

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**METABOLISMO DO FERRO EM HAMSTERS
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM
Leptospira interrogans SOROVAR Pomona:
INFLUÊNCIA NA PATOGÊNESE DA DOENÇA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ânderson Oliveira Sobroza

Santa Maria, RS, Brasil 2013

**METABOLISMO DO FERRO EM HAMSTERS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE COM *Leptospira interrogans*
SOROVAR Pomona: INFLUÊNCIA NA PATOGÊNESE DA
DOENÇA**

Ânderson Oliveira Sobroza

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica Médica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de

Mestre em Medicina Veterinária.

Orientadora: Dr^a. Marta Lizandra do Rêgo Leal

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**METABOLISMO DO FERRO EM HAMSTERS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE COM *Leptospira interrogans* SOROVAR
Pomona: INFLUÊNCIA NA PATOGÊNESE DA DOENÇA**

elaborada por
Ânderson Oliveira Sobroza

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora

Marta Lizandra do Rêgo Leal, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Rafael Fighera, Dr. (UFSM)

Aleksandro Schafer da Silva, Dr. (UDESC)

Santa Maria, 22 de novembro de 2013.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, gostaria de expressar aqui minha gratidão, no entanto, é indispensável me reportar de forma especial à:

Professora Marta Lizandra do Rêgo Leal, pela confiança depositava em mim, no momento em que aceitou ser minha orientadora, bem como à professora Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, pela coorientação e amizade que por muitas vezes assumiu cunho fraternal em nossa convivência.

À Professora Carmem Flanke pelo auxílio “preparatório”, de suma importância nessa caminhada.

Aos colegas do Hospital Veterinário Universitário, especialmente aos Professores Luiz Sergio Segala de Oliveira e Alexandre Mazzanti, e à Farmacêutica Liege que foram incentivadores desse projeto pessoal, bem como à Farmacêutica Carla Pegoraro Tomazi, pela amizade, que, incansavelmente, se demonstrou reflexível nas frequentes vezes em que precisei trocar o horário de trabalho, e às “nossas” bolsistas, Natália, Gabriela e Ana.

Aos colegas do LAC VET e LabLepto, pela amizade e companherismo. Especialmente ao Médico Veterinário Alexandre Tonin, pela insubstituível participação em cada etapa deste projeto, ao funcionário Jorge pelo auxílio na coleta de material e ao Acadêmico Guilherme pelo auxílio no processo analítico.

Gostaria de agradecer à minha esposa Luciana, pelo amor e tolerância nos dias difíceis, com quem dividi e divido cada êxito ou preocupação. Aos meus Pais, Irmão e Sogros pelo apoio incondicional e por nunca descrerem dos meus projetos e ao Bentinho, nosso mascote, que com seu “sorriso canino” tem sido também um grande companheiro.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

METABOLISMO DO FERRO EM HAMSTERS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Leptospira interrogans* SOROVAR

Pomona: INFLUÊNCIA NA PATOGÊNESE DA DOENÇA

AUTHOR: ÂNDERSON OLIVEIRA SOBROZA

ADVISER: MARTA LIZANDRA DO RÊGO LEAL

Santa Maria, 22 de novembro de 2013

A ocorrência de anemia em indivíduos infectados por *Leptospira interrogans* é uma das complicações decorrentes à doença em sua forma mais severa. O ferro tem um papel importante nos processos hematopoiéticos, no entanto, o seu metabolismo preciso em indivíduos com leptospirose ainda é desconhecido. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar os marcadores clássicos relativos à reserva de ferro no organismo de hamsters experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Pomona, estirpe virulenta LPF. Para isto, foram utilizados 24 hamsters machos, distribuídos em quatro grupos, sendo dois grupos Controles (C7 e C14) e dois Testes (T7 e T14), com 6 animais em cada grupo. Amostras de sangue foram coletadas no sétimo (Grupos C7 e T7) e no décimo quarto dias pós-inoculação (Grupos C14 e T14). A disponibilidade de ferro foi determinada no soro, pela dosagem de ferro sérico, ferritina, transferrina e capacidade de ligação do ferro, ao passo que a medula óssea também foi quantificada quanto à deposição de ferro, através da reação de *Pearls*. Além disso, a capacidade antioxidante total (CAT) e status total de oxidantes (TOS) foram avaliados, em conjunto com hepcidina e os níveis de IL-6, por serem variáveis envolvidas no metabolismo do ferro. Com os resultados, foi possível observar a instalação de um quadro agudo com crise hemolítico-regenerativa. Nos demais parâmetros, encontrou-se uma elevação do ferro sérico, ferritina, e da positividade na Reação de *Pearls*, nos dois grupos teste em relação aos controles. A transferrina apresentou uma redução no grupo T14, com índices de saturação, no entanto, sem diferença estatística entre os grupos. Capacidade antioxidante total foi aumentada em ambos os períodos, enquanto TOS foi aumentada apenas no dia 14 PI. Hepsidina e IL-6 foram significativamente elevados nos dias 7 e 14 de PI. Portanto, observou-se que o perfil sérico de animais infectados apresentam um forte padrão hemolítico, com alguma demonstração de sequestro tecidual férrico. Os resultados mostram que o metabolismo do ferro é alterado em hamsters infectados por *L. interrogans* sorovar Pomona, e que, portanto, tem participação na patogenia da doença.

Palavras-chave: Leptospirose. Anemia. Ferritina. Medula óssea. Hemograma. Hepsidina. Interleucina 6.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Post-Graduate Program in Veterinary Medicine
Universidade Federal de Santa Maria

IRON METABOLISM IN HAMSTERS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Leptospira interrogans* SOROVAR Pomona: INFLUENCE ON DISEASE PATHOGENESIS

AUTHOR: ÂNDERSON OLIVEIRA SOBROZA
ADVISER: MARTA LIZANDRA DO RÊGO LEAL
Santa Maria, 22th november2013

Anemia in *Leptospira interrogans* infected individuals is one of the most common complications found in the severe form of the disease. Iron plays an important role in the hematopoietic processes; however, its precise metabolism on individuals with leptospirosis is still unknown. Therefore, the aim of this study was to analyze the classic iron markers associated to the storage process in hamsters experimentally infected by *L. interrogans* serovar Pomona (virulent strain LPF). Four groups with six hamsters each were used; two groups were controls (C7 and C14) and two were experimental groups with infected animals (T7 and T14). Blood samples were collected on the seventh (C7 and T7) and fourteenth days (C14 and T14) post-inoculation (PI). Iron availability was determined in sera samples by the assessment of iron, ferritin, transferrin, and iron binding capacity, whereas the bone marrow was also evaluated for the deposition of this metal by *Pearl's* reaction. Additionally, the total antioxidant capacity (TAC) and total oxidant status (TOS) were assessed, along with hepcidin and IL-6 levels to be involved in iron metabolism. Based on the results, it was possible to observe the onset of an acute condition with crisis hemolytic and regenerative response. The other parameters showed an increase in seric iron, ferritin, as well as a positive *Pearl's* reaction in animals from the groups T7 and T14 compared with the control groups. Transferrin levels decreased in animals from the group T14 with saturation index, but without statistical difference among all tested groups. TAC was increased in both periods, while TOS was increased only on day 14 PI. Hepcidin and IL-6 were statistically increased on days 7 and 14 PI. Therefore, it was observed that the serum profile from infected animals showed a strong hemolytic pattern, with some demonstration of ferric tissue sequestration. The results show that iron metabolism is activated in hamsters infected by *L. interrogans* sorovar Pomona, and therefore has participation in the pathogenesis of the disease.

Keywords: Leptospirosis. Anemia. Ferritin. Bone marrow. Hemogram. Hepcidin. Interleukin 6.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro. Dcytb: ferredutase DMT-1: transportador de metal divalente 1; HCP-1: proteína transportadora do heme-1; Nu: núcleo; HFE: Hefestina; TfR: receptor da transferrina16
- Figura 2-Ação da hepcidina no metabolismo do ferro. Ao formar o complexo com ferroportina leva à sua degradação. No enterócito, o ferro não é transportado para o exterior da célula, e a absorção é inibida. No macrófago, o ferro fica acumulado no seu interior, diminuindo o ferro disponível para a eritropoiese.....20
- Figura 3-Reação de Fenton: Ânion Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) reage com Ferro férrico (Fe^{3+}), liberando oxigênio de Ferro Ferroso (Fe^{2+}),o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) reage com Ferro Ferroso formando Ferro Férrico e Radical Hidroxila (OH^{\cdot}).....21

CAPÍTULO I

- Figure 1- IL-6 and hepcidin levels in serum of hamsters experimentally infected by *Leptospira interrogans* serovar Pomona on days 7 and 14 post-infection (* $P < 0.01$, t test).....39
- Figure 2- TOS (total oxidant status) and TAC (total antioxidant capacity) levels in serum of hamsters experimentally infected by *Leptospira interrogans* serovar Pomona on days 7 and 14 post-infection (* $P < 0.01$, ** $P < 0.05$; t test).....40

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1-Mean values and standard deviations (\pm) for hematological parameters in healthy animals (controls) and hamsters experimentally infected by <i>L. interrogans</i> Serovar Pomona.....	37
Table 2- Mean values and standard deviations (\pm) for iron parameters in not-infected (control) and hamsters experimentally infected by <i>L. interrogans</i> serovar Pomona.....	38

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
Leptospirose	11
Metabolismo do Ferro	15
Marcadores Inflamatórios e consequências na homeostase do ferro	18
Sobrecarga de ferro e processo oxidativo	20
CAPÍTULO I	23
MANUSCRITO	23
Abstract	24
1. Introduction	25
2. Material and Methods	26
2.1. Bacterial inoculum.....	26
2.2. Experimental animals	26
2.3. Serology.....	26
2.4. Inoculation	27
2.5. Sample collection and preparation	27
2.6. Iron metabolism evaluation	27
2.7. <i>Pearl's</i> reaction.....	27
2.8. Interleukin-6 and hepcidin serum levels.....	28
2.9. Levels of oxidants and antioxidants in the serum	28
2.10. Statistical analysis	28
3. Results	29
3.1. Disease progression and hematological parameters	29
3.2. Parameters of iron metabolism.....	29
3.3. <i>Pearl's</i> reaction.....	29
3.4. Interleukin-6 and hepcidin serum levels.....	29
3.5. TAC and TOS.....	30
4. Discussion	30
5. References	33
CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, e se encontram no item “Manuscrito”. As seções “Materiais e Métodos”, “Resultados”, “Discussão” e “Referências” encontram-se no próprio manuscrito que representa este estudo na íntegra. O item “Conclusões”, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho. As referências referem-se somente às citações que aparecem nos subtítulos que fazem parte da “Introdução” desta dissertação.

