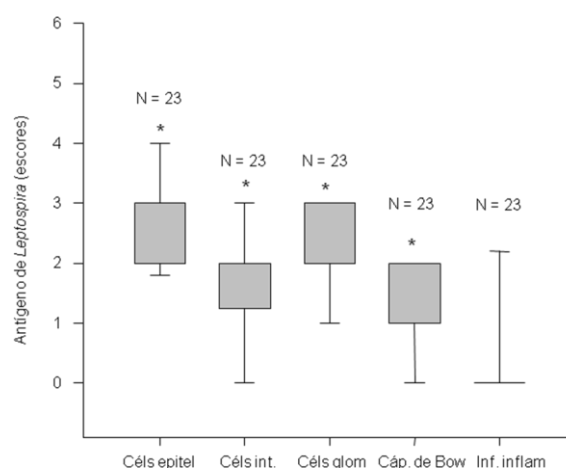


Figura 3. Análise semiquantitativa da presença de antígeno de *Leptospira* (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em tecido renal de suínos positivos na Imunoistoquímica. N = número de animais por grupo. \* $p < 0,05$  (Teste de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls Method).

185 A imunocoloração para a molécula  $CD4^+$  foi observada em células glomerulares  
 186 (células mesangiais) e em células intersticiais (Figura 04), tanto nos suínos infectados,  
 187 quanto nos não infectados. Em células epiteliais tubulares, também, foi observada  
 188 imunocoloração. A análise morfométrica revelou imunomarcação mais intensa nas  
 189 células epiteliais tubulares e nas células intersticiais nos animais não infectados em  
 190 relação aos infectados ( $p < 0,005$ , Teste de Mann-Whitney) (Figuras 05 e 06). No  
 191 glomérulo observou-se uma tendência numérica da presença de mais moléculas  $CD4^+$

192 nos suínos não infectados, mas não havia diferença significativa entre suínos infectados  
 193 e não infectados.

194

195

196

197

198

199

200

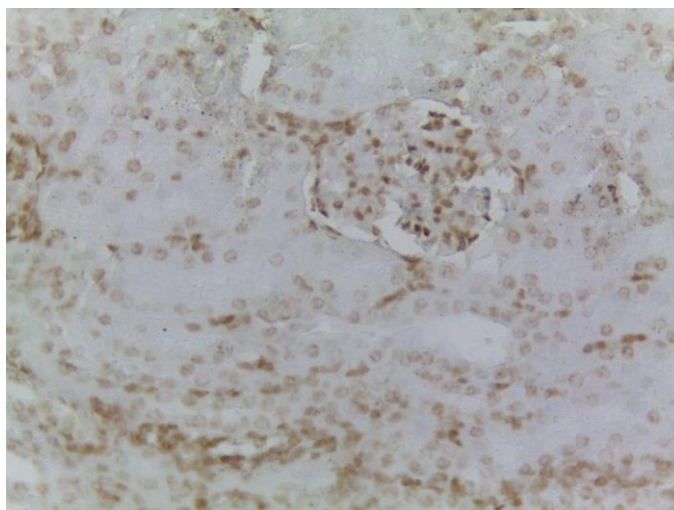


Figura 04. Imunocoloração de moléculas T CD4<sup>+</sup> em células epiteliais tubulares, células glomerulares (células mesangiais) e em células intersticiais, em rim de suíno naturalmente infectado por *Leptospira* sp. Coloração: Imunoperoxidase. Obj: 40x.

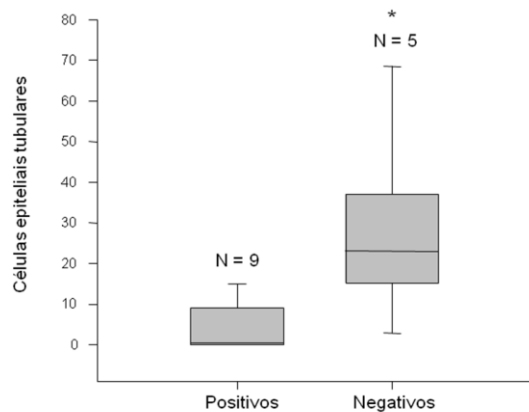


Figura 05. Análise quantitativa da marcação de moléculas de CD4<sup>+</sup> (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em suínos infectados e não infectados. N = N° de animais por grupo. \*p < 0,0,5 (Teste t de Student).

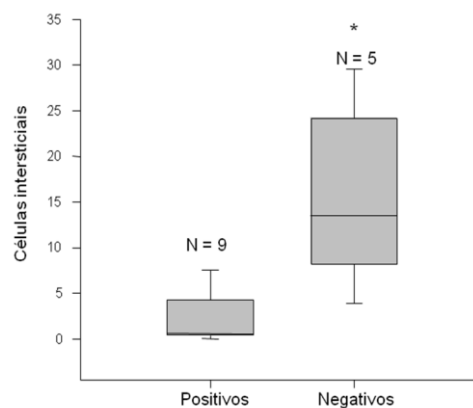


Figura 06. Análise quantitativa da marcação de moléculas de CD4<sup>+</sup> (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em suínos infectados e não infectados. N = N° de animais por grupo. \*p < 0,0,5 (Teste de Mann Whitney).

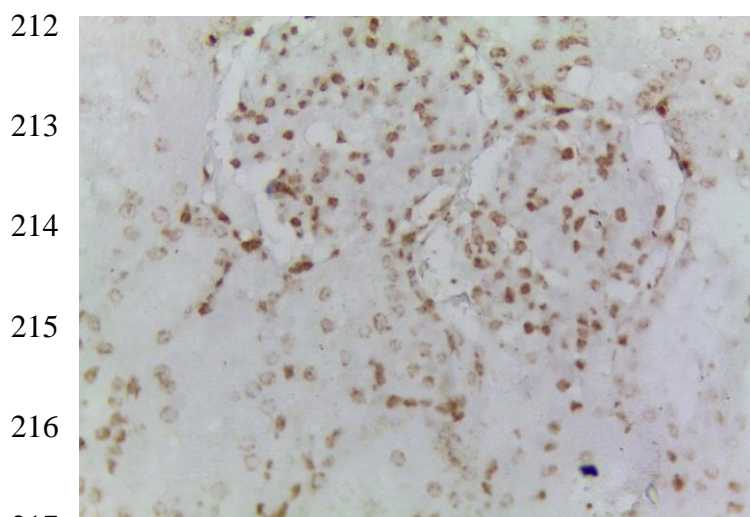
201

202

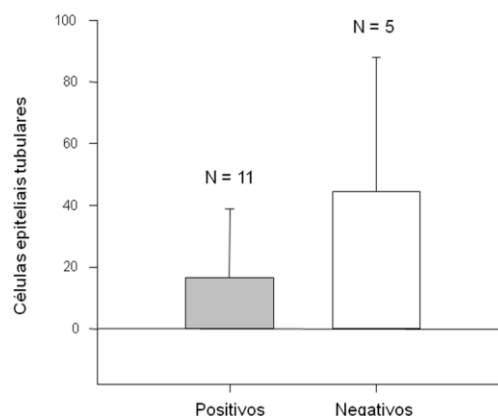
203

204 A presença de MHC de classe II foi observada em células epiteliais tubulares,  
205 células intersticiais, células glomerulares (mesangiais) e cápsula de Bowman (Figura  
206 07), com uma tendência de uma maior marcação de MHC II nos suínos não infectados  
207 (Figura 08), contudo sem diferença significativa em relação aos suínos infectados. Em  
208 alguns suínos infectados não foi observado imunomarcção de CD4<sup>+</sup> e MHC II<sup>+</sup>.

209 A técnica de PCR, realizada nas 139 amostras de tecido renal mostrou  
210 amplificação de DNA de leptospiros em sete (5%) suínos, sendo que três deles foram  
211 positivos na imunoistoquímica.



217 Figura 07. Marcação de MHC de classe II em células epiteliais tubulares,  
218 células glomerulares (células mesangiais), células intersticiais e cápsula de  
219 Bowman, em rim de suíno naturalmente infectado por *Leptospira* spp.  
220 Coloração: Immunoperoxidase. Obj: 40x.



221 Figura 08. Análise quantitativa da marcação de MHC de  
222 classe II (mediana de escores e intervalo entre percentis 25  
223 e 75) em suínos infectados e não infectados. N = N<sup>o</sup> de  
224 animais por grupo. p= 0.1037 (Teste t de Student).

