

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

Ânderson Oliveira Sobroza

**LEPTOSPIROSE EXPERIMENTAL: IgG ANTI-ERITRÓCITOS ,
ALTERAÇÕES HEMOSTÁTICAS E REDUÇÃO DA LESÃO RENAL
POR DEFEROXAMINA**

**Santa Maria, RS, Brasil
2016**

Ânderson Oliveira Sobroza

**LEPTOSPIROSE EXPERIMENTAL: IgG ANTI-ERITRÓCITOS , ALTERAÇÕES
HEMOSTÁTICAS E REDUÇÃO DA LESÃO RENAL POR DEFEROXAMINA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

**Santa Maria, RS, Brasil
2016**

Ânderson Oliveira Sobroza

**LEPTOSPIROSE EXPERIMENTAL: IgG ANTI-ERITRÓCITOS , ALTERAÇÕES
HEMOSTÁTICAS E REDUÇÃO DA LESÃO RENAL POR DEFEROXAMINA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 02 de dezembro de 2016:

Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Aleksandro Schafer da Silva, Dr. (UDESC)

Marta Lizandra do Rêgo Leal, Dr.(UFSM)

Micheli Mainardi Pillati, Dr.(UFSM)

Patricia Wolkmer, Dr^a. (UNICRUZ)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

A minha esposa, Luciana, aos meus pais, Vilson e Selanira e sogros, Luciano e Juliana pelo amor, carinho e apoio incondicionais. Todo o esforço só é justificado pela presença de vocês em minha vida.

A minha orientadora, Prof^ª. Sonia, por todos os ensinamentos pela oportunidade concedida em me orientar, por ter se tornado uma conselheira e amiga, por ter fornecido exemplos de caráter que levarei para toda minha vida.

Aos amigos que fiz no Hospital Veterinário, especialmente à Professora Anne Santos do Amaral, à Professora Cinthia Melazzo de Andrade e a farmacêutica Carla Tomazi, pelo companheirismo e dedicação. A Maria Moro da Rosa, por todo auxílio administrativo durante o Mestrado e Doutorado.

A Dr^aMicheli Pilatt, pela amizade e disponibilidade de atuação no projeto.

Às bolsistas Aline, Érica e Jéssica pelos inúmeros auxílios prestados.

Aos amigos e colegas do laboratório LACVet, cujos nomes evito citar para não correr o risco de ser injusto. Sinto-me privilegiado por ter conhecido, trabalhado e me integrado a esta equipe.

RESUMO

LEPTOSPIROSE EXPERIMENTAL: IgG ANTI-ERITRÓCITOS , ALTERAÇÕES HEMOSTÁTICAS E REDUÇÃO DA LESÃO RENAL POR DEFEROXAMINA

AUTOR: Ânderson Oliveira Sobroza

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Sonia Terezinha Dos Anjos Lopes

Leptospirose aguda tem grande parte de suas manifestações clínicas em função da lesão vascular com dano às células endoteliais proporcionada pela infecção. Febre, icterícia, insuficiência renal, nefrite, anemia hemolítica, hemoglobinúria, e hemorragia pulmonar fatal são características clínicas relevantes. A lesão é provavelmente devida a depósitos de complexos imunes nos pequenos vasos dos órgãos acometidos. A ativação da resposta imune determina a liberação de diversos fatores humorais, gerando o processo inflamatório. Mecanismos oxidativos estão diretamente envolvidos e se correlacionam com alterações no metabolismo do ferro durante a doença. O tecido renal é fortemente afetado pela infecção. No entanto, os mecanismos envolvidos na anemia, com ou sem hemólise, trombocitopenia relacionada ou não com sangramento clínico e fisiopatologia antioxidante renal durante a infecção aguda estão poucos compreendidos. O objetivo deste trabalho foi determinar, em um primeiro experimento, a presença de imunoglobulinas associadas à parede dos eritrócitos e plaquetas, estabelecer a magnitude do envolvimento de micropartículas plaquetárias e sua relação com marcadores laboratoriais clássicos de hemostasia. Para tanto foram utilizados, 18 animais, machos, com 60 dias divididos em 2 grupos (6 controles saudáveis e 12 infectados por inoculação experimental com *Leptospira interrogans* Sorovar Canicola), os quais tiveram amostras de sangue coletadas no 4º dias pós infecção experimental. Num segundo experimento objetivou-se avaliar o efeito antioxidante e histoprotetor de deferoxamina em nível de tecido renal, utilizando 18 animais, divididos em 4 grupos : C e CT (controle e controle tratado) 3 animais cada, I e IT (infectado e infectado tratado) 6 animais cada, os quais foram submetidos à mesma inoculação. Os animais dos grupos CT e IT receberam 50mg/kg de deferoxamina nos dias -1, 0, 1, 2 e 3. Fez-se a coleta de sangue para dosagens séricas de metabolismo férrico e a eutanásia foi realizada também no 4º dia pós infecção. Tecido renal foi submetido à avaliação de lesão oxidativa, status antioxidante e inflamatório e avaliação histopatológica. Os animais infectados apresentaram sangramento clínico, decréscimo na contagem de plaquetas, alterações nos parâmetros hemostáticos (aumento de TP, TTPA, e decréscimo de fibrinogênio) aumento de micropartículas plaquetárias e aumento da IgG anti-eritrocitária. O tratamento com deferoxamina proporcionou redução de dano renal avaliada por TBARS, razão GSSH/GSSG e acetilcolinesterases teciduais. Avaliação histopatológica mensurou a agressão tecidual causada pela infecção e apontou proteção, sobretudo em nível tubular, por deferoxamina. Foi possível concluir, portanto, que a infecção experimental provoca alterações importantes do ponto de vista fisiopatológico demonstrando envolvimento do sistema imune em nível eritrocitário pré-hemolítico e que fatores imunomediados não parecem estar correlacionados com a trombocitopenia. Há envolvimento de micropartículas na modulação de resposta trombótica e, ainda, deferoxamina apresentou importante ação antioxidante, antiinflamatória e histoprotetora no tecido renal.