INTRODUÇÃO

Leptospirose

Leptospiras são organismos filamentosos, helicoidais e móveis, o que lhes conferiu a denominação espiroqueta, que inclusive influenciou o nome do filo, da classe e da ordem a que pertencem. Essas bactérias têm aproximadamente 10 a 20 µm de comprimento e 0,1 a 0,2 µm de largura, são Gram negativas e vivem em tecidos de animais, no solo úmido, na lama e em águas paradas, como em banhados (FAINE, 1982). O gênero *Leptospira* tem distribuição mundial e é transmitido principalmente através da urina dos hospedeiros de manutenção, tais como cães, bovinos, roedores e outros (GAZI et al., 2011). A infecção no hospedeiro provoca um conjunto de manifestações clínicas como febre, icterícia, insuficiência renal e hemorragia pulmonar fatal (GAZI et al., 2011). São conhecidas mais de 250 sorotipos de *Leptospira interrogans*, a espécie que está associada à infecção em animais, com possibilidade de que muitos sorotipos sejam endêmicos em determinadas áreas (SRIKRAM et al., 2011).

Leptospiras patogênicas são agentes etiológicos de importância zoonótica para o homem e já foram descritas em uma grande variedade de animais domésticos e selvagens, que adquirem naturalmente a infecção. No entanto, apenas um pequeno número de animais manifesta a doença (LAGE et al., 2004), ampliando com isso a possibilidade de que indivíduos portadores/transmissores não sejam devidamente diagnosticados. Devido à longa duração da condição de portador, os animais que não exibem sinais clínicos da doença se tornam os reservatórios do agente no ambiente (MASCOLLI et al., 2002).

Em animais, a infecção ocorre diretamente através da pele e mucosas que entram em contato com urina, fluidos placentários, leite ou água e alimentos contaminados, podendo também ser transmitida pelo sêmen e por via transplacentária (BOLIN & PRESCOTT, 1999). Em humanos, a bactéria penetra na mucosa ou pele não íntegras, dissemina-se pela corrente sanguínea, atingindo todos os órgãos. A leptospirose caracteriza-se por uma vasculite, sendo o dano às células endoteliais de capilares a causa básica das manifestações clínicas, tais como disfunção tubular renal, lesão hepática, miocardite e hemorragia pulmonar (HILL & SANDERS, 1997; PETRI, 1996). A lesão é provavelmente devida a depósitos de complexos imunes nos pequenos vasos dos órgãos acometidos. A ativação da resposta imunoinflamatória determina a liberação de diversos fatores humorais, gerando o processo inflamatório (BETHLEM & CARVALHO, 2000; CARVALHO et al., 1992).

A doença pode manifestar-se de forma aguda causando septicemia, hemorragia, nefrite, anemia hemolítica e hemoglobinúria, assim como sub-aguda ou crônica, caracterizando-se por quadros clínicos de retorno ao cio, abortamento e natimortalidade (CICERONI et al., 2000). É tipicamente uma doença bifásica, com uma primeira fase leptospirêmica, que dura de quatro a nove dias, e uma segunda fase em que surgem anticorpos do tipo imunoglobulinas M (IgM), que determinam a formação de imunocomplexos circulantes que podem causar uveíte e colapso circulatório, entre outros distúrbios. A duração e as manifestações clínicas da leptospirose são muito variáveis (O'NEIL et al., 1991).

Os ovinos são os animais domésticos considerados menos susceptíveis, porém sofrem a infecção por leptospirosas patogênicas e, em muitos casos, a evolução é assintomática, podendo, às vezes, ocorrer surtos da doença com sinais de aborto e morte de cordeiros na primeira semana de vida (LAGE et al., 2004), o que evidentemente causa prejuízos consideráveis no rebanho. Anemia hemolítica em cordeiros também tem sido associada à infecção por leptospirosas (CICERONI et al., 2000).

Leptospirose bovina é endêmica no Brasil e provoca principalmente transtornos reprodutivos, caracterizados por aborto e infertilidade (HOMEM et al., 2001). Doença aguda caracterizada por anorexia, febre, apatia. Icterícia e hemoglobinúria, devido à anemia hemolítica, ocorre apenas em bezerros com até 30-60 dias de idade. . Títulos positivos, para o sorotipo Hardjo, já foram encontrados em bovinos de diversos países sendo relacionados com leptospirose bovina clínica. Este sorotipo tem sido o causador mais frequente de infecções entre os rebanhos de bovinos do mundo todo, inclusive no Brasil (ELDER et al., 1986; MILLER et al., 1991).

A infecção em cães constitui um sério problema sanitário, principalmente pelo potencial de contágio ao homem, devido à grande proximidade estabelecida entre os seres humanos e os cães (MASCOLLI et al., 2002). Figuera et al. (2008) ao analisarem protocolos de necropsia realizados entre os anos de 1965 e 2004 dão conta de que leptospirose é responsável por 2,2% das causas de morte ou razão para eutanásia de cães, sendo a 4ª doença infecciosa mais frequentemente diagnosticada, com prevalência de 6,4%, na Mesorregião Centro Ocidental Rio-Grandense.

A persistência do agente na natureza e o elevado potencial de infecção são assegurados pela diversidade de identidades sorológicas, pela multiplicidade de espécies hospedeiras e pelo relativo grau de sobrevivência no ambiente sem parasitismo (MASCOLLI

et al., 2002). Os sorovares mais comumente associados e conhecidos da leptospirose canina clássica são *Icterohaemorrhagiae* e *Canicola* (SCANZIANI et al., 1994). No entanto, alguns inquéritos epidemiológicos como o de Masculli et al. (2002) demonstraram que a soropositividade para leptospirose na população canina chega próximo de 15% e a variante que aparece com maior frequência nesse estudo é *Copenhageni*, com 24% de positividade, seguida por *Canicola* e *Hardjo*, ambas com 20%. Em trabalhos mais recentes (CASTRO, 2010) verificou-se positividade de 38% com perfil de predomínio de sorovares diferentes (*Automnalis* [15,79%], *Bratislava* e *Canicola* [14,03%], *Tarassovi* [10,53%], *Pomona* e *Icterohaemorrhagiae* [8,77%]). O mesmo autor ainda relata a ocorrência de maior soropositividade nos períodos de maior pluviosidade da região onde o estudo foi conduzido.

Segundo Sakata et al. (1992), os sorovares mais prevalentes isolados de pacientes humanos hospitalizados com leptospirose no Estado de São Paulo, durante o período de 1986 a 1989, foram *Copenhageni* (77,78%) e *Canicola* (11,11%). Estes achados sugerem que algumas variantes que circulam entre a população de humanos também causam doença em cães, uma vez que sua proximidade leva à exposição a fatores de risco similares (MASCOLLI et al., 2002). A prevalência do sorotipo *Copenhageni* aponta a importância da população de roedores na transmissão da doença. No Brasil, este sorovar já foi isolado de animais de companhia (MASCOLLI et al., 2002). Na Região Sul do país, além de *Icterohaemorrhagiae* e *Canicola*, *Copenhageni* também é frequentemente isolado (FAVERO et al., 2002; FREIRE et al., 2007).

Leptospirose suína é uma importante causa de prejuízos em rebanhos de reprodução e ocorre em todo o mundo. O impacto econômico da doença é descrito em criações industriais do hemisfério Norte, Nova Zelândia, Argentina e Brasil (CLARK, 1996; MAILLOUX, 2001). No Brasil, leptospirose em suínos tem sido uma das principais causas de falhas reprodutivas em animais de vários estados, principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país (LANGONI et al., 1995). Os sorovares de leptospirosas mais comumente encontrados infectando e causando a doença em suínos, são: *Pomona*, *Icterohaemorrhagiae*, *Tarassovi*, *Canicola*, *Gryppotyphosa*, *Bratislava* e *Muenchen*. Dessas, os quatro primeiros já foram isolados de suínos no Brasil (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Nos equinos, o primeiro relato de caso descrito no Brasil ocorreu em 1981 com o isolamento do sorovar *Icterohaemorrhagiae*, a partir de feto abortado. (PESCADOR et al., 2004). Langoni et al. (2004), quando avaliaram 1402 amostras de soro equino oriundas dos Estados de São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul, utilizando o título de 200 como ponto de

corde, obtiveram 54% de soropositividade. Nesta pesquisa os sorogrupos mais prevalentes foram: Icterohaemorrhagiae (37,01%), Castellonis (16,97%) e Djamani (15,19%).

Segundo Douglas & Plue (1980), a anemia hemolítica associada com leptospirose em animais está bem documentada e é devida à produção de hemolisinas com atividade de fosfolipase, no entanto, o envolvimento de mecanismos não hemolíticos na fisiopatologia de instalação da anemia, sobretudo no processo de cronificação, ainda deixa dúvidas. Além disso, embora leptospirose ocorra como uma doença hemolítica em filhotes de algumas espécies animais, como bovinos, ovinos, caprinos, suínos e, talvez, rinocerontes-negros (*Diceros bicornis*), nos cães, leptospirose sempre é vista como uma doença hepatorenal e nunca como uma crise hemolítica, entretanto, ocasionalmente, alguns autores ainda aventuram-se a citar tal patogênese para essa espécie. Isso é afirmado por alguns autores que, recentemente (TOCHETTO et al., 2012) descreveram, com base na ausência de esplenomegalia e de lesões classicamente associadas à crise hemolítica intravascular (nefrose hemoglobinúrica, urina tingida de vermelho-tinto e embebição por hemoglobina), 53 casos de leptospirose em cães, dos quais nenhum desenvolveu crise hemolítica. Para esses autores, embora seja tentador especular que a icterícia e a anemia vistas na leptospirose canina sejam oriundas de crise hemolítica, cães não desenvolvem hemólise e, portanto, essa não é a patogênese do acúmulo de bilirrubina nos tecidos dessa espécie.

Sorovar Pomona já foi relacionado à reemergência de leptospirose canina nos Estados Unidos e Canadá, entendendo-se nesses trabalhos que, tal fato, pode ser devido à urbanização das zonas rurais, o que proporcionou uma maior ocorrência de contato entre cães e animais selvagens como guaxinins e outros (ALTON, et al., 2009). Além do mais, outros estudos evidenciam a que sorovar Pomona é capaz de causar lesão renal e hepática graves em cães (BIRNBAUM, et al. 1998). Resultados de estudos de patogenia microbiana demonstram que a membrana externa de *L. interrogans* sorovar Pomona contém uma capacidade antigênica bastante pronunciada em animais infectados. Adicionalmente, esses autores documentam que este sorovar secreta diversas proteínas, incluindo potentes hemolisinas, que são diretamente relacionadas com atividade hemolítica da bactéria (ZUERNER, et al., 1991).

Metabolismo do Ferro

O ferro caracteriza-se por ser um metal de transição e a extensão de sua utilização biológica está relacionada com a capacidade do mesmo em estar presente no organismo em diferentes estados de oxidação, agir como um centro catalítico para diversas funções metabólicas e de formar muitos complexos. Presente na hemoglobina, este mineral é de fundamental importância para o transporte de oxigênio e dióxido de carbono bem como para a respiração celular aeróbica. O ferro é componente essencial de diversas enzimas celulares; é fundamental para o funcionamento adequado do sistema imunológico e dos citocromos que são indispensáveis para a produção de energia, de enzimas do ciclo do ácido cítrico e das enzimas ribonucleotídeo redutase e NADPH redutase. Esse mineral ainda está envolvido na síntese de catecolaminas, do ácido gama-aminobutírico e na formação de mielina (CARPENTER & MAHONEY, 1992; WORWOOD, 1996).