219

#### 220 4. Discussão

221 Pela técnica de imunoistoquímica, foi possível a visualização de antígeno de  
222 *Leptospira* spp. nos rins de 60 suínos (43%) dos 139 analisados. Os altos níveis de  
223 positividade observados por meio da imunoistoquímica em relação a sorologia, foram

224 também relatados em outros estudos (Scanziani et al., 1991; Carvalho et al., 2011;  
225 Gonçalves et al., 2011). Não foi observada a presença da bactéria nos rins, mas antígeno  
226 e DNA de leptospiras estavam presentes. Estes resultados mostram que na fase crônica  
227 da infecção, a bactéria nem sempre pode ser encontrada, mas isso não exclui a condição  
228 de suínos portadores, com potencial para excretar leptospiras pela urina, visto que  
229 antígeno e DNA de leptospiras foram encontrados, como demonstrado neste estudo.

230 A grande quantidade de antígeno em células epiteliais tubulares demonstra maior  
231 concentração de leptospiras nessas células, indicando o local de ação primária da  
232 bactéria no tecido renal, como tem sido observado, também, em humanos, hamsters,  
233 bovinos, ovinos e suínos (Alves et al., 1989; Haanwinckel et al., 2004; Mineiro et al.,  
234 2011; Carvalho et al., 2011; Radaelli et al., 2009; Gonçalves et al., 2011). A presença  
235 de antígeno de *Leptospira* em vasos foi encontrada em intensidade mínima, o que difere  
236 de outros resultados, em que a presença de antígeno era mais intensa em vasos dilatados  
237 (Alves et al., 1989). Leptospiras intactas não foram visualizadas neste estudo, mas  
238 podem ser encontradas em túbulos renais, conforme tem sido observado (Nally et al.,  
239 2004).

240 A imunomarcção de moléculas T CD4<sup>+</sup> foi observada em células glomerulares  
241 (células mesangiais) e em células intersticiais, tanto nos animais infectados, quanto nos  
242 não infectados em intensidade mínima a moderada. As leptospiras, por serem patógenos  
243 extracelulares, são normalmente fagocitadas e apresentadas por moléculas no complexo  
244 MHC II para moléculas T CD4<sup>+</sup>. Células epiteliais tubulares, também, foram  
245 imunocoradas com o anticorpo usado para a marcação de moléculas T CD4<sup>+</sup>. É provável  
246 que esta imunocoloração esteja relacionada com a interação que pode ocorrer entre



247 células epiteliais tubulares e células T CD4<sup>+</sup>, quando as primeiras são estimuladas a  
248 expressar MHC II (Singer et al., 1993). Por outro lado, tem sido observado que  
249 receptores da família B7-CD28 são importantes reguladores da resposta imune,  
250 funcionando como co-estimuladores de ativação de células T, e são expressas tanto em  
251 células TCD4<sup>+</sup> (Mirza et al., 2010), que tem papel importante na indução de resposta  
252 inflamatória no rim, quanto em células epiteliais tubulares (Raij et al., 2005), o que  
253 constitui uma molécula comum a essas duas populações de células.

254 Ao contrário do que vem sendo observado em outros estudos (Raij et al., 2005), a  
255 detecção de células epiteliais tubulares ativadas e uma provável interação com células  
256 TCD4<sup>+</sup>, não estão associadas a intensificação da lesão inflamatória renal na leptospirose  
257 em suínos, pois estas moléculas foram expressas em maior intensidade nos suínos não  
258 infectados.

259 A marcação da molécula MHC II foi observada em células epiteliais tubulares,  
260 células intersticiais, células glomerulares, cápsula de Bowman, no endotélio vascular e  
261 células da parede arteriolar, tanto nos suínos infectados, quanto nos suínos não  
262 infectados. Radaelli et al. (2009), em uma pesquisa também feita em suínos,  
263 observaram a marcação de MHC de classe II em células epiteliais tubulares, intersticiais  
264 e em células do infiltrado inflamatório, nos suínos infectados, já os suínos não  
265 infectados MHC II não foi encontrado em células epiteliais tubulares, sendo observada  
266 uma marcação leve nas células estreladas intersticiais, no endotélio que revestem os  
267 vasos sanguíneos intersticiais e no endotélio de capilares glomerulares.

268 Os resultados do presente estudo mostram que houve discreta imunomarcagem de  
269 CD4<sup>+</sup> e MHC II e, em alguns casos, ausência de marcação nos suínos infectados, onde

270 havia presença de antígeno de leptospira, o que não foi observado nos suínos não  
271 infectados onde moléculas T CD4<sup>+</sup> e MHC II foram imunocoradas de forma mais  
272 acentuada, em intensidade e distribuição, muito embora sem diferença significativa para  
273 MHC II. Radaelli et al. (2009), também encontraram um resultado semelhante, onde a  
274 presença de MHC II no tecido renal criava uma condição desfavorável para colonização  
275 tubular e sua ausência estava relacionada à presença de leptospiras.

276 Contudo, a ausência de diferença significativa entre suínos infectados e não  
277 infectados, não deixa claro a participação da molécula MHC II na patogenia da lesão  
278 renal na leptospirose nos suínos do presente estudo. Por outro lado, parece que o papel  
279 das células epiteliais tubulares como apresentadoras de antígeno e a interação com  
280 moléculas T CD4<sup>+</sup> tem importância na mediação imune da lesão renal na leptospirose  
281 em suínos, sendo, entretanto, necessários novos estudos, que estão em andamento por  
282 nosso grupo, para o esclarecimento dessa questão.

283 A PCR revelou sete animais positivos para *Leptospira* sp. Esse resultado  
284 assemelha-se ao encontrado por Shimabukuro et al. (2003) que observaram somente  
285 uma amostra de tecido renal positiva na PCR, das 88 analisadas, sendo que 48 amostras  
286 eram de animais soropositivos. É provável que essa baixa detecção de DNA de  
287 leptospiras em rim de suínos naturalmente infectados seja decorrente da presença de  
288 substâncias inibidoras de amplificação presente nas amostras (Degraeve et al., 1994;  
289 Aviles et al., 1999). Este aspecto tem sido observado em amostras de sangue canino  
290 (Lachaud, et al., 2002). Por outro lado, Fearnley et al. (2008), detectaram 25 amostras  
291 renais positivas pela PCR, de um total de 204 sendo que, quatro eram de fetos e 21 eram

292 de suínos adultos. A PCR apesar de ser muito sensível, apresenta resultados bastante  
293 variáveis na detecção de DNA de leptospiras nos animais.

## 294 **5. Conclusões**

295 Esses resultados mostram que a técnica de imunoistoquímica identificou um  
296 número maior de suínos positivos para *Leptospira* sp. Células epiteliais tubulares e  
297 moléculas T CD4<sup>+</sup> estão envolvidas na mediação imune da lesão renal na leptospirose  
298 em suínos, no entanto, MHC II não apresenta um papel claro na patogenia desta lesão  
299 renal em suínos.

## 300 **Agradecimentos**

301 Os autores agradecem ao Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do  
302 Instituto Biológico de São Paulo; ao Laboratório de Zoonoses do Departamento de  
303 Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de  
304 Minas Gerais. E também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
305 Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

306

307

308

309

310

311

312

313

314 **Referências**

315

316 Abbate, M., Zoja, C., Corna, D., Capitanio, M., Bertani, T., Remuzzi, G., 1998. In

317 progressive nephropathies, overload of tubular cells with filtered proteins translates

318 glomerular permeability dysfunction into cellular signals of interstitial inflammation.

319 J. Am. Soc. Nephrol. 9, 1213–1224.

320 Alves, V.A.F., Siqueira, A.S., Pestana, C.B., 1989. Patologia da leptospirose. Análise

321 crítica dos aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos relevantes para a

322 compreensão da patogenia. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 49,75-80.

323 Aviles, H., Belli, A., Armijos, R., Monroy, F.P., Harris E., 1999. PCR detection and

324 identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison

325 with classical diagnostic methods. J. Parasitol. 85, 181-187.

326 Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A.,

327 Levett, P.N., Gilman, R.H., Willig, M.R., Gotuzzo, E., Vinetz, J.M., 2003.

328 Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis. 3, 757-

329 771.