A transferrina (Tf), principal proteína transportadora do ferro, é uma glicoproteína de 80 KDa sintetizada e secretada pelo fígado. Possui dois sítios homólogos com alta afinidade pelo ferro férrico (Fe^{3+}), além de solubilizar o ferro, a Tf atenua sua reatividade e facilita a sua liberação para as células. O ferro livre possui atividade óxido-redutora, podendo promover a formação de espécies altamente reativas pelas reações de Fenton e de Harber-Weiss, com grande potencial lesivo para os tecidos. A transferrina mantém o ferro em uma forma solúvel e não tóxica, evitando a formação de radicais livres (PEELING et al., 2008).

A entrada do ferro nas células também depende da transferrina, principalmente nos precursores eritroides da medula óssea, hepatócitos e monócitos (SMITH, 1997; PEELING et al., 2008). Nessas células, o ferro é estocado na forma de ferritina ou hemossiderina. A ferritina garante uma reserva solúvel, difusa e prontamente disponível, enquanto a hemossiderina possui maior teor de ferro, porém na forma de agregados insolúveis de baixa disponibilidade (SMITH, 1997).

O processo de absorção do ferro ocorre em várias etapas (Figura 1). Primeiro há a captação pela superfície apical dos enterócitos, o transporte até estas células é feito pela proteína DMT1 (transportador de metais divalentes). A proteína de transporte do heme (HCP1) incorpora a fração heme no enterócito após digestão enzimática da hemoglobina e mioglobina. No enterócito, o heme é degradado pela heme oxigenase e libera ferro ferroso (Fe^{2+}). No final do processo, o ferro pode ser armazenado na forma de ferritina ou liberado do

enterócito para o sangue pela ferroportina 1 (FPT1). Como a transferrina sérica tem grande afinidade pelo ferro na forma férrica, o Fe^{2+} externalizado pela FPT1 deve ser oxidado para Fe^{3+} . A hefaestina, oxidase semelhante à ceruloplasmina sérica, é responsável por essa conversão (ATANASIU et al., 2006).

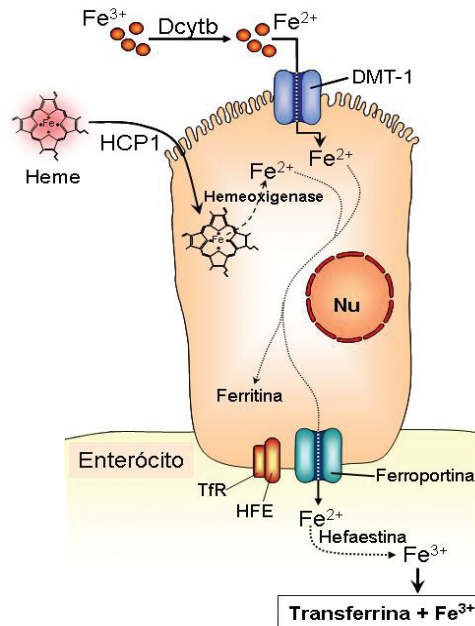


Figura 1- O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro. Dcytb: ferredutase; DMT-1: transportador de metal divalente 1; HCP-1: proteína transportadora do heme-1; Nu: núcleo; HFE: Hefaestina; TfR: receptor da transferrina. Fonte (GROTTO, 2008).

Os precursores eritroides são as células que possuem maior exigência de ferro para a síntese da hemoglobina. Em condições fisiológicas, o organismo consegue suprir a maior parte dessa demanda por meio da reciclagem do ferro, proveniente da fagocitose de eritrócitos senescentes pelos macrófagos (SMITH, 1997; DUNN et al., 2007). Macrófagos esplênicos e da medula óssea e, menos comumente, células de Küpffer no fígado reconhecem modificações bioquímicas na membrana desses eritrócitos, modificações estas que sinalizam para que o macrófago elimine essas células. Após a interação de receptores específicos nos macrófagos com os eritrócitos, inicia-se o processo de fagocitose, seguido da degradação dos componentes eritrocitários. A parte protéica da molécula de hemoglobina, a cadeia globínica, terá seus aminoácidos também reciclados e reutilizados para síntese proteica. O Fe^{3+} é transportado pela transferrina até os locais onde será reaproveitado, predominantemente na

medula óssea, onde participará da hemoglobinizacão de novos eritrócitos (CHUNG & WESSLING-RESNICK, 2003; KNUTSON & WESSLING-RESNICK, 2003).

As alteracões do metabolismo do ferro podem ser avaliadas por várias provas laboratoriais: o hemograma, a determinacão sérica do ferro, a capacidade de ligacão do ferro, o índice de saturacão da transferrina, a concentracão de ferritina e a avaliacaão do conteúdo de ferro medular são as mais utilizadas (ALENCAR et al., 2002). A mensuracão de variáveis eritrocitárias, como o hematócrito e a concentracão de hemoglobina são comumente utilizadas para avaliar a disponibilidade de ferro. As alteracões no tamanho e na cor dos eritrócitos proporcionam uma informacão indireta, porém útil, em relacão a quantidade de ferro no eritrócito. Apesar de serem comumente utilizados para avaliar a deficiênciade ferro, os índices eritroides (índices hematimétricos) são mais úteis em diagnosticar a carênciade ferro após a manifestacão da anemia, uma vez que células hipocrômicas e microcíticas aparecem em maior quantidade no sangue após um decréscimo na concentracão de hemoglobina (COOK, 1990; HASTKA et al., 1992). Anemia nem sempre está associada à deficiênciade ferro, já que a diminuicão da síntese de hemoglobina ocorre apenas nas deficiênciades severas (SMITH et al., 1986). Os parâmetros eritrocitários estão geralmente normais durante os primeiros estágios da deficiênciade ferro, enquanto a deficiênciade crônica é caracterizada por anemia microcítica hipocrômica (HARVEY, 2000).

Os índices hematimétricos também auxiliam na investigacão das anemias. Na anemia por deficiênciade ferro é comum a microcitose (diminuicão do volume corpuscular médio – VCM), bem como a hipocromia (reduçãoda hemoglobina corpuscular média - HCM). Como a avaliacaão do tamanho dos eritrócitos é de suma importânciade para o diagnóstico de anemia, o VCM é o mais importante dos índices hematimétricos. VCM baixo parece ser um indicador confiável da reduçãoda síntese de hemoglobina. Outro índice que deve ser considerado é a concentracão de hemoglobina corpuscular média (CHCM) que, mais tardiamente, se torna menor na deficiênciade ferro (COOK et al, 1992).

A concentracão de ferro sérica não reflete, com fidelidade, os estoques do organismo (HARVEY et al., 1987). O ferro pode ficar estocado nas células do sistema fagocítico macrófágico do fígado, baço e medula óssea, nas formas de ferritina e hemossiderina. Uma boa variável para a avaliacaão do ferro estocado é a dosagem da ferritina sérica, que possui forte correlaçãoda conteúdo de ferro no fígado e baço (SMITH et al., 1984; HYYPPA et al., 2002). A diminuicão da ferritina é um bom indicativo de deficiênciade ferro, porém resultados normais e elevados devem ser avaliados com cautela, já que a ferritina é uma

proteína de fase aguda, podendo estar aumentada em resposta à inflamação, infecções, hepatopatias, neoplasias e exercício físico (SCHUMACHER et al., 2002).

A hemossiderina corresponde à forma degradada da ferritina, em que a concha protéica foi parcialmente desintegrada, permitindo que o ferro forme agregados. Esta forma de armazenamento pode ser visualizada à microscopia óptica após a coloração com azul da Prússia ou reação de *Pearls*, em que a hemossiderina cora com ferrocianeto de potássio na presença de ácido clorídrico (FAIRBANKS & BEUTLER, 2001).

O ferro tecidual pode ser avaliado por biópsia ou punção aspirativa de fígado ou medula óssea. A avaliação do ferro medular, por método histoquímico com corante azul-de-Prússia é considerado o teste mais preciso para o diagnóstico da deficiência de ferro, mas, devido ao seu caráter invasivo e por ser desconfortável ao paciente, na prática só é realizado em casos mais complexos e não diagnosticados pelos métodos usuais. Tem bom valor diagnóstico para a deficiência e para a diferenciação entre deficiência e pseudodeficiência de ferro. Na deficiência, ocorre depleção dos estoques medulares, enquanto que na pseudodeficiência o ferro medular apresenta-se de normal a aumentado (SMITH, 1997; ALENCAR et al., 2002).

O grupamento heme é a forma mais abundante de ferro no hospedeiro infectado por *L. interrogans*, sendo suscetível de ser uma importante fonte de ferro para esta bactéria. Leptospiras podem utilizar heme como uma fonte de ferro único e estirpes virulentas demonstram quimiotaxia para hemoglobina. Além disso, o genoma de *L. interrogans* codifica proteínas diretamente envolvidas na aquisição de heme, incluindo esfingomielinases hemolíticas (MURRAY, et al. 2008).

Marcadores Inflamatórios e consequências na homeostase do ferro

Os principais componentes de leptospiras relacionados com lesões teciduais são os lipopolissacarídeos da membrana plasmática, que são potentes ativadores de macrófagos, e, portanto, estimulam a secreção de interleucina 1 (IL-1) e interferon gama (INF γ) (GREENE et al., 2006). As citocinas são glicoproteínas que regulam as respostas imunes por meio de sinalização intercelular. Em enfermidades que causem imunossupressão importante, ocorre a ativação de macrófagos. O INF- γ ativa os macrófagos e aumenta sua capacidade de destruir microorganismos fagocitados. Os macrófagos, uma vez ativados, induzem a liberação de

interleucinas (IL-1 e IL-6, principalmente) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) que são responsáveis pelos sinais clínicos de inflamação e indução da produção de proteínas de fase aguda (TIZARD, 2007).

A resposta imune induzida pelas citocinas, principalmente IL-1, IL-6 e TNF- α , suprime a absorção intestinal de ferro, aumenta a retenção de ferro pelos macrófagos e a síntese de ferritina; promove a remoção de ferro dos sítios de invasão do microrganismo pela apolactoferrina e a deposição de ferritina em macrófagos e estimula ainda a síntese de imunoglobulinas contra o mecanismo de captação de ferro de microorganismos (WEINBERG, 1992; SHERMAN, 1992; HERSHKO, 1993). A IL-1 é diretamente responsável pela diminuição na concentração de ferro no soro observada durante o processo infeccioso, porque promove um aumento da síntese de proteínas de fase aguda, tais como o fibrinogênio, haptoglobulina, ceruloplasmina e ferritina (HERSHKO, 1993). A IL-6 e a disponibilidade de ferro regulam a expressão e síntese da hepcidina (NEMETH et al., 2004).

O controle do equilíbrio do ferro requer uma comunicação entre os locais de absorção, utilização e estoque. Essa comunicação é feita pela hepcidina, um hormônio peptídeo circulante composto por 25 aminoácidos, sintetizada no fígado (GANZ, 2007; KEMNA et al., 2008) que tem papel regulatório fundamental na homeostase do ferro, coordenando o uso, estoque, bem como mecanismos de aquisição deste mineral. Trata-se de um peptídeo antimicrobiano mediador da imunidade inata, principalmente nos vertebrados inferiores. A atividade antimicrobiana é conferida pela propriedade da hepcidina de romper membranas microbiais e na restrição da disponibilidade de ferro ao desenvolvimento microbiano. Nos vertebrados superiores, no entanto, a sua atividade está muito mais relacionada à homeostase do ferro (PARK et al., 2001; KRAUSE et al., 2000).

A hepcidina atua na inibição da absorção intestinal e na liberação do ferro por macrófagos e enterócitos (Figura 2) sendo o mediador no ciclo da absorção do ferro entre o fígado e o intestino (DUNN et al., 2007).

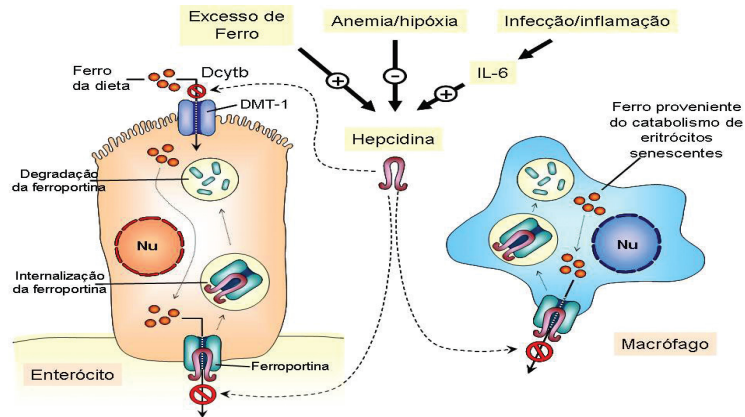


Figura 2- Ação da hepcidina no metabolismo do ferro. Ao formar o complexo com a ferroportina leva à sua degradação. No enterócito, o ferro não é transportado para o exterior da célula, e a absorção é inibida (figura à esquerda). No macrófago, o ferro fica acumulado no seu interior, diminuindo o ferro disponível para a eritropoiese (figura à direita). Fonte (GROTTO, 2008).

Este peptídeo possui a função de se ligar à ferroportina, regulando a exportação do ferro para o plasma. Quando as concentrações de hepcidina estão baixas, as moléculas de ferroportina são expostas na membrana plasmática e exportam ferro. No entanto, quando as concentrações de hepcidina se elevam, esta se liga às moléculas de ferroportina induzindo-as à internalização e posterior degradação a nível lisossomal, assim, o ferro liberado diminui progressivamente (GANZ, 2007). São fatores regulatórios da expressão da hepcidina a quantidade de ferro biodisponível (a sobrecarga de ferro aumenta sua expressão, enquanto a anemia e hipoxemia levam à redução) e o estado inflamatório, no qual a IL-6 tem um papel fundamental, atuando como sinalizadora de inflamação (NEMETH et al., 2004).

Sobrecarga de ferro e processo oxidativo

O excesso de ferro presente no organismo pode ser um motivo de preocupação, se levarmos em conta a capacidade de catalisar reações oxidativas que este metal apresenta. Espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila podem danificar quase todos os componentes celulares, incluindo DNA, membranas lipídicas e proteínas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). De acordo com Goldstein et al. (1993), o processo de redução do peróxido de hidrogênio através da reação de Fenton (Figura 3) culmina na formação de espécies altamente reativas e instáveis, tais como radical hidroxila, e está diretamente correlacionada com a quantidade de ferro biodisponível.

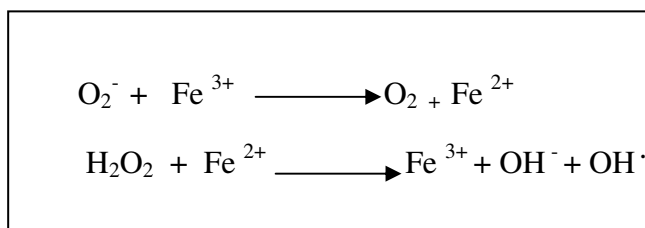


Figura 3- Reação de Fenton: Ânion Radical Superóxido (O_2^-) reage com Ferro férrico (Fe^{3+}), liberando oxigênio e Ferro Ferroso (Fe^{2+}), o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) reage com Ferro Ferroso formando Ferro Férrico e Radical Hidroxila (OH^\cdot).

As células, tecidos e fluidos corporais são equipados com um sensível sistema de defesa que ajuda a neutralizar o desafio oxidativo (SIES, 2007). Segundo Sies (1993), a manutenção da integridade dos metabólitos e o estado de equilíbrio funcional no ambiente aeróbio são dependentes da defesa antioxidante, que está organizada em três principais níveis de proteção: prevenção, interceptação e reparação. Os antioxidantes impedem que o oxigênio se combine com moléculas suscetíveis ou neutralizam a formação de espécies reativas de oxigênio, formando compostos menos reativos, esses agentes podem ser compostos moleculares de origem exógena como as vitaminas, obtidos através da alimentação, ou ainda enzimas endógenas do sistema de defesa antioxidante (DRÖGE, 2002).

O aumento dos produtos oxidantes e a redução de moléculas antioxidantes sob determinadas condições desloca o equilíbrio oxidante/antioxidante para o estado oxidativo. Esse desequilíbrio tem sido relacionado à fisiopatogenia de diversas doenças. Trabalhos de revisão de Assar (2013), trazem informações valiosas sobre o envolvimento de processo oxidativos com o envelhecimento vascular e da relação deste com a instalação de doenças não só cardiovasculares, mas também com o aparecimento de síndromes demenciais. Na literatura, existem ainda diversos trabalhos, tais como os de Bloch-Damti & Bashan (2005) e os de Jain (1989) indicando que doenças como diabetes tendem a apresentar maior produção de agentes oxidantes. Em relação às condições infecciosas potencialmente graves como o choque séptico, Salvemini & Cuzzocrea (2002) revisaram o envolvimento de superóxido e peroxinitrito e suas implicações na ocorrência de coagulação intravascular disseminada.

Leptospirose é considerada uma doença mediada por toxinas, conduzindo a peroxidação lipídica, já que lipopolissacarídeos de sua membrana desempenham um

importante papel na citotoxicidade (ALVES et al, 1991; YANG et al, 2001;. LEVETT, 2001). A toxemia ativa mecanismos celulares de defesa antioxidante tais como a glutathione o ácido úrico e outros (FREI et al . 1988). Em condições inflamatórias , o óxido nítrico (NO) aumenta seus níveis através da estimulação de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) por produção de citocinas pró-inflamatórias, provocando lesão do tecido NO mediada, a partir da reação com o ânion radical superóxido produzindo peroxinitrito, este último considerado uma potente citotoxina (CARRILLO-VICO et al . 2005).

Em estudo com bovinos infectados por *L. Interrogans*, no qual diversos parâmetros de de peroxidação lipídica e repostas antioxidantes foram mensurados, Erdogan et. al (2008) sugerem que os danos oxidativos nos tecidos, juntamente com outros mecanismos podem tomar parte na patogênese da leptospirose bovina. O mesmo autor ainda sugere a necessidade de mais estudos detalhados em nível celular para compreender plenamente a patogenia da doença.

O Método descrito por Erel (2004), possibilita a mensuração do status antioxidante no organismo. O mesmo autor em outro trabalho propõe também uma técnica para medir o *status* oxidante (EREL, 2005). No primeiro caso a técnica se baseia no fato de os antioxidantes presentes na amostra acelerarem a taxa de branqueamento, que é acompanhada espectrofotometricamente, num grau proporcional às suas concentrações. Já o último se fundamenta na premissa de que, no decorrer da reação, a intensidade da cor, que pode ser medida espectrofotometricamente, está relacionada com a quantidade total de moléculas oxidantes presentes na amostra. O ensaio é calibrado com peróxido de hidrogênio e os resultados são expressos em termos de equivalente de peróxido. A utilização dessas duas técnicas possibilita uma análise comparativa eficaz do status de equilíbrio oxidante/antioxidante da amostra.

Embora haja um consenso de que a ocorrência de anemia acompanhe o processo de fisiopatogenia de instalação da leptospirose, e que o componente hemolítico tenha papel considerável em alguns casos, pouco se sabe sobre os desdobramentos do metabolismo do ferro em indivíduos acometidos pela infecção, bem como acerca da participação do estresse oxidativo e das citocinas neste processo.

CAPÍTULO I

MANUSCRITO

Elsevier Editorial System(tm) for Veterinary Microbiology
Manuscript Draft

Manuscript Number: VETMIC-D-13-8788

Title: Iron metabolism in hamsters experimentally infected with *Leptospira interrogans* sorovar Pomona: influence on disease pathogenesis

Article Type: Research Paper

Keywords: Leptospirosis, anemia, ferritin, bone marrow, hemogram, hepcidin, IL-6, TAC, TOS.

Corresponding Author: Dr. Anderson Sobroza,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Santa Maria

First Author: Anderson Sobroza

Order of Authors: Anderson Sobroza; Alexandre Tonin; Aleksandro Da Silva; Guilherme Dornelles; Patricia Wolkmer; Marta Duarte; Bruna Hausen; Manuela Sangoi; Rafael Moresco; Lenita Stefani; Cinthia Mazzantti; Sonia Lopes; Marta Leal

Iron metabolism in hamsters experimentally infected with *Leptospira interrogans* sorovar Pomona: influence on disease pathogenesis

Anderson O. Sobroza^{a*}, Alexandre A. Tonin^a, Aleksandro S. Da Silva^b, Guilherme L. Dornelles^a, Patrícia Wolkmer^a, Marta M.M.F. Duarte^c, Bruna S. Hausen^d, Manuela B. Sangoi^d, Rafael N. Moresco^d, Lenita M. Stefani^{a,e}, Cinthia M. Mazzantti^a, Sonia T.A. Lopes^a,
Marta L.R. Leal^f

^aDepartment of Small Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

^bDepartment of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, Brazil.

^cUniveridade Luterana do Brasil, Santa Maria, Brazil.

^dDepartment of Clinical and Toxicological Analysis, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

^eGraduate Program, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Brazil.

^fDepartment of Large Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

*Corresponding author. phone/fax: +55 55 3220 8819. E-mail address: farmanderson2003@yahoo.com.br (Sobroza, A.O.)