330 Carvalho, S.M., Gonçalves, L.M.F., Macedo, N.A., Goto, H., Silva, S.M.M.S., Mineiro,

331 A.L.B.B., Kanashiro, E.H.Y., Costa, F.A.L., 2011. Infecção por leptospiras em

332 ovinos e caracterização da resposta inflamatória renal. Pesq. Vet. Bras. 31, 637-642.

333 Chassin, C., Picardeau, M., Goujon, J.M., Bourhy, P., Quellard, N., Darche, S., Badell,

334 E., D'andon, M.F., Winter, N., Lacroix-Lamande, S., Buzoni-Gatel, D., Vandewalle,

335 A., Werts C., 2009. TLR4- and TLR2 mediated B cell responses control the

336 clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. J. Immunol. 183, 2669–

337 2677.

- 338 Daar, A.S., Fuggle, S.V., Fabre, J.W., Ting, A., Morris, P.J., 1984. The detailed  
339 distribution of MHC Class II antigens in normal human organs. *Transplantation*. 38,  
340 293–298.
- 341 Daher, E.F. Abreu, K.L. S., Junior G.B.S., 2010. Leptospirosis-associated acute kidney  
342 injury., *J. Bras. Nefrol.* 32, 400-407.
- 343 Davis, M.M., Bjorkman, P.J., 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell  
344 recognition. *Nature*. 334, 395–402.
- 345 Degrave, W., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopes, U., 1994. Use of  
346 molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini-review.  
347 *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 89, 463-469.
- 348 Fearnley, C., Wakeley, Pr., Gallego-Beltran, J., Dalley, C., Williamson, S., Gaudie,  
349 C., Woodward, M.J., 2008. The development of a real-time PCR to detect pathogenic  
350 *Leptospira* species in kidney tissue. *Res Vet Sci*. 85, 8–16.
- 351 Frasca, L., Marelli-Berg, F., Imami, N., Potolicchio, I., Carmichael, P., Lombardi, G.,  
352 Lechler, R., 1998. Interferon-gamma-treated renal tubular epithelial cells induce  
353 allospecific tolerance. *Kidney Int.* 53, 679-689.
- 354 Gonçalves, L. M.F., Mineiro, A.L.B.B., Carvalho, S.M., Campos, A.P., Evangelista,  
355 L.S.M., Pinho, F.A., Moreira, E.C., Costa, F.A.L., 2011. Pesquisa de aglutininas,  
356 antígeno de leptospiros e apoptose em rim de suínos naturalmente infectados por  
357 *Leptospira* sp. *Pesq. Vet.* 31, 561-568.
- 358 Haanwinckel, M.C.S., Megid, J., Souza, L.C., 2004. Avaliação da prova de  
359 imunoperoxidase como recurso diagnóstico na leptospirose animal. *Arqs Inst.*  
360 *Biológico*. 71, 293-301.

- 361 Kelley, V.R., Singer, G.G., 1993. The antigen presentation function of renal tubular  
362 epithelial cells. *Exp Nephrol.* 1, 102–111.
- 363 Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Jacques, D., Dedet, J.P., Bastien,  
364 P., 2002. Comparasion of six PCR methods peripheral blood for detection of canine  
365 visceral leishmaniasis . *J. Clin. Microbiol.* 40, 210-215.
- 366 Mineiro, A.L.B.B., Vieira, R.J.,Costa, E.A., Santos, R.L., Gonçalves, L.M. F.,  
367 Carvalho, S.M., Bomfim, M.R. Q., Costa, F. A. L., 2011. Serology, polymerase  
368 chain reaction and histopathology for leptospirosis in samples collected at slaughter  
369 from dairy cows of Parnaíba region, state of Piauí, Brazil. *Pesqui. vet. Bras.* 31, 859-  
370 866.
- 371 Mirza, N., Duque, M.A., Dominguez, A.L., Schrum, A.G., Dong, H., Lustgarten, J.,  
372 2010. B7-H1 Expression on Old CD8+ T Cells Negatively Regulates the Activation  
373 of Immune Responses in Aged Animals. *The Journ. of Immun.* doi:10.4049.
- 374 Monahan, A.M., Callanan, J.J., Nally, J.E., 2009. Review Paper: Host Pathogen  
375 Interactions in the Kidney during Chronic Leptospirosis. *Vet. Pathol.* 46, 792-799.
- 376 Mérien, F. et al. 1992. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. In  
377 clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2219-2224.
- 378 Nally, J.E., Chantranuwat C., Wu, X.Y., Fishbein, M.C., Pereira M.M., Silva, J.J.P.,  
379 Blanco, D.R., Lovett, M.A., 2004. Alveolar Septal Deposition of Immunoglobulin  
380 and Complement Parallels Pulmonary Hemorrhage in a Guinea Pig Model of Severe  
381 Pulmonary Leptospirosis. *Am J Pathol.* 163, 1115–1127.
- 382 Neilson, E.G., 1993. Is immunologic tolerance of self modulated through antigen  
383 presentation by parenchymal epithelium? *Kidney Int.* 44, 927–931.

- 384 Radaelli, E., Del Piero, F., Aresu, L., Sciarrone, F., Vicari, N., Mattiello, S., Tagliabue,  
385 S., Fabbi, M., Scanzianiet, E., 2009. Expression of Major Histocompatibility  
386 Complex Class II Antigens in Porcine Leptospiral Nephritis. *Vet. Pathol.* 46, 800-  
387 806.
- 388 Haij, S., Woltman, A.M., Trouw, L. A., Bakker, A.C., Kamerling, Kooij, S.W.V.D.,  
389 Chen, L., Kroczek, R.A., Daha, M.R., Kooten, C.V. 2005. Renal tubular epithelial  
390 cells modulate T-cell responses via ICOS-L and B7-H1. *Kidney Internat.* 68 , 2091–  
391 2102.
- 392 Richtzenhain, L.J., Cortez, A., Heinemann, M.B., Soares, R.M., Sakamoto, S.M.,  
393 Vasconcellos, S.A., Higa, Z.M., Scarcelli, E., Genovez, M.E., 2002. A multiplex  
394 PCR for the detection of *Brucella* spp. And *Leptospira* spp. DNA from aborted  
395 bovine fetuses. *Vet. Microbiol.* 87, 139–147.
- 396 Scanziani, M., Luini, M., Fabbi, P., Pizzocaro C.N.Z., 1991. Comparison between  
397 specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of  
398 renal leptospirosis of pigs. *Res. Vet. Sci.* 50, 229-232.
- 399 Shimabukuro, F.H., Domingues, P.F., Langoni, H., Silva, A.V., Pinheiro, J.P.,  
400 Padovani, C.R., 2003. Pesquisa de suínos portadores renais de leptospiroses pelo  
401 isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras da rins de  
402 animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose. *Braz. J. Vet. Res.*  
403 *Anim. Sci.* 40, 243-253.
- 404 Singer, G.G., Yokoyama, H., Bloom, R.D., Jevnikar, A.M., Nabavi, N., Kelly, V.R.,  
405 1993. Stimulated renal tubular epithelial cells induce anergy in CD4+ T cells.  
406 *Kidney Int.* 44, 1030-1035.

- 407 Stevenson, B., Choy, H.A., Pinne, M., Rotondi, M.L., Miller, M.C., Demoll E., Kraiczyn  
408 P., Cooley, A.E., Creamer, T.P., Suchard, M.A., Brissette, C.A., Verma, A., Haake,  
409 D.A., 2007. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind  
410 host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS ONE*. 2, 11pp.
- 411 Van Kooten, C., Daha, M.R., Van Es, L.A., 1999. Tubular epithelial cells: A critical cell  
412 type in the regulation of renal inflammatory processes. *Exp Nephrol*. 7, 429–437.
- 413 Van Kooten, C., Woltman, A.M., Daha, M.R., 2000. Immunological function of tubular  
414 epithelial cells: The functional implications of CD40 expression. *Exp Nephrol*. 8,  
415 203–207.
- 416 Vilafranca, M., Wohlsein, P., Trautwein, G., 1995. Expression of class II major  
417 histocompatibility complex molecules in renal tubular epithelial cells of canine  
418 kidneys affected with tubulointerstitial nephritis. *Res. Vet. Sci*. 59, 114–117.
- 419 Yang, C.W., Wu, M.S., Pan, M.J., 2001. Leptospirosis renal disease. *Nephrol. Dial.*  
420 *Transplant*. 16, 73-77.
- 421 Yokoyama, H., Zheng, X., Strom, T.B., Rubin-Kelley, V.E., 1994. B7<sup>+</sup> transfectant  
422 tubular epithelial cells induce T cell anergy, ignorance or proliferation. *Kidney Int*.  
423 45, 1105–1112.
- 424
- 425