Abstract

Leptospirosis is an infectious fever disease of sudden onset, whose signs can vary from unapparent to severe. Anemia in *Leptospira interrogans* infected individuals is one of the most common complications found in the severe form of the disease. Iron plays an important role in the hematopoietic processes; however, its precise metabolism on individuals with leptospirosis is still unknown. Therefore, the aim of this study was to analyze the classic iron markers associated to the storage process in hamsters experimentally infected by *L. interrogans* serovar Pomona (virulent strain LPF). Four groups with six hamsters each were used; two groups were controls (C7 and C14) and two were experimental groups with infected animals (T7 and T14). Blood samples were collected on the seventh (C7 and T7) and fourteenth days (C14 and T14) post-inoculation (PI). Iron availability was determined in sera samples by the assessment of iron, ferritin, transferrin, and iron binding capacity, whereas the bone marrow was also evaluated for the presence of this metal by *Pearl's* reaction. Additionally, the total antioxidant capacity (TAC) and total oxidant status (TOS) were assessed, along with hepcidin and IL-6 levels. Based on the results, it was possible to observe the onset of an anemic profile, predominantly hemolytic and regenerative. The other parameters showed an increase in seric iron, ferritin, as well as a positive *Pearl's* reaction in animals from the groups T7 and T14 compared with the control groups. Transferrin levels decreased in animals from the group T14 with saturation index, but without statistical difference among all tested groups. TAC was increased in both periods, while TOS was increased only on day 14 PI. Hepcidin and IL-6 were statistically increased on days 7 and 14 PI. Therefore, it was observed that the serum profile from infected animals showed a strong hemolytic pattern, with some demonstration of ferric tissue sequestration when the infection tended to become chronic. The results show that iron metabolism is activated in hamsters infected by *L. interrogans* serovar Pomona, and therefore has participation in the pathogenesis of the disease.

Keywords: Leptospirosis, anemia, ferritin, bone marrow, hemogram, hepcidin, IL-6, TAC, TOS.

1. Introduction

Leptospirosis is a major public health issue in many countries, especially in Latin America and South-East Asia. Estimates indicate that there are more than one million cases of severe leptospirosis per year around the world, with a case fatality rate around 10% (Abela-Ridder et al., 2010). Leptospirosis, caused by pathogenic leptospires, is a worldwide zoonosis, and humans are occasional hosts in a cycle involving wild and domestic animals. Reservoir includes mostly rodents that excrete leptospires in the urine, contaminating surface waters and the environment, thus allowing disease transmission to other animals and humans (Levett, 2001; Bharti et al., 2003; McBride et al., 2005). The genus *Leptospira* includes 20 species and more than 300 serovars, grouped into 20 serogroups (Picardeau, 2013).

Iron is an essential cofactor in many biological processes and required for the growth of most organisms, including *Leptospira* spp. (Faine, 1959). In the animal host, the concentration of free iron is insufficient for bacterial growth, since the majority of the iron is bound to protein carriers with high affinity, such as transferrin, lactoferrin, and ferritin (Bullen, 1981). The low availability of iron is therefore one of the first barriers that bacterial pathogens must overcome in order to survive and to establish infection (Lo et al., 2010).

Anemia is a condition in which the body does not have enough healthy red blood cells. Iron is an important building block for red blood cells and the occurrence of anemia in patients with leptospirosis is well documented (Langston and Heuter, 2003). According to Douglas and Plue (1980) the hemolytic anemia associated with leptospirosis is a consequence of hemolysin actions. However, there is a lack of information about the iron metabolism and its participation during the course of the disease. It is well known that free iron is cytotoxic when in high concentrations, since it is able to catalyze the formation of reactive oxygen species (ROS), which when in excess can cause damage to organic molecules such as lipids, proteins, and DNA (Cherayil, 2010).

Since some carriers of several species exhibit no exacerbated clinical changes, the evaluation of the anemia process in the laboratory might be a helpful tool to a more specific diagnostic. Experimental models using hamsters (*Mesocricetus auratus*) has been described as the ideal to verify *Leptospira* virulence and pathogenicity (Haake, 2006; Silva et al., 2008). Therefore, this study aimed to investigate classic markers related to iron storage in hamsters experimentally infected by *L. interrogans* serovar Pomona, as well as to evaluate and correlate some hematological markers in order to better understand the pathogenesis of leptospirosis.

2. Material and Methods

2.1. Bacterial inoculum

The inoculum consisted of an autochthonous pure culture of *Leptospira interrogans* serovar Pomona (virulent strain LPF). Briefly, 0.5 mL of the pure culture was inoculated intraperitoneally into adult hamsters allowing the re-isolation of the bacteria from livers and kidneys (at a ratio of 1/10 g tissue/mL of distilled water at 28 °C). On the 4th day post-infection (PI), all animals presented lethargy, dyspnea, and red eyes. The animals were anesthetized with isoflurane and humanely euthanized by cervical dislocation.

2.2. Experimental animals

Adult, male hamsters (n=28) with approximately 60 days of age and average weight of 80-96 grams were randomly divided into four groups: two controls (C7 and C14) composed of not-infected animals; and two experimental groups (T7 and T14) consisted of hamsters infected by *L. interrogans* serovar Pomona. They were housed in cages with 7 animals each and placed in an experimental room with controlled temperature and humidity (25°C, 70% RH). The animals went through an adjustment period of 15 days, fed with commercial feed, and water *ad libitum*.

The procedure was approved by the Animal Welfare Committee of Federal University de Santa Maria (UFSM) under number 29/2013 in accordance to Brazilian laws and ethical principles published by the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.3. Serology

Before inoculation of the experimental groups, one animal per group was led by cardiac puncture (0.5 mL/each) for microscopic agglutination tests (MAT), aiming the confirmation of leptospirosis seronegativity. Besides serovar Pomona, a panel with serovars Hardjo, Wolffi, Grippyphosa, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Bratislava, Butembo, Copenhagen, and Australis were used to verify whether the animals were negative for bacteria. The remaining animals (4 groups with 6 animals each) were bled on days 7 and 14 PI in order to verify whether the not-infected animals remained negative and to monitor the seroconversion of the groups T7 and T14.

2.4. Inoculation

The inoculation of *L. interrogans* serovar Pomona (virulent strain LPS) was performed subcutaneously as described by Macedo et al. (2004). Hamsters from T7 and T14 groups were inoculated with 0.5 mL of supernatant containing 20 to 30 leptospire per microscopic field (200X magnification). Animals of the C7 and C14 groups were inoculated subcutaneously with 0.5 mL of saline solution. After the inoculation their body temperature and behavior were monitored twice a day.

2.5. Sample collection and preparation

Samples were collected on days 7 (from the groups C7 and T7) and 14 PI (from the groups C14 and T14), when the animals were anesthetized (with isoflurane) and an average of 5 mL of blood was drawn by cardiac puncture from each animal. An aliquot of 0.5 mL was stored in 10% ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) for hemogram and platelets count (BC 2800 Vet Auto Hematology Analyzer[®]). Blood smears were stained and used for differential count of leukocytes, as well as for morphologic evaluation of red blood cells. The remaining blood was stored in tubes without anticoagulant for to obtain serum for serological tests and iron metabolism evaluation.

2.6. Iron metabolism evaluation

Iron metabolism was accessed through the evaluation of the following parameters: serum iron and latent iron-binding capacity (LIBC) by commercial kits (Labtest, Minas Gerais, Brazil) using a semi-automatic analyzer Bio-2000 (BioPlus Ltda, São Paulo, Brazil). All glassware used in the analysis was soaked into 10% hydrochloric acid for 3 h and rinsed with deionized water (Milli-Q system from Millipore Corporation) prior to use. To measure transferrin and ferritin an automated immunoturbidimetry (Labtest, Minas Gerais, Brazil) was used. Additionally, it was estimated the Transferrin Saturation Index (TSI).

2.7. *Pearl's* reaction

Femur bone marrow was removed for *Pearl's* reaction using the commercial kit Easy Path (Erviagas Ltda., São Paulo, Brazil). Glass slides with bone marrow were fixed with ethanol, soaked in hydrochloric acid and potassium ferricyanide for 30 min, and stained with Carmalumem Mayer dye for 5 min. Each slide were randomly evaluated (100 fields) using light microscopy (1000X). Ferric iron particles were identified as blue dots. The presence of

iron in the bone marrow was categorized as: 1 (macrophages with some intracellular iron), 2 (dispersed macrophages with intracellular iron with small clusters of extracellular iron), 3 (many iron clusters) or 4 (numerous large agglomerates of iron and coalescences). The lack of reaction in the evaluated areas was classified as "0".

2.8. Interleukin-6 and hepcidin serum levels

The IL-6 was quantified by ELISA using the commercial Quantikine Canine Immunoassay kits according to manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). The presence and concentration of the IL-6 were determined by the intensity of color measured by spectrometry by a micro-ELISA reader, Sunrine-Tecan (Tecan, Sunrise, Melbourne, Australia). Serum prohepcidin concentration was measured by ELISA using the DRG Hepcidin Prohormone Enzyme Immunoassay Kit (DRG Instruments, Marburg, Germany), according to the methodology described in detail by Silva et al. (2013).

2.9. Levels of oxidants and antioxidants in the serum

Total oxidation status (TOS) was determined according to the technique described by Erel (2005), which is based on the oxidation of ferrous ion to ferric ion in the presence of various oxidative species in acidic medium and the measurement of the ferric ion by xylenol orange. The results were expressed in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L.

Total antioxidant capacity (TAC) was assessed by the method described by Erel (2004), which is based on bleaching of the characteristic color of a more stable 2,2'-azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid - ABTS) radical cation caused by antioxidants. The results were expressed in mmol Trolox equivalent/L.

2.10. Statistical analysis

Data were subjected to Student's test (t tests) to compare pairs of means. Significance level was 5%. The effect of IL-6 on hepcidin concentration was examined by linear correlation.

3. Results

3.1. Disease progression and hematological parameters

Apparently there was no clinical signs in the control group, unlike the groups infected by *L. interrogans* serovar Pomona, in which the animals showed (on days 7 and 14) signs of hyperthermia, apathy, hypersensitivity to light, and jaundice.

The results of hematological parameters (Table 1) indicated a severe anemia, with the main hematologic indices (erythrocytes, hemoglobin and hematocrit) significantly lower ($P<0.01$) on both periods when compared to the control groups. The Mean Corpuscular Volume (MCV) and the Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC) were also reduced in the infected groups on days 7 ($P<0.01$) and 14 PI ($P<0.01$). Additionally, it was observed signs of bone marrow regeneration, such as anisocytosis and polychromasia in all infected animals. Platelet counts were significantly lower in animal from the group T7 compared to the control groups ($P<0.01$), and at the same time it was observed a striking splenomegaly.

3.2. Parameters of iron metabolism

Iron serum levels were significantly increased ($P<0.01$) in infected animals when compared to the control groups (Table 2). Latent iron-binding capacity (LIBC) and transferrin saturation index (TSI) did not show statistical difference among groups ($P>0.05$). Ferritin levels were significantly increased in the groups T7 and T14 ($P<0.01$) when compared to the controls. Transferrin assessment did not show statistical difference between groups on day 7 PI ($P>0.05$). However, lower values of this protein were observed in the infected group on day 14 PI when compared to the control group ($P<0.05$).

3.3. *Pearl's* reaction

Animals infected by *L. Interrogans* serovar Pomona showed positive *Pearl's* reaction for T7 groups (score "0"=23%; 1+=38%; 2+=39%), T14 (score "0"=19%; 1+=33% / 2+=38%; 3+=10%), when compared to the control groups (score "0"= 78 (C7) to 80% (C14); score 1+=22 (C7) to 20% (C14)).

3.4. Interleukin-6 and hepcidin serum levels

Infected hamsters presented a significant increase ($P < 0.05$) on the levels of IL-6 and hepcidin on days 7 and 14 PI (Figure 1) when compared to the control group. It was found a positive correlation ($P < 0.01$) between serum levels of IL-6 and hepcidin on days 7 ($r = 0.85$) and 14 PI ($r = 0.94$).

3.5. TAC and TOS

It was verified increased levels of TOS on day 14 PI ($P < 0.05$), while levels of TAC were significantly ($P < 0.01$) increased in both periods (Figure 2).

4. Discussion

Leptospirosis is a zoonotic disease which is essentially spread by the urine of infected animals that contaminate the environment. Clinically it can take many forms, from a mild disease which may be difficult to detect, to an outbreak of fatal cases (Adler and Moctezuma, 2010). Signs of disease may differ considerably according to the relation between the serovar-host, the serovar itself and the exposed host. General clinical signs of the disease include fever, anorexia, depression, dyspnea, and anemia. In this study anisocytosis and polychromasia were observed by hemogram, indicating regeneration with an immediate capacity of host response to acute stimulation caused by the infection. According to Jain (1993), it usually occurs 2 to 3 days after the acute hemolytic crisis. In our experiment, the erythrocyte population was distributed from smaller peripheral erythrocytes to younger cells, with a smaller amount of hemoglobin and larger volume.

Platelet counts were also reduced in infected animals associated with a marked splenomegaly. Thrombocytopenia correlates with the seroconversion phase of the disease, also detected by serology, since antibodies may be detected in the blood about 5-7 days after the onset of symptoms (Levett, 2001), and with a massive intravascular hemolysis. Therefore, it is suspected that the process of immunoactivation and recycling of hematic components cause splenomegaly and this change has been responsible for thrombocytopenia, reflecting a mechanism of platelet sequestration. Additionally, Langston and Heuter (2003) reported that the splenic tissue is one of the affected sites due to the replication process of the bacteria. However, on day 14 PI the number of platelets was markedly higher in the infected group compared to the control group. At this time, an intense hemolysis occurred as a response to intensive erythropoietin release. In a study with humans, Stohlawetz et al. (2000) reported that

volunteers with renal disease showed a significant and transient increase in the number of circulating platelets in response to exogenous erythropoietin. In this study, this possible increased release of erythropoietin was not enough to offset the main causal effect of anemia and hemolytic reaction, not reflecting in higher erythrocyte counts, even if it was observed the presence of markers of regeneration in the peripheral blood.

The animals infected with the serovar Pomona showed increased iron serum levels, which may represent an iron-kinetic profile of hemolytic anemia in acute process. Similar behavior in iron concentration was also detected in studies performed by Beaumont and Delaby (2009) and Lee and Beutler (2009) reporting the increase of this element in association with hemolytic anemia after repeated blood transfusions, excessive dietary intake, certain infections, and liver disease. Excess iron present in the organism of infected animals may be a cause of concern if we take into account the ability of catalyzing oxidative reactions that this metal has. Reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals can damage almost all cellular components, including DNA, lipid membranes, and proteins (Halliwell and Gutteridge, 2007). According to Goldstein et al. (1993) the process of reduction of hydrogen peroxide through the Fenton's reaction culminates in the formation of highly reactive and unstable species, such as hydroxyl radical which is directly correlated with the amount of iron bioavailable. In order to prove this possibility of increased ROS we carried out TOS and TAC. Our results showed that the total antioxidant capacity was increased in both periods, while the total oxidant status was increased only on day 14 PI. Cells, tissues, and body fluids have powerful defense systems that help counteract oxidative challenge (Sies, 2007). To maintain a steady-state of metabolites and functional integrity in the aerobic environment, antioxidant defense is organized at three main levels of protection: prevention, interception, and repair (Sies, 1993). Since hamsters are exquisitely susceptible to infection with pathogenic *Leptospira* species (Haake, 2006), we evidenced the development of an acute leptospirosis. During this severe infection process we believe that TAC was able to keep the levels of ROS statistically equal to not-infected animals on day 7 PI. However with the worsening of the disease, TAC was unable (even statistically increased in comparison with the control group) to maintain TOS balanced, probably as a result of the physiologic impairment of these animals at the end of the experiment.

Ferritin results showed higher values for T7 and T14 groups compared to the controls. This result is justified since ferritin is a protein present in the acute phase, acting as an inflammation marker with effect on the iron homeostasis (Cançado and Chiattonne, 2002).

Furthermore, ferritin whose plasma half-life is about 72 hours (Clegg et al. 1980) has an important elevation in diseases that affect the liver tissue (Kim et al., 2012), such as leptospirosis, which aggression of the liver tissue has been well documented (Langston and Heuter, 2003). By the other hand ferritin increase would be considered part of the host defense, since at physiological pH, the major form of iron is $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ with a solubility of approximately 1.4×10^{-9} M (Chipperfield, 2000) which is too low to support microorganism growth. The mammalian host further limits iron to pathogenic bacteria by holding the metal ion as protein-bound iron and most of the free iron is bound to transferrin and lactoferrin and the excess iron is stored as ferritin (Sritharan, 2000). If ferritin levels were increased in our experiment, supporting this theory, transferrin levels were lower in the infected groups on day 14 PI. Transferrin is considered as a negative acute phase marker, and often decreases in liver disease (Elghetany, 2008) or by the excessive loss through the kidneys into the urine (Kriegerbecková, et al., 1993). Therefore, a plausible explanation for transferrin reduction only on day 14 PI is based on the characteristics of leptospirosis progression, since probably at this period the infected animals were on the immunologic phase, where the colonization of the kidneys by the bacteria was active, allowing loss of transferrin through compromised kidneys.

Other mechanisms aimed at depriving iron to the actively multiplying pathogen include increased synthesis of hepcidin and lipocalin, the former inhibiting the release of iron by macrophages and the latter inhibiting bacterial growth by binding to the bacterial siderophores (Weinberg, 2009). In this sense, the levels of hepcidin showed an increased in both periods of evaluation. Hepcidin acts in inhibiting intestinal absorption and release of iron by enterocytes and macrophages (Ohgami et al., 2005), consisting the mediator in the cycle of absorption of iron from the liver and intestines (Dunn et al. 2007). This peptide has the function to connect to ferroportin regulating the export of iron to the plasma. Where concentrations of hepcidin are low, ferroportin molecules are exposed to the plasma membrane and export iron. When hepcidin concentrations increase, this molecule binds to ferroportin inducing its internalization and degradation, and iron released progressively decreases (Ganz, 2007; Nemeth, 2008). The expression of hepcidin is regulated by the state of iron (iron overload increases its expression, while anemia and hypoxia reduce it) along with the inflammatory state, in which IL-6 plays an essential role (Nemeth et al., 2004). Since infected animals in this study presented an anemic pattern in both periods, we decided to assess the levels of IL-6 to justify the increased levels of hepcidin. The results of IL-6

assessment showed an increased level of this cytokine in both periods, may explaining the hepcidin increase as a result of the pro-inflammatory actions of leptospiral infection.

Therefore, based on the results described in our experiment, it is possible to state that during the experimental infection by *L. interrogans* serovar Pomova (virulent strain LPF) occurred a profile of regenerative hemolytic anemia and thrombocytopenia followed by initial and subsequent thrombocytosis. Ferritin has proved to be a good marker of acute inflammatory response related to hemolytic anemia and liver tissue injury caused by leptospirosis. Transferrin levels were consistent with those found in animals with liver and kidney diseases and behaved predictably as negative acute phase protein in infection. The positive correlation between IL-6 and hepcidin helps to clarify the metabolism of iron in leptospirosis because its increase is related to elevation of iron in serum and bone marrow. It is likely that excess iron in the circulation of animals infected by this bacterium has a potential oxidative effect, as demonstrated by the increase levels of TAC/TOS, which can aggravate the clinical acute phase of the disease.

5 References

- Abela-Ridder, B., Sikkema, R., Hartskeerl, R.A., 2010. Estimating the burden of human leptospirosis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 36, 5–7.
- Adler, B., De La Peña M. A., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140, 287-296.
- Bharti A.R., Nally J.E., Ricaldi J.N., Matthias M.A., Diaz M.M., Lovett M. A., 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.* 3757–3771.
- Beaumont, C., Delaby, C., 2009. Recycling Iron in Normal and Pathological States. *Semin. Hematol.* 46, 328-338.
- Bullen, J.J., 1981. The significance of iron in infection. *Rev. Infect. Dis.* 31127–31138.
- Cançado, R. D., Chiattonne, C.S., 2009. Anemia de doença crônica. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 4, 127-136.

- Cherayil, B., 2010. Iron and Immunity: Immunological Consequences of Iron Deficiency and Overload. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 58, 407-415.
- Chipperfield, J.R., 2000. Salicylic acid is not a bacterial siderophore. A theoretical study. *BioMetals*.13, 165-168.
- Clegg, G.A., Fitton, J.E., Harrison, P.M., Treffry A., 1980. Ferritin: molecular structure and iron-storage mechanisms. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 36, 56-64.
- Douglas, E., Plue, R., 1980. Hemolytic anemia suggestive of leptospirosis in the black rhinoceros. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177, 921- 928.
- Erel, O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* 37, 277–285.
- Erel, O., 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem.* 38(12), 1103-1111.
- Elghetany, M.T., Davey, F., 2008. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. In: Henry J.B. *Distúrbios eritrocitários*. 20^a ed. São Paulo. Manole Ltda, 632.
- Faine, S., 1959. Iron as a growth requirement for pathogenic *Leptospira*. *J. Gen. Microbiol.* 20, 246–20251.
- Faine, S., 1994. *Leptospira and Leptospirosis*. Clayton, Australia: CRC Press.
- Faine, S., 2000. *Leptospira and Leptospirosis*. Austrália: Medsci,.272.
- Goldstein, S., 1993. *Free Radical Biol. & Medicine*.15, 435–445.
- Haake D.A., 2006. Hamster model of leptospirosis. *Current protocol in Microbiology*, September: Chapter: unit- 12E.

- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford. 4^oEd., 704.
- Jain, N.C.,1993. Essencial of Veterinary Hematology. In: Lea&Febiger. Evaluation of anemias and polycythemias. Philadelphia. 8, 159-168.
- Kim, C.W., Chang Y., Sung E., Shin H., Ryu S., 2012. Serum ferritin levels predict incident non-alcoholic fatty liver disease in healthy Korean Men. *Metabol.* 61, 1182-1188.
- Langston, C.E., Heuter, K.J., 2003. Leptospirosis: A re-emerging zoonotic disease. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33, 791-807.
- Lee P.L., Beutler E., 2009. Regulation of hepcidin and iron-overload disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 4, 489–515.
- Levett P. N., 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*14, 296-326.
- Lo, M., Murray, G.L., Khoo, C.A., Haake, D.A., Zuerner, R.I., Adler, B., 2010. Transcriptional Response of *Leptospira interrogans* to Iron Limitation and Characterization of a PerR Homolog. *Infect. Immun.*78, 4850–4859.
- Macedo, N.A., Morais, Z.M., Camargo, C.R.A., Alves, C.J., Azevedo, S.S., Júnior, R.N., Vasconcellos,S.A., 2004. Influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e a evolução da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar Pomona. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 41. 194-200.
- McBride A.J., Athanzio D.A., Reis M.G., Ko A.I., 2005. Leptospirosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*18, 376–386.
- Picardeau, M., 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med. Mal. infect.* 43, 1–9.
- Sies H., 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 9, 215-213.
- Sies, H., 2007. Total Antioxidant Capacity: Appraisal of a Concept. *J. Nutr.* 13. 1493-1495.