## O papel de imunoglobulinas na nefropatia da leptospirose em suínos

Larissa Maria Feitosa GONÇALVES (1), Ângela Piauilino CAMPOS (1), Micherlene da Silva CARNEIRO (2), Elis Rosélia Dutra de Freitas Siqueira SILVA (2), Sônia Maria de CARVALHO (3), Francisco Assis Lima COSTA\* (4)

### ABSTRACT

Leptospirosis is a anthropozoonosis endemic worldwide, affecting humans and several species of domestic and wild animals. At the beginning of infection is the production of IgM to control the infection and after a few days, IgG is produced and cause lysis of circulating leptospires. The objective of this study was to identify deposits of immunoglobulins and antigens of leptospires in kidney tissue, to assess the role of immunoglobulins in the pathogenesis of leptospirosis nephropathy in pigs. We collected 139 blood samples and kidney of pigs from the cities of Timon-MA and Teresina-PI, to be evaluated by SAM, immunohistochemistry and PCR. Interstitial nephritis, fibrosis, vasculitis; swollen glomeruli hypercellularity and diffuse in a pig were main pathological changes found. Immunohistochemistry leptospira antigen detected in 60 pigs. Deposits of IgG, IgM and IgA were observed in the endothelium of glomerular capillaries, the capillaries intertubulares and the Bowman's capsule, marked focal, diffuse, global and segmental. The deposition of IgM and IgA was significantly higher in infected pigs, strangely deposits of IgG was significantly higher in non-infected pigs, where there was no presence of antigen leptospires nor tubulointerstitial injury. We conclude that *Leptospira* antigen in porcine kidney relates to deposits of IgM and IgA but not IgG deposits.

**Keywords:** Leptospirosis; Immunoglobulins; Pig.

---

<sup>1</sup> (1) Doutoranda em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Setor de Patologia Animal, Teresina, PI, Brasil.

(2) Mestranda em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Setor de Patologia Animal, Teresina, PI, Brasil.

(3) Médica Veterinária da Agência Estadual de Defesa Agropecuária do MA.

(4) Professor Associado, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Setor de Patologia Animal, Teresina, PI, Brasil.

\*Autor para correspondência: Universidade Federal do Piauí, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Setor de Patologia Animal, Campos da Socopo, S/N, Teresina-PI. Tel: (86) 3215-5760. Email: fassisle@gmail.com

## INTRODUÇÃO

As leptospiroses são antropozoonoses endêmicas em todo o mundo, causadas por espécies patogênicas de *Leptospira* sp. São consideradas doenças emergentes que afetam o homem e várias espécies de animais domésticos e silvestres<sup>17</sup>.

O mecanismo de lesão provocado pelas leptospiras nos hospedeiros é complexo e pouco compreendido. Os estudos apontam para ação direta da bactéria sobre células do hospedeiro com produção de toxinas e enzimas proteolíticas e consequente lesão tecidual<sup>9,8</sup>. Essa ação está relacionada à inibição da expressão de genes que codificam proteínas do citoesqueleto de células endoteliais e da matriz extracelular, proporcionando uma maior motilidade e disseminação das leptospiras no organismo<sup>15</sup>.

Por outro lado, tanto o sistema imune inato<sup>8</sup> quanto o adquirido<sup>4</sup> participam da defesa contra a ação das leptospiras sobre o organismo do hospedeiro. A lipoproteína LipL32 é a mais importante proteína de membrana externa (OMPs) que afeta diretamente as células dos túbulos proximais, aumentando consideravelmente a expressão de genes e de proteínas pró-inflamatórias, tais como óxido nítrico sintase induzível (iNOS), proteína 1 quimiotática para monócitos (CCL2/MCP-1), RANTES (CCL5/Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). A estimulação de iNOS e CCL2-MCP-1 pelo LipL32, depende da presença de receptores Toll-like (TLRs) em células dos túbulos proximais, principalmente o TLR2 e TLR4<sup>8</sup>.

Por atuarem como patógenos extracelulares, as leptospiras incitam uma resposta imune adquirida dependente da produção de anticorpos e da ativação da via clássica do sistema do complemento, sendo que, a maioria dos anticorpos, são produzidos contra o LPS (lipopolissacarídeo). Estudos evidenciam que a fagocitose de leptospiras por neutrófilos e macrófagos só acontece após a opsonização por imunoglobulina G (IgG) específica<sup>3,26</sup>.

A resposta imune humoral é o principal mecanismo de defesa contra a leptospirose. No início da infecção são produzidas imunoglobulinas do tipo IgM para o controle da infecção. Após alguns dias, imunoglobulinas do tipo IgG são produzidas e provocam lise das leptospiras circulantes. Os anticorpos aderem ao lipopolissacarídeo da bactéria num processo de opsonização, preparando-os para serem fagocitados por

macrófagos, o que resulta na diminuição dos sinais clínicos. No entanto, a bactéria permanece nos rins, sendo excretada na urina por vários meses após a infecção<sup>5,20</sup>. Nesse tipo de resposta imune, há uma maior participação de IgG e IgM, seja após infecção natural ou imunização, no entanto no homem observa-se uma maior produção de imunoglobulinas da classe IgM<sup>2,23</sup>.

Complexos imunes circulantes podem estar correlacionados com a severidade dos sintomas. Sugere-se que o aumento na severidade da doença de Weil, possa ser resultante de uma resposta imune humoral intensa, já que falência renal, trombocitopenia e alterações pulmonares aparecem na fase imune da doença<sup>11,1</sup>. Em um estudo experimental realizado com cobaias, foi observado grande quantidade de antígeno de leptospira, na fase tardia da infecção, localizado principalmente no interstício renal, enquanto os depósitos de imunoglobulinas G (IgG) e complemento 3 (C3) foram visualizados em glomérulos e nas paredes de pequenos vasos sanguíneos<sup>27</sup>, sugerindo que as lesões renais observadas na leptospirose possam ser mediadas por complexo imune<sup>22</sup>.

O presente estudo teve como objetivo identificar depósitos de antígeno de leptospirosas e imunoglobulinas no tecido renal, para avaliar o papel de imunoglobulinas na patogênese da nefropatia da leptospirose em suínos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O material constou de amostras de sangue e fragmentos de rim de 139 suínos adultos, provenientes das cidades de Teresina-PI e Timon-MA.

Amostras de sangue foram colhidas no momento da sangria do animal e o soro foi armazenado a -20°C até o processamento. Após o abate dos animais, foram colhidos fragmentos de rim, fixados em formol neutro a 10% tamponado com fosfato 0,01M pH 7,2 (formol tamponado), em solução de Duboscq-Brasil e conservados em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) com glicerol a 10%.

A detecção de anticorpos anti-leptospirosas foi realizada pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) em laboratórios credenciados. O critério adotado para o soro ser considerado como reagente foi de 50% de Leptospirosas aglutinadas por

campo microscópico em aumento de 100 vezes. O sorovar registrado foi aquele que apresentou maior título, sendo as demais aglutinações consideradas reações cruzadas.

Para o estudo das alterações histopatológicas foram utilizados fragmentos de rins, de 15 suínos infectados e de seis suínos não infectados nos testes de SAM, imunoistoquímica (IMH) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). O material foi processado em histotécnico, posteriormente incluídos em parafina e cortados em micrótomo com 4-5 µm de espessura. Os cortes foram montados em lâminas e corados com Hematoxilina-Eosina (H-E), ácido periódico de Schiff (PAS), tricrômico de Masson (Masson), ácido periódico prata metanamine (PAMS) e imunoperoxidase indireta.

Cortes de tecido renal foram preparados em lâminas com adesivo Silane A174 (Pharmacia, USA) para imunoistoquímica. Após desparafinização procedeu-se o bloqueio de peroxidase endógena, seguido do desmascaramento de antígeno em forno microondas em solução Tris HCl pH 1. Em seguida as amostras foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho anti-leptospira (produzido no Setor de Patologia Animal da Universidade Federal do Piauí - UFPI) e com anticorpo monoclonal anti-IgM (NB716), anti-IgG (NB738) e anti-IgA (NB725) de suíno (NOVUS BIOLOGICALS, LLC). A amplificação da reação foi feita com o sistema “EnVision<sup>+</sup>”, peroxidase (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA, K4003), para detecção de antígeno de leptospira e com o sistema Estreptavidina-peroxidase (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA, Código P0397), para detecção das imunoglobulinas. A revelação das reações foi feita com solução de Diaminobenzidina/Plus, líquido, K047 (Diagnostic BioSystems, USA) e contracoloração com hematoxilina de Harrys (QEEL, SP).