Silva, E.F., Santos, C.S., Athanazio, D.A., Seyffert, N., Seixas, F.K., Cerqueira, G.M., Fagundes, M.Q., Brod, C.S., Reis, M.G, Dellagostin, O.A., Ko, A.I., 2008. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. *Vaccine*. 26, 3892–3896.

Sritharan, M., 2000. Iron as a candidate in virulence and pathogenesis in mycobacteria and other microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 769-780.

Stohlawetz, P.J., Dzirlo, L., Hergovich, N., Lackner, E., Mensik, C., Eichler, H.G., Kabrna, E., Geissler, K., Jilma, B., 2000. Effects of erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans. *Blood*.95, 2983-298.

Table 1: Mean values and standard deviations (\pm) for hematological parameters in healthy animals (controls) and hamsters experimentally infected by *L. interrogans* serovar Pomona.

Parameter	Days	Control	Infected	P
Erythrocytes ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	07	7.63 \pm 0.15	6.65 \pm 0.16	P<0.05
	14	7.76 \pm 0.99	5.94 \pm 0.32	P<0.05
Hemoglobin (g/dL)	07	15.90 \pm 0.37	12.15 \pm 0.31	P<0.05
	14	16.13 \pm 0.70	10.93 \pm 1.01	P<0.05
Hematocrit (%)	07	48.23 \pm 1.33	40.13 \pm 1.67	P<0.05
	14	48.83 \pm 0.88	35.43 \pm 2.16	P<0.05
MCV (fl)	07	63.18 \pm 0.99	60.33 \pm 1.14	P<0.05
	14	62.93 \pm 0,88	59.60 \pm 2.16	P<0.05
MCHC (%)	07	32.80 \pm 0.25	30.30 \pm 0.87	P<0.05
	14	33.02 \pm 0.67	30.85 \pm 0.34	P<0.05
Platelets ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	07	243.80 \pm 34.60	252.67 \pm 18.61	P<0.01
	14	103.00 \pm 26.37	828.33 \pm 91.24	P<0.01

D7 and D14 (days after infection) Student t test, with statistical and significance levels: MCV - Mean Corpuscular Volume; MCHC - Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration.

Table 2: Mean values and standard deviations (\pm) for iron parameters in not-infected (control) and hamsters experimentally infected by *L. interrogans* serovar Pomona.

Parameter	Days	Control	Infected	P
Serum Iron ($\mu\text{g/dL}$)	07	248.78 \pm 35.53	535.40 \pm 38.60	P<0.01
	14	239.78 \pm 27.51	439.35 \pm 46.50	P<0.01
Ferritin (ng/mL)	07	2.32 \pm 0.34	7.10 \pm 1.65	P<0.01
	14	2.43 \pm 0.58	15.60 \pm 2.88	P<0.01
Transferrin (mg/dL)	07	70.10 \pm 10.00	68.10 \pm 6.43	P>0.05
	14	75.90 \pm 8.90	53.70 \pm 5.22	P<0.05
LIBC ($\mu\text{g/dL}$)	07	359.96 \pm 89.60	328.70 \pm 29.02	P>0.05
	14	365.72 \pm 65.02	437.84 \pm 42.80	P>0.05
TSI (%)	07	50.28 \pm 6.87	55.35 \pm 6.26	P>0.05
	14	50.16 \pm 5.89	57.17 \pm 1.40	P>0.05

D7 and D14 (days after infection) Student t test, with statistical and significance levels: LIBC - latent iron binding capacity, TSI - transferrin saturation index.

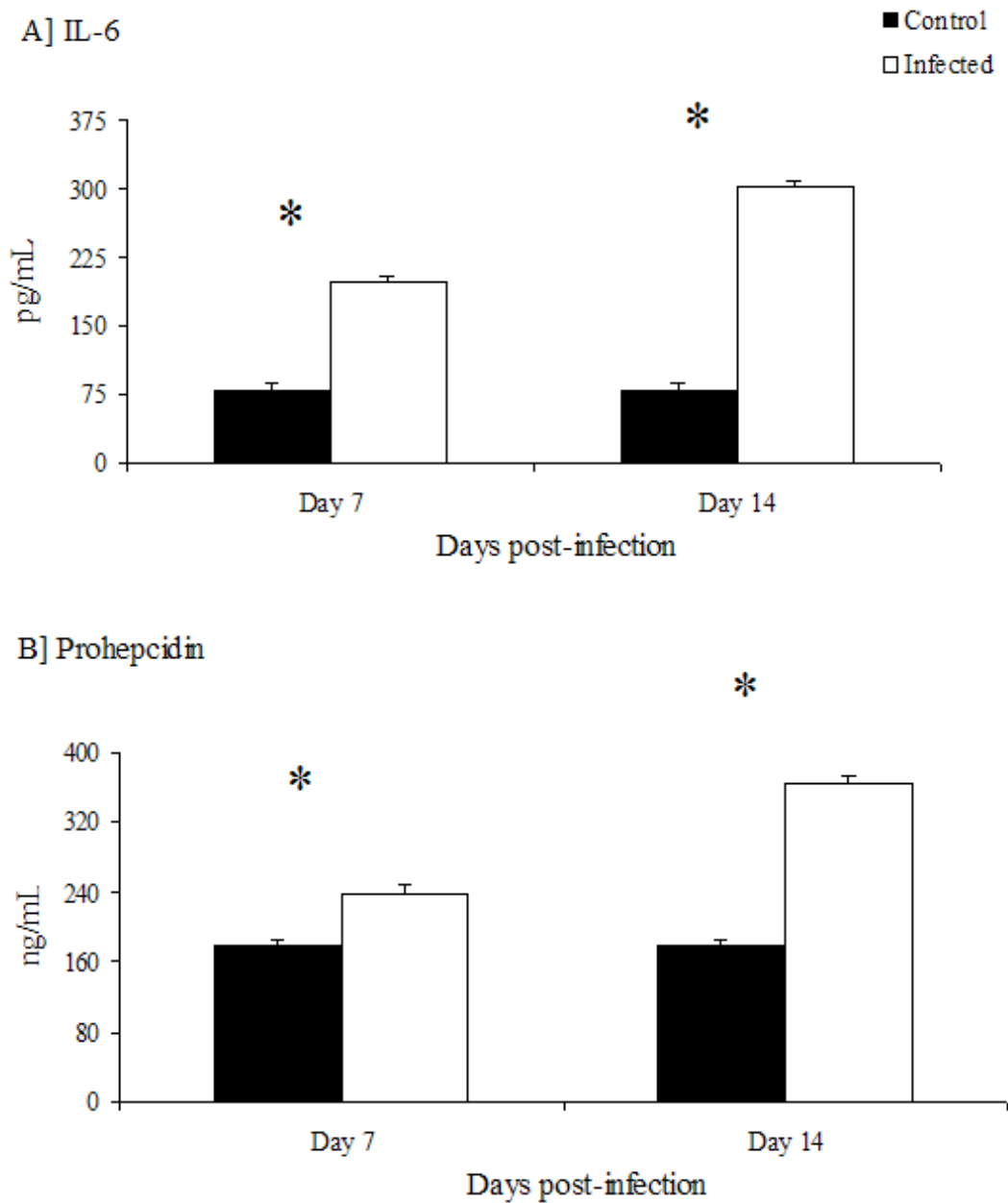


Figure 1: IL-6 and hepcidin levels in serum of hamsters experimentally infected by *Leptospira interrogans* serovar Pomona on days 7 and 14 post-infection (* $P < 0.01$, t test).

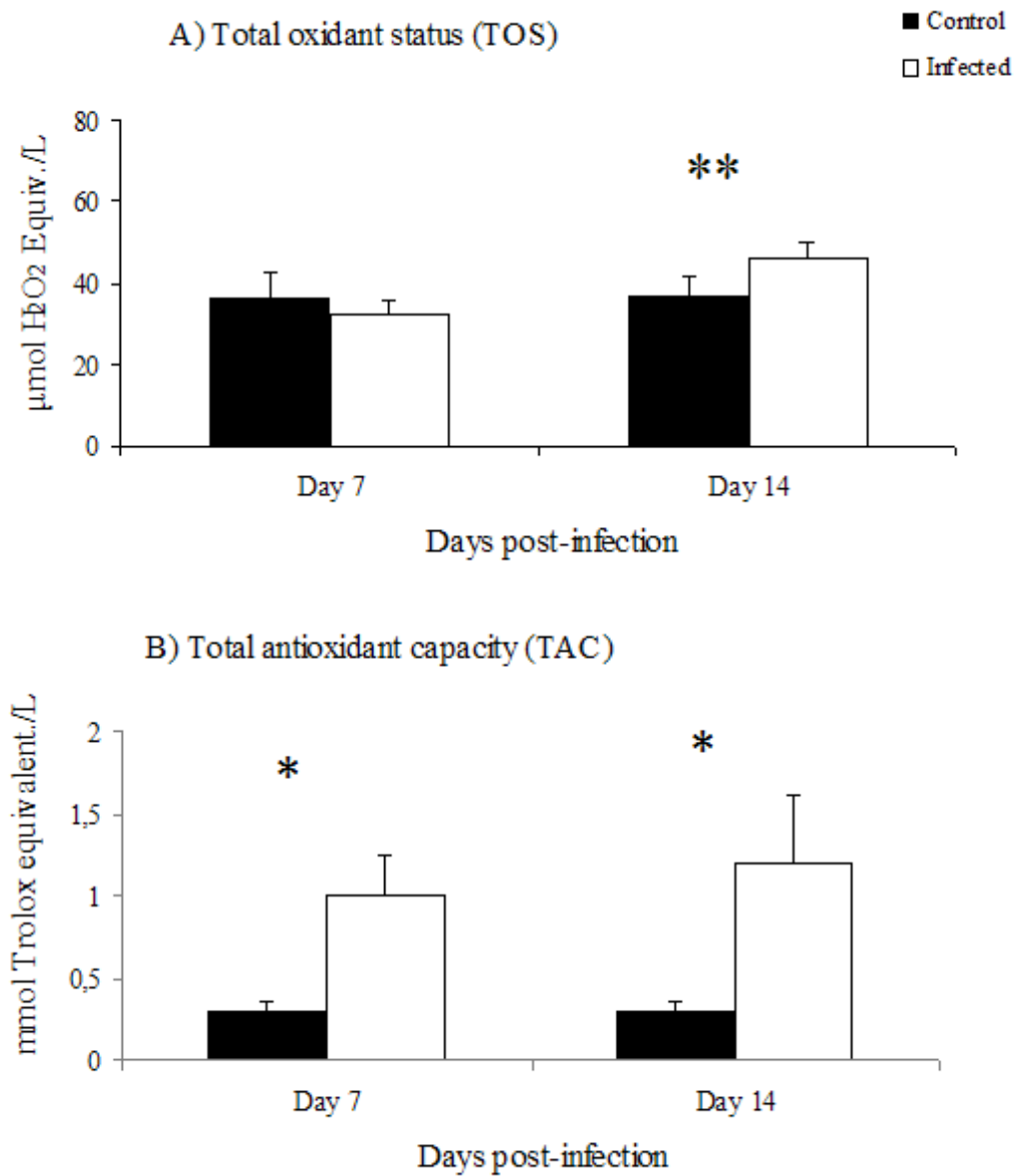


Figure 2: TOS (total oxidant status) and TAC (total antioxidant capacity) levels in serum of hamsters experimentally infected by *Leptospira interrogans* serovar Pomona on days 7 and 14 post-infection (*P<0.01, ** P<0.05; t test).

CONCLUSÕES

Com base nos resultados descritos, é possível ponderar que, em se tratando de um processo extremamente agudo, induzido pela infecção experimental por *L. interrogans*, é provável que o excesso de ferro na circulação de animais infectados por esta bactéria tenha um efeito potencial oxidativo, tal como demonstrado pelo aumento nos níveis de TAC/TOS, o que pode agravar a fase aguda da doença clínica.

Este perfil de inflamação aguda, clinicamente grave se apresenta com um quadro clínico-laboratorial de crise hemolítica com marcada resposta eritróide, com trombocitopenia inicial seguido de trombocitose subsequente. A mensuração de ferritina provou ser um bom marcador de resposta inflamatória aguda, relacionada com a anemia hemolítica causada por leptospirose. Já a transferrina assumiu perfil condizente com doenças hepáticas e renais e se comportou de maneira previsível como proteína negativa de fase aguda na infecção, perceptível no décimo quarto dia. A correlação positiva entre a IL-6 e hepcidina ajuda a esclarecer o metabolismo do ferro em leptospirose, pois o seu aumento está relacionado com a elevação de ferro no soro e medula óssea.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, N. X.; KOHAYAGAWA, A.; CAMPOS, K. C. H. Metabolismo do ferro nos animais domésticos: revisão. **Revista Educação Continuada CRMV/SP**, v.5, p.192-205, 2002.

ALTON, G. D. et al. Increase in seroprevalence of canine leptospirosis and its risk factors, Ontario 1998–2006. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 3, p. 167, 2009.

ASSAR, M. E. et al. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v 65 p. 380–401, 2013.

ATANASIU, V.; MANOLESCU, B.; STOIAN, I. Hepcidin – central regulador of iron metabolism. **European Journal of Haematology**, v.78, p.1-10, 2006.

BETHLEM E. P.; CARVALHO C.R.R. Pulmonary leptospirosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 6, p.436-441, 2000.

BIRNBAUM, N. et al. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. **Journal of small animal practice**, v. 39, n. 5, p. 231-236, 1998.

BOLIN C. A.; PRESCOTT J. F. Leptospirosis. In: HOWARD J.L.; SMITH R.A. **Current veterinary therapy**. 4.ed. Philadelphia. Saunders, v.1, p.352- 357.1999.

CARPENTER, C. E.; MAHONEY, A. Contributions of heme and non-heme iron to human nutrition. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.31, p.333-367, 1992.

CARRILLO-VICO, A. et al. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and antiapoptotic effects. **Journal of Pineal Research**, v 39, p. 400-408. 2005.

CASTRO, J, R. Aspectos epidemiológicos e imunológicos da leptospirose canina no município de Uberlândia, MG. Dissertação (Mestrado)-**Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia, 99 f. 2010.

CHUNG, J.; WESSLING-RESNICK, M. Molecular mechanisms and regulation of iron transport. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v.40, n.2, p.151-182, 2003.

CICERONI, L. et al. Prevalence of Antibodies to *Leptospira* Serovars in Sheep and Goats in Alto Adige–South Tyrol. **Journal of Veterinary Medicine**, Series B, v. 47, n. 3, p. 217-223, 2000.

CLARK, L. K. Epidemiology and management of selected swine reproductive diseases. **Animal Reproduction Science**, v.42, n.1/4, p.447-454, 1996.

COOK, J. D.; BAYNES, R. D.; SKIKNE, B. S. Iron deficiency and the measurement of iron status, **Nutrition Research Reviews**, v.5, p.189-202, 1992.

DOUGLAS, E.; PLUE, R. Hemolytic anemia suggestive of leptospirosis in the black rhinoceros. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 177, n. 9, p. 921, 1980.

DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, Bethesda, n. 82, p. 47-95, 2002.

DUNN, L. L., et al. Iron uptake and metabolism in the new millennium. **Trends in Cell Biology**, v.17, p.93-100, 2007.

ELDER, J. et al. Epidemiological studies on the ecology of *Leptospira interrogans* serovars Pomona and Hardjo in Queensland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 3, n. 6, p. 501-521, 1986.

ERDOGAN, H. M. et al. Serum sialic acid and oxidative stress parameters changes in cattle with leptospirosis. **Veterinary research communications**, v. 32, n. 4, p. 333-339, 2008.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v.37, p. 277–285, 2004.

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, v.38(12), p.1103-1111, 2005.

FAINE, S.; STALLMAN, N. D. Amended descriptions of the genus *Leptospira* *Noguchi* 1917 and the species *L. interrogans* (Stimson 1907) *Wenyon* 1926 and *L. biflexa* (*Wolbach* and *Binger* 1914) *Noguchi* 1918. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, p. 461-463, 1982.

FAIRBANKS, V. G.; BEUTLER, E. Iron metabolism. In: BEUTLER, E. et al. **Williams-Hematology**, 6th ed. New York: Mcgraw-Hill, p.295-304, 2001.

FAVERO, A. C. M. et al. Sorovares de leptospiroses predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, v.32, n.4, p.613-619, 2002.

FIGHERA, R. A., et al. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28(4), p. 223-230, 2008.

FREI, B., STOCKER, R., AMES, B. N. Antioxidant defences and lipid peroxidation in human blood plasma. **Proceeding of National Academy of Science**, v 85, p 9748–9752. 1988.

FREIRE, I. M. A. et al. Distribuição dos serovares de *Leptospira* em caninos clinicamente suspeitos no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.14, n.2, p.83-85, 2007.

GANZ, T. Molecular control of iron transport. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.18, p.394-400, 2007.

GAZI, I. et al. Leptospirosis is Associated with Markedly Increased Triglycerides and Small Dense Low-Density Lipoprotein and Decreased High-Density Lipoprotein. **Lipids**, v. 46, n. 10, p. 953-960, 2011.

GOLDSTEIN, S. et al. **Free Radical Biology. & Medicine**, v. 15, p 435–445,1993.

GREENE, C. E. et al. Leptospirosis In: Infectious Diseases of the Dog and Cat. 3ed. **Saunders Elsevier**, St Louis, cap. 44, p.402-415, 1387p. 2006.

GROTTO, H. Z. Iron metabolism: an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.30(5), p. 390-397, 2008.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4nd Ed., Oxford University Press, Oxford, p704, 2007.

HARVEY, J. W. Erythrocyte metabolism. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**, 5^o ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.125-128, 2000.

HERSHKO, C. Iron, infection and immune function. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 52, p.165-174, 1993.

HILL M. K.; SANDERS, C.V. Leptospiral pneumonia. **Seminars in Respiratory Infections**, v.12, p.44-49, 1997.

HOMEM, V. S. F. et al. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 173-180, 2001.

KEMNA, E. H. et al. Heparin: from discovery to differential diagnosis. **Haematologica**, v.93, p.90-97, 2008.

KNUTSON, M.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.38, n.1, p.61-88, 2003.

KRAUSE, A. et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. **FEBS Letters**, v.480, n.2-3, p.147-150, 2000.

LAGE, G. P. H. A. P. et al. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, 2004.

LANGONI, H., et al. Inquérito soropidemiológico para leptospirose suína. **Congresso brasileiro de veterinários especialistas em suínos**, Anais, p.153. Blumenau, 1995.

LANGONI, H, et al. Anti-*Leptospira* agglutinins in equine sera, from São Paulo, Goiás and Mato Grosso do Sul, Brazil, 1996-2001. **The Journal Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.3. p. 207-218. 2004.

LEVETT P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology**, Rev. 14, p. 296-326. 2001.

MAILLOUX, M. Leptospiroses=Zoonoses. **International Journal of Zoonoses**, v.78, n.12, p.1158-1159, 2001.

MASCOLLI, R. et al. Inquérito sorológico para leptospirose em cães do Município de Santana de Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999. **Arquivos Instituto Biológico**, v. 69, p. 25-32, 2002.

MILLER, D.; WILSON, M.; BERAN, G. Relationships between prevalence of *Leptospira interrogans* in cattle, and regional, climatic, and seasonal factors. **American journal of veterinary research**, v. 52, n. 11, p. 1766, 1991.

MURRAY, G. L., et al. *Leptospira interrogans* requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 7, p. 791-797, 2008.

NEMETH, E. et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **Journal of Clinical Investigation**, v.113, n.9, p.1271-1276, 2004.

PEELING, P. et al. Athletic induced iron deficiency: new insights into the role of inflammation, cytokines and hormones. **European Journal of Applied Physiology**, v.103, p.381-391, 2008.

PESCADOR, et al. Aborto equino por *Leptospira* sp. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.271-274, 2004.

SALVEMINI, D.; CUZZOCREA, S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. **Free Radical Biology and Medicine**, v 33, p. 1173-1185, 2002.

SCANZIANI, E. et al. Serological findings in cases of acute leptospirosis in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, n. 5, p. 257-260, 1994.

SCHUMACHER, Y.O. et al. Effects of exercise on soluble transferrin receptor and other variables of the iron status. **British Journal of Sports Medicine**, v.36, p.195-200, 2002.

SIES H., Strategies of antioxidant defense. **Europe Journal of Biochemistry**, v. 9, p.213-215, 1993.

SIES, H. Total Antioxidant Capacity: Appraisal of a Concept. **The Journal of Nutrition**, v.13, p. 1493-1495, 2007.

SMITH, J. E. Iron metabolism and its disorders. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic Press, p.223-239. 1997.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Clínica e patologia suína**. 2ªed. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, p 464. 1999.

TOCHETTO, C. et al. Aspectos anatomopatológicos da leptospirose em cães: 53 casos (1965-2011). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 5, p. 430-443, 2012.

ZUERNER, R. L., et al. Characterization of outer membrane and secreted proteins of *Leptospira interrogans* serovar Pomona. **Microbial Pathogenesis**, v. 10, n. 4, p. 311-322, 1991.