Os parâmetros utilizados para definir a marcação de imunoistoquímica, tanto para antígeno de leptospira, quanto para depósitos de imunoglobulinas, foram a intensidade da coloração, identificação do tipo de célula imunocorada, distribuição e localização das células e depósitos imunocoradas, sendo que uma coloração leve foi considerada negativa.

Do tecido renal congelado foi feita a extração e purificação de DNA utilizando-se o Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega), seguindo instruções do fabricante.

Para amplificação do DNA de *Leptospira* spp. foram utilizados os oligonucleotídeos Lep-1 (5' GGCGGCGCGTCTTAAACATG 3') e Lep-2 (5' TTCCCCCATTTGAGCAAGATT 3')<sup>18</sup> (Invitrogen®). O ciclo empregado foi o preconizado por Richtzenhain<sup>24</sup>.

O produto amplificado (331 pb para o gene 16S RNAr de *Leptospira* sp.) foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídio, utilizando-se tampão de corrida TBE 10 X (0,9 M Tris, 0,9 M ácido bórico e 0,02 M EDTA). Para visualização das bandas foi utilizado um transluminador ultravioleta (300-320 nm) e fotografado em sistema de fotodocumentação MiniBIS Pro (DNR Bio-imaging Systems Ltd., Jerusalem, Israel) do Setor de Patologia Animal da UFPI.

Como controle positivo para a leptospirose foi utilizado DNA extraído de cultura de *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae. Como controle negativo da PCR foi utilizado a mistura dos reagentes usados na reação da PCR sem DNA molde, completando-se o volume com 5 µL de água ultrapura. Para controle interno da reação foi utilizado a mistura dos reagentes usados na reação, porém com os primers para β-actina.

A análise dos dados foi realizada por testes estatísticos não paramétricos: Método de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls, para comparação entre grupos e o teste de Mann-Whitney, para comparação entre dois grupos. Adotou-se o nível de significância de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Das 139 amostras de soro analisadas pela prova de SAM, oito (5,7%) foram reagentes para os sorovares: Grippotyphosa, Hardjo OMS, Canícola, Pyrogenes e Icterohaemorrhagiae.

As alterações túbulo-intersticiais encontradas foram nefrite intersticial, caracterizada pela presença predominante de linfócitos e macrófagos (Figura 01), de distribuição focal, peritubular e perivascular, com intensidade variando de mínima a moderada. Observou-se também fibrose de intensidade mínima a média, vasculite, tumefação de endotélio vascular, degeneração de células epiteliais tubulares, atrofia de túbulos, congestão da região medular, tumefação do tufo glomerular e hiperplasia difusa em um suíno. Nos suínos não infectados, tais alterações não foram observadas.

A técnica de imunoperoxidase demonstrou antígeno de leptospira em 60 suínos dos 139 analisados. A avaliação semi-quantitativa realizada em 23 suínos, revelou que o antígeno estava presente em maior quantidade nas células epiteliais tubulares, seguido pelas células glomerulares, células intersticiais, células epiteliais parietais da cápsula de Bowman e células inflamatórias (Figura 02) ( $p < 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis).

Depósitos de IgG, em um padrão granular, foi observado no endotélio de capilares glomerulares, como marcação focal, global e segmentar, na cápsula de Bowman, no endotélio dos capilares intertubulares (Figura 03). IgM foi observada no endotélio de capilares glomerulares, em um padrão granular, apresentando uma marcação difusa e global, e no endotélio dos capilares intertubulares (Figura 04). A imunocoloração para IgA foi observada no endotélio de capilares glomerulares, em um padrão granular, com marcação focal, global e segmentar; na cápsula de Bowman, no endotélio dos capilares intertubulares e em células epiteliais tubulares (Figura 05).

IgM e IgA em glomérulo estavam presentes em quantidade maior nos suínos infectados em comparação aos não infectados, sendo que para IgM, houve diferença significativa também em capilares intertubulares (Figuras 06 e 07) ( $p < 0,05$ ; Teste Mann Whitney), no entanto, a marcação de IgG em glomérulo nos suínos não infectados foi maior que nos infectados (Figura 08) ( $p < 0,05$ ; Teste Mann Whitney).

A técnica de PCR mostrou amplificação de DNA de leptospiras em sete (5%) das 139 amostras de tecido renal analisadas.

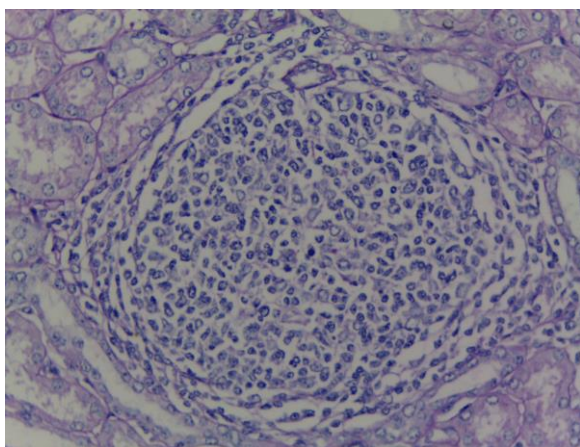


Figura 01. Rim. Suíno infectado naturalmente por *Leptospira* spp.. Infiltrado inflamatório mononuclear na região cortical. Coloração: PAS. Ob: 40x.

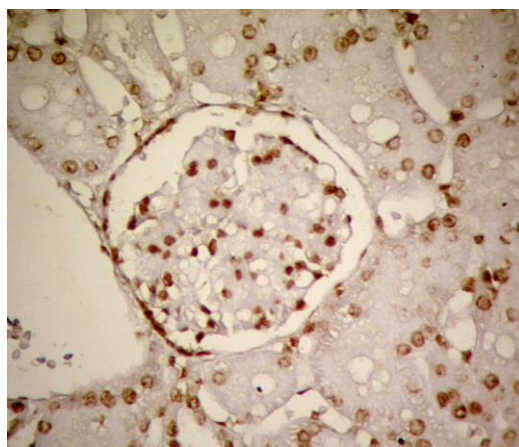


Figura 02. Antígeno de *Leptospira* em células glomerulares, células epiteliais tubulares e células epiteliais parietais da cápsula de Bowman, em rim de suíno naturalmente infectado por *Leptospira* sp. Coloração: Imunoperoxidase. Ob: 40x.



Figura 03. IgG no glomérulo de suíno naturalmente infectado por *Leptospira* spp. Coloração: Imunoperoxidase. Ob: 40x.

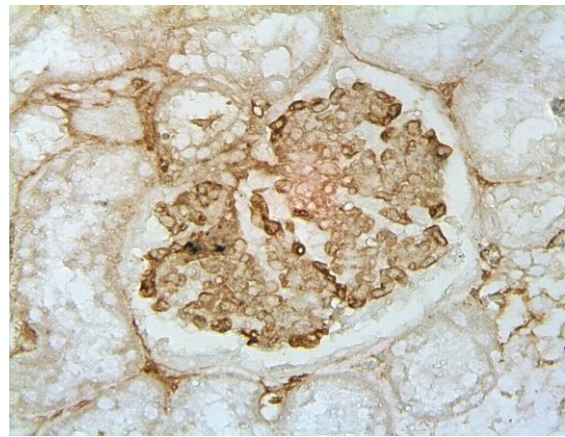


Figura 04. IgM no glomérulo de suíno naturalmente infectado por *Leptospira* spp. Coloração: Imunoperoxidase. Ob: 40x.

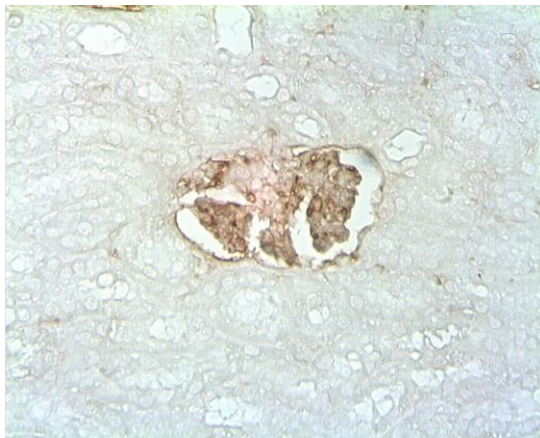


Figura 05. IgA no glomérulo de suíno naturalmente infectado por *Leptospira* spp. Coloração: Imunoperoxidase. Ob: 40x.

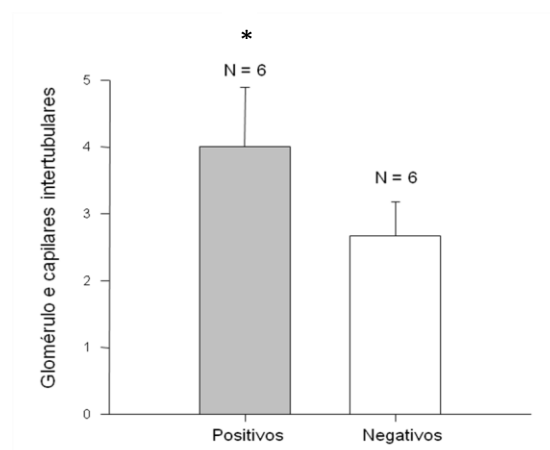


Figura 06. Análise semiquantitativa da marcação de IgM (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em suínos infectados e não infectados. N = Nº de animais por grupo. \*p < 0,05 (Teste de Mann Whitney).

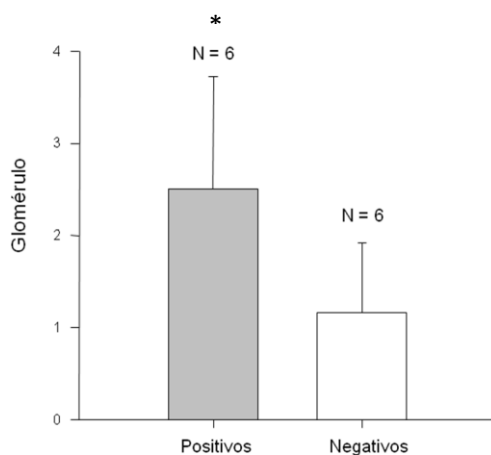


Figura 7. Análise semiquantitativa da marcação de IgA (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em suínos infectados e não infectados. N = Nº de animais por grupo. \*p < 0,05 (Teste de Mann Whitney).

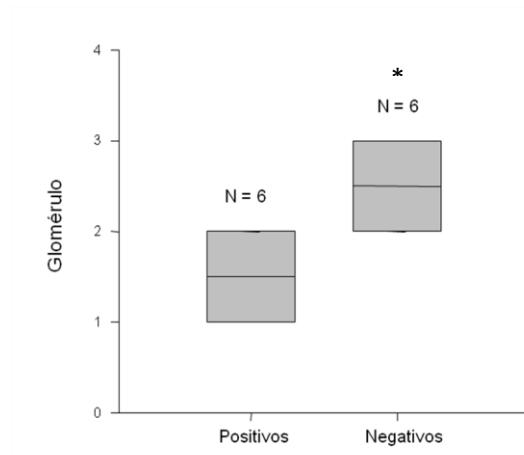


Figura 8. Análise semiquantitativa da marcação de IgG (mediana de escores e intervalo entre percentis 25 e 75) em suínos infectados e não infectados. N = Nº de animais por grupo. \*p < 0,05 (Teste de Mann Whitney).

O diagnóstico de leptospirose é complexo, pois dos três métodos utilizados apenas a IMH detectou antígeno onde a sorologia também detectou infecção, mas a recíproca não é verdadeira, pois foram detectados antígenos de leptospiras por IMH onde não foi encontrado sorovar infectante, e a sorologia e IMH detectaram infecção onde a PCR não detectou (Tabela 1). A comparação dos três testes utilizados para o diagnóstico de infecção por leptospiras, revelou que a imunistoquímica apresentou sensibilidade de 53,6% e 53,1% comparada à sorologia (SAM) e reação em cadeia pela polimerase (PCR), respectivamente, e especificidade de 100%.

**Tabela 01**

Resultados da sorologia, da análise semi-quantitativa de antígeno de *Leptospira* spp., IgG, IgM e de IgA, por imunoperoxidase, em rim de suínos naturalmente infectados.  
Imunoperoxidase

Animais	SAM	Sorovar	IMH	IgG	IgM	IgA	PCR
<i>Infectados</i>							
02	-	-	-	+	4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	+
06	-	-	-	2 <sup>b</sup>	+	3 <sup>a</sup>	+
53	-	-	-	2 <sup>b</sup>	+	5 <sup>a</sup>	+
80	-	-	+	1 <sup>b</sup>	+	+	+
87	-	-	+	+	+	+	+
89	-	-	+	+	+	+	+
110	-	-	-	1 <sup>b</sup>	5 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	+
111	+	Icterohaemorrhagiae	+	+	3 <sup>a</sup>	+	-
115	+	Grippotyphosa	+	+	+	+	-
121	+	Grippotyphosa	+	+	+	3 <sup>a</sup>	-
123	+	Grippotyphosa	+	+	4 <sup>a</sup>	+	-
131	-	-	+	+	5 <sup>a</sup>	+	-
138	-	-	+	2 <sup>b</sup>	+	+	-
142	+	Pyrogenes	+	1 <sup>b</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	-
143	+	Canícola	+	+	+	+	-
<i>Não infectados</i>							
03	-	-	-	2 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	-
17	-	-	-	3 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	-
42	-	-	-	2 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	-
56	-	-	-	3 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	-
98	-	-	-	2 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	-
116	-	-	-	3 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	-

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa. \*p<0,05. Teste de Mann Whitney.



## DISCUSSÃO

As principais alterações histopatológicas encontradas nos suínos infectados foram nefrite intersticial linfocitocitária, focal, peritubular e perivascular, fibrose, vasculite, tumefação de endotélio vascular, degeneração de células epiteliais tubulares, atrofia de túbulos, tumefação do tufo glomerular e hiper celularidade glomerular difusa em um suíno. Essas alterações variavam em intensidade mínima a moderada. Em outro trabalho verificou-se pouco infiltrado inflamatório peritubular, sendo que os achados mais freqüentes foram necrose de células tubulares, com algumas apoptóticas, e aumento de mitoses, como indicativo de regeneração tubular, sem alteração glomerular<sup>21</sup>. Outro estudo em camundongos infectados experimentalmente, revelou hiper celularidade glomerular, infiltrado mononuclear focal, perivascular e periglomerular, espessamento de membrana basal glomerular e degeneração de túbulos da cortical<sup>14</sup>. A lesão túbulo intersticial encontrada nos suínos deste estudo e relatada, também, em outras pesquisas, é a lesão típica provocada pelas leptospi ras<sup>16</sup>, à exceção da lesão glomerular que não é descrita com muita frequência<sup>14,12</sup>.

A causa das alterações renais observadas ainda não é bem conhecida, mas estão relacionadas com a presença de antígeno de leptospira, que estava localizado em células epiteliais tubulares, células glomerulares, células intersticiais, cápsula de Bowman e em menor quantidade nas células do infiltrado inflamatório. Não foi encontrada a bactéria nos rins, mas antígeno e DNA de leptospi ras foram detectados. Em modelos experimentais de cobaias e Hamster as leptospi ras tem sido observada na membrana basal glomerular, entre as células tubulares, no lúmen de túbulos, no interstício e, em alguns casos, dentro de glomérulos<sup>13,21</sup>.

Depósitos de imunoglobulinas em glomérulos, pode ser decorrente da formação de complexo imune circulante<sup>22</sup>, ou de uma reação cruzada com proteínas da membrana basal glomerular em casos de glomerulonefrite anti-membrana basal glomerular, como tem sido observado no homem<sup>6</sup>. O primeiro caso parece improvável, pois, apesar de alguns estudos apontarem para esse mecanismo<sup>22</sup>, sabe-se que a sobrevivência de leptospi ras nos rins decorre da falta de ativação do sistema complemento<sup>18</sup> e essa ausência do complemento não favorece a formação de complexo imune. No segundo caso, mais provável, ainda não conhecemos a ação de anticorpos anti-membrana basal glomerular nos animais, à exceção do cão em casos de nefropatia hereditária<sup>25</sup>, de modo

que esse aspecto não pode ser esclarecido neste trabalho. Por outro lado, depósitos de IgM, IgA, IgG e C3 tem sido observado no alvéolo pulmonar do homem e em coabaias infectadas experimentalmente com leptospiras, como parte da síndrome de Goodpasture<sup>6</sup>, sugerindo que esse mesmo processo possa ocorrer também nos rins<sup>21,7</sup>.

De um modo em geral depósitos de imunoglobulinas estavam presentes tanto nos suínos infectados quanto nos não infectados. Alguns estudos têm demonstrado que ainda não está claro se depósitos de imunoglobulinas nos rins possam estar relacionados com a lesão renal<sup>10</sup>. Contudo, a deposição de IgM e IgA foi significativamente maior nos suínos infectados, onde antígeno de leptospiras e lesão túbulo-intersticial estavam presentes, comparado aos não infectados, o que aponta para a importância dessas imunoglobulinas na patogênese da lesão renal. Estranhamente depósitos de IgG foram significativamente maiores nos suínos não infectados, onde não havia presença de antígeno de leptospiras e nem lesão túbulo-intersticial, sugerindo um mecanismo de proteção e não de injúria renal, pois na ausência e baixa expressão de IgG, antígeno de leptospiras estavam presentes.

Concluimos que antígeno de leptospiras no rim de suínos está relacionado a depósitos de IgM e IgA mas não a depósitos de IgG.

## RESUMO

A leptospirose é uma antropozoonose endêmica em todo o mundo, que afeta o homem e várias espécies de animais domésticos e silvestres. No início da infecção há produção de IgM para o controle da infecção e após alguns dias, IgG são produzidas e provocam lise das leptospiras circulantes. Objetivou-se neste estudo identificar depósitos de antígeno de leptospiras e imunoglobulinas no tecido renal, para avaliar o papel de imunoglobulinas na patogênese da nefropatia da leptospirose em suínos. Foram colhidas 139 amostras de sangue e rim de suínos das cidades de Teresina-PI e Timon-MA, que foram avaliadas pela SAM, imunoistoquímica e PCR. Nefrite intersticial, fibrose, vasculite, tumefação do tufo glomerular e hiperplasia difusa foram as principais alterações histopatológicas encontradas. A imunoistoquímica detectou antígeno de leptospira em 60 suínos. Depósitos de IgG, IgM e IgA foram observados no endotélio de capilares glomerulares, dos capilares intertubulares e na cápsula de

Bowman, com marcação focal, difusa, global e segmentar. A deposição de IgM e IgA foi significativamente maior nos suínos infectados. Estranhamente depósitos de IgG foi significativamente maior nos suínos não infectados, onde não havia presença de antígeno de leptospiros e nem lesão túbulo-intersticial. Concluímos que antígeno de leptospiros no rim de suínos está relacionado a depósitos de IgM e IgA mas não a depósitos de IgG.

### AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico de São Paulo; ao Laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais; ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Setor de Patologia Animal da Universidade Federal do Piauí do Centro de Ciências Agrárias. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### REFERÊNCIAS

1. Abdulkader RC. et al. Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. Rev Inst Med Trop. São Paulo.2002; 44:79-83.
2. Adler B, Murphy KH, Locarnini SA, Faine S. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulin M and immunoglobulin G in human serum by solid phase enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol. 1980; 11: 452-457.
3. Banfi E, Cinco M, Bellini M, Soranzo MR. The role of antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospires. J Gen Microbiol 1982;128:813-6.
4. Chassin C et al. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. J Immunol. 2009; 183: 2669-77.
5. Costa AV, Silvio IC, Miranda-Filho G, Silva VV, Caldas EM, Brito E, Sampaio MB. Estado imunológico na leptospirose. Rev Inst Adolfo Lutz.1981;41:93-100.
6. Craig SB, Graham GC, Burns MA, Dohnt MF, Wilson RJ, Smythe LD, Jansen CC, Mckay DB. Leptospirosis and Goodpasture's syndrome: testing the aetiological hypothesis. Annals of Tropical Medicine & Parasitology 2009; 103:647-651.

7. Croda J, Neto AD, Brasil RA, Pagliari C, Nicodemo AC, Duarte MIS. Leptospirosis pulmonary haemorrhage syndrome is associated with linear deposition of immunoglobulin and complement on the alveolar surface. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16:6.
8. Daher EF et al. Leptospirosis-associated acute kidney injury. *J Bras Nefrol*. 2010; 32: 400-407.
9. Faine S, Alder B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira and leptospirosis*. 2.ed. Melbourne: Australia, MediSci, 272p. 1999.
10. Fraga, T.R., Barbosa, A.S., Isaac, L., 2011. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion From the Complement System. *Scand J Immunol*. 73, 408–419.
11. Galli M et al. Immune complexes in leptospirosis. *Infection*. 1985;13:156.
12. Gonçalves LMF, Mineiro ALBB, Carvalho SM, Campos ÂP, Melo Evangelista LS, Pinho FA, Moreira ÉC, Costa FAL. Pesquisa de aglutininas, antígeno de leptospiras e apoptose em rim de suínos naturalmente infectados por *Leptospira* sp. *Pesq Vet*. 2011;31:561-568.
13. Haanwinckel MCS, Megid J, Souza LC. Avaliação da prova de imunoperoxidase como recurso diagnóstico na leptospirose animal. *Arqs Inst Biológico*. 2004;71:293-301.
14. Marinho M. Leptospirose: fatores epidemiológicos, fisiopatológicos e imunopatogênicos. *Vet e Zootec*. 2008; 15: 428-434.
15. Martinez-Lopez DG, Fahey M, Coburn J. Responses of Human Endothelial Cells to Pathogenic and Non-Pathogenic *Leptospira* Species. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4:918.
16. Maxie M.G. 1993. The urinary system, p.447-538. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (Eds), *Pathology of Domestic Animals*. 4th ed. Academic Press, London.
17. McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Current Opinion, Infectious Disease*. 2005;18:376-386.
18. Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospirae. *Microb Pathog*. 2005;39:139-47.

19. Mérien F et al. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. In clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 2219-2224.
20. Monteiro GRG. Efetividade da doxiciclina na profilaxia contra leptospirose. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 68p. 2003.
21. Nally, JE, Chantranuwat C, Wu XY, Fishbein MC, Pereira MM, Silva JJP, Blanco DR, Lovett MA. Alveolar Septal Deposition of Immunoglobulin and Complement Parallels Pulmonary Hemorrhage in a Guinea Pig Model of Severe Pulmonary Leptospirosis. *Am J Pathol.* , 2004;163:1115-1127.
22. Noronha IL, Waldherr R, Rambausek M, Ritz E. Nefropatia mesangial primária da IgA: aspectos clínicos e imunopatológicos. *J Bras Nefrol.* 1995; 17: 21-29.
23. Petchclai B, Hiranda SS, Potha U. Gold immunoblot analysis of IgM-specific antibody in the diagnosis of human leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1991; 45: 672-675.
24. Richtzenhain LJ, Cortez A, Heinemann MB, Soares RM, Sakamoto SM, Vasconcellos SA, Higa ZM, Scarcelli E, Genovez ME. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. And *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. *Vet Microbiol.* 2002;87:139-147.
25. Thorner P, Baumal R, Valli VE, Mahuran D, McInnes R, Marrano P. Abnormalities in the NC 1 domain of collagen type IV in GBM in canine hereditary nephritis. *Kidney International.*1989; 35: 843-850.
26. Wang B, Sullivan JA, Sullivan GW, Mandell GL. Role of specific antibody in interaction of leptospire with human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 1984;46:809-13.
27. Yasuda PH, Hoshino-Shimizu S, Yamashiro EH, De Brito T. Experimental Leptospirosis (*L. Interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae) oh the detection in the kidney. *Exp Pathol.* 1986; 29: 35-43.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABBATE, M. et al. In progressive nephropathies, overload of tubular cells with filtered proteins translates glomerular permeability dysfunction into cellular signals of interstitial inflammation. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 9, p. 1213–1224, 1998.

ABDULKADER, R.C. et al. Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v. 44, p. 79-83, 2002.

ADLER, B., MURPHY, K.H.; LOCARNINI, S.A.; FAINE, S. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulin M and immunoglobulin G in human serum by solid phase enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 11, p. 452-457, 1980.

ADLER, B.; MOCTEZUMA A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet. Microbiol.** 2009.

BADKE, M.R.T. **Leptospirose**. Disponível em: [http://www.cnpsa.embrapa.br/abrades-sc/pdf/Memorias2001/1\\_manuelrenato.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/abrades-sc/pdf/Memorias2001/1_manuelrenato.pdf). Acesso em: 02 de set. de 2011.

BARANTON, G. The spirochaetes: a different way of life. **Bull. Inst. Past.**, 93: 63-95, 1995.

BASTOS, M. **Leptospirose**. Disponível em: <<http://www.cca.ufes.br/caklbacteri.htm>>. Acesso em: 14 mar. 2006.

BOQVIST S.; MONTGOMERY J.M.; HURST M.; HO THI VIET THU; OLSSON ENGVALL E.; GUNNARSSON A. & MAGNUSSON U. *Leptospira* in slaughtered fattening pigs in southern Vietnam: Presence of the bacteria in the kidneys and association with morphological findings. **Vet. Microbiol.**, v. 93, p. 361-368, 2003.

BROD, C.S.; FEHLBERG, M.F. Epidemiologia da leptospirose em bovinos. **Ciênc. Rur.**, v. 22, p. 239-5, 1992.

CHASSIN C, et al. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. **J. Immunol.**, v. 183, p. 2669–77, 2009.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Médica Científica, 843p. 1992.

COSTA, A.V.; SILVIO, I.C.; MIRANDA-FILHO, G.; SILVA, V.V.; CALDAS, E.M.; BRITO, E.; SAMPAIO, M.B. Estado imunológico na leptospirose. **Rev Inst Adolfo Lutz.**, v. 41, p. 93-100, 1981.

DAAR, A.S. et al. The detailed distribution of MHC Class II antigens in normal human organs. **Transplantation**, v. 38, p.293– 298, 1984.

DAHER, E.F. et al. Leptospirosis-associated acute kidney injury. **J. Bras. Nefrol.**, v. 32, n. 4, p. 400-407, 2010.

- DAVIS, M.M.; BJORKMAN, P.J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. **Nature**, v. 334, p. 395–402, 1988.
- FAINE, S.; ALDER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2.ed. Melbourne: Australia, MediSci, 272p. 1999.
- FAVERO, A.C.M. et al. Sorovares de leptospirosas predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciênc. Rur.**, v.32, n.4, p.613-619, 2002.
- FRASCA, L., MARELLI-BERG, F. IMAMI, N., POTOLICCHIO, I., CARMICHAEL, P., LOMBARDI, G., LECHLER, R. Interferon-gamma-treated renal tubular epithelial cells induce allospecific tolerance. **Kidney Int.** v. 53, p. 679-689, 1998.
- GALLI, M. et al. Immune complexes in leptospirosis. **Infection.**, v. 13, p. 156, 1985.
- GONÇALVES, L.M.F. et al. Pesquisa de aglutininas, antígeno de leptospirosas e apoptose em rim de suínos naturalmente infectados por *Leptospira* sp. **Pesq. Vet.**, v. 31, n. 7, p. 561-568, 2011.
- GONÇALVES, L.M.F. e COSTA, F.A.L. Leptospiroses em suínos no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n.1, p. 1-14, 2011.
- GUIDA, VO. Sobre a presença de *Leptospira* em suínos no Brasil. **Inst. Biol.**, v, 18, p. 285-287, 1948.
- KELLEY, V.R., SINGER, G.G. The antigen presentation function of renal tubular epithelial cells. **Exp Nephrol.** v. 1, p. 102–111, 1993.
- LAI, K. N., AARONS, I., WOODROFFE, A. J. & CLARKSON, A. R. Renal lesions in leptospirosis. **Australian and New Zealand Journal of Medicine**, v. 12, p. 276–279, 1982.
- LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol.**, Rev. 2001; 14: 296-326.
- LOWANITCHAPAT, 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.**, doi: 10. 1016 j.cimid. 05.001, 2009.
- MARTINEZ-LOPEZ, D. G.; FAHEY, M.; COBURN, J. Responses of Human Endothelial Cells to Pathogenic and Non-Pathogenic *Leptospira* Species. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n.12, e918, 2010.
- MILLER, S.I.; ERNST, R.K.; BADER, M.W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nat. Rev. Microbiol.** Jan., v. 3, n. 1, p. 36-46, 2005.
- MONAHAN, A.M.; CALLANAN, J.J. e NALLY, J.E. Review Paper: Host-Pathogen Interactions in the Kidney during Chronic Leptospirosis. **Vet. Pathol.**, v.46, p. 792-799. 2009.
- MONTEIRO, G.R.G. **Efetividade da doxiciclina na profilaxia contra leptospirose**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 68p. 2003.

NAHORI, M. A. et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. **J. Immunol.**, v. 175, p. 6022–6031, 2005.

NEILSON, E.G. Is immunologic tolerance of self modulated through antigen presentation by parenchymal epithelium? **Kidney Int.** v. 44, p. 927–931, 1993.

OLIVEIRA, S.J.; LIMA, P.C.R. Leptospirose em suínos: etiologia, diagnóstico e controle (revisão). **Pesq. Agrop. Gaúcha**, 2: 119-128, 1996.

OLIVEIRA, S.J. Nova ameaça à reprodução em suínos, além da leptospirose? **Hora Vet.**, v, 19, p. 87-90, 1999.

PETCHCLAI, B.; HIRANDA, S.S.; POTHA, U. Gold immunoblot analysis of IgM-specific antibody in the diagnosis of human leptospirosis. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 45, p. 672-675, 1991.

RADAELLI, E. et al. Expression of Major Histocompatibility Complex Class II Antigens in Porcine Leptospiral Nephritis. **Vet. Pathol.**, v. 46, p. 800-806, 2009.

RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. Santa Maria: Pallotti, 2007.

SHIMABUKURO, F.H. et al. Pesquisa de suínos portadores renais de leptospirosas pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras de rins de animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, 40: 243-253, 2003.

SINGER, G.G., YOKOYAMA, H., BLOOM, R.D., JEVNIKAR, A.M., NABAVI, N., KELLY, V.R. Stimulated renal tubular epithelial cells induce anergy in CD4+ T cells. **Kidney Int.** v. 44, p. 1030-1035, 1993.

SOTO, F.R.M. et al. Artigo de revisão: Leptospirose suína. **Arq. Inst. Biol.**, 74: 379-395, 2007.

STEVENSON, B.; et al. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. **PLoS ONE** 2:e1188, 2007.

TAGLIABUE, S.; FARINA, R. Inchiesta sieroepidemiologica sulla diffusione delle leptospirosi negli animali domestici ed alcune specie selvatiche. **Selez. Vet.**, v.36, n.11-12, p.941-953, 1995.

VAN KOOTEN, C., DAHA, M.R., VAN ES, L.A. Tubular epithelial cells: A critical cell type in the regulation of renal inflammatory processes. **Exp Nephrol.** v. 7, p. 429–437, 1999.

VAN KOOTEN, C., WOLTMAN, A.M., DAHA, M.R. Immunological function of tubular epithelial cells: The functional implications of CD40 expression. **Exp Nephrol.** v. 8, p. 203–207, 2000.

VILAFRANCA, M.; WOHLSEIN, P.; TRAUTWEIN, G. Expression of class II major histocompatibility complex molecules in renal tubular epithelial cells of canine kidneys affected with tubulointerstitial nephritis. **Res. Vet. Sci.**, v. 59, p. 114–117, 1995.



VINETZ, J.M. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 14, p. 527-538, 2001.

YASUDA, P.H.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; YAMASHIRO, E.H.; DE BRITO, T. Experimental Leptospirosis (*L. Interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae) oh the detection in the kidney. **Exp Pathol.**, v. 29, p. 35-43, 1986.

YANG, C.W.; WU, M.S. & PAN, M.J. Leptospirosis renal disease. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 16, p. 73-77, 2001.

YOKOYAMA, H., ZHENG., X., STROM, T.B., RUBIN-KELLEY, V.E. B7<sup>+</sup> transfectant tubular epithelial cells induce T cell anergy, ignorance or proliferation. **Kidney Int.** v. 45, p. 1105–1112, 1994.

WERTS, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 346–352, 2001.