Palavras chave: Leptospirose, anemia, trombocitopenia, quelante, histopatologia renal.

ABSTRACT

EXPERIMENTAL LEPTOSPIROSIS: ANTI-ERYTHROCYTE IgG, HEMOSTATIC CHANGES AND REDUCTION OF RENAL INJURY BY DEFEROXAMINE

AUTHOR: Anderson Oliveira Sobroza
ADVISER: Prof^a. Dr^a. Sonia Terezinha Dos Anjos Lopes

Acute leptospirosis has a large part of its clinical manifestations as a function of the vascular injury with endothelial cell damage provided by the infection. Fever, jaundice, renal failure, nephritis, hemolytic anemia, hemoglobinuria, and fatal pulmonary haemorrhage are relevant clinical features. The lesion is probably due to deposits of immune complexes in the small vessels of the affected organs. The activation of the immune response determines the release of several humoral factors, generating the inflammatory process. Oxidative mechanisms are directly involved and correlate with changes in iron metabolism during disease. Kidney tissue is strongly affected by infection. However, the mechanisms involved in anemia, with or without hemolysis, thrombocytopenia related to non-clinical bleeding, and renal antioxidant pathophysiology during acute infection are poorly understood. The objective of this work was to determine, in a first experiment, the presence of immunoglobulins associated with the erythrocyte and platelet wall, to establish the magnitude of the involvement of platelet microparticles and its relation with classic laboratory hemostasis markers. For this purpose, 18 male animals were used, with 60 days divided into 2 groups (6 healthy controls and 12 infected by experimental inoculation with *Leptospira interrogans* Sorovar Canicola), which had blood samples collected on the 4th day after experimental infection. In a second experiment the objective was to evaluate the antioxidant and histoprotective effect of deferoxamine at renal tissue level. Also, 18 animals were submitted to the same inoculation, divided into 4 groups: C and CT (control and treated) 3 animals each, I and IT (infected and infected treated) 6 animals each. Animals of the CT and IT groups received 50mg / kg of deferoxamine on days -1, 0, 1, 2 and 3. Blood was collected and serum dosages of ferric metabolism and euthanasia were also performed on the 4th day post infection. Renal tissue was submitted to evaluation of oxidative lesion, antioxidant and inflammatory status and histopathological evaluation. Infected animals presented clinical bleeding, decreased platelet count, changes in hemostatic parameters (increase in PT, APTT, and decrease in fibrinogen), increase in platelet microparticles and increase in anti-erythrocyte IgG. Treatment with deroxamine provided reduction of renal damage assessed by TBARS, GSSH / GSSG ratio, tissue acetylcholinesterase. Histopathological evaluation measured the tissue aggression caused by the infection and pointed to protection, at the tubular level, by deferoxamine. It was possible to conclude, therefore, that the experimental infection causes important changes from the pathophysiological point of view demonstrating involvement of the immune system in the pre-hemolytic erythrocyte level and that immune-mediated factors do not seem to be correlated with thrombocytopenia. There is involvement of microparticles in the modulation of thrombotic response and, furthermore, deferoxamine presented an important antioxidant, antiinflammatory and histoprotective action in renal tissue.

Key words: Leptospirosis, anemia, thrombocytopenia, chelation, renal histopathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1. Ciclo da Leptospirose, envolvendo roedores, animais selvagens, domésticos e humanos (Fonte: Nature Reviews Microbiology 7, 736-747, Outubro de 2009).....14

Figura 2. Mecanismo imune de envolvimento de anticorpos (Ab) e Sistema Complemento na hemólise imunomediada, destacando a opsonização, lise osmótica e eritrofagocitose. (Fonte: adaptado: COCO e SUNSHINE, 2009).....16

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).....19

Figura 4. Estrutura química de deferoxamina.....20

ARTIGO

Figura 1. Esquema para identificação de populações plaquetárias *dot-plot* SSC (dispersão lateral, granularidade) versus FSC (dispersão direta, tamanho de célula) demonstrando a população de plaquetas e as beads de 2 μm . Histograma mostrando a intensidade de fluorescência na detecção do canal FL1 da amostra incubada com anticorpo anti-CD61 FITC (marcador plaquetário; linha preta) e uma amostra negativa não exposta ao anticorpo (cinza). As análises foram realizadas com o software Flowjo V1031

Figura 2. C3, IgG e IgM ligados a plaquetas em hamsters experimentalmente infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola no dia 4 pós-infecção. Gráficos em *dot plots* exemplificam o *gate* de plaquetas marcadas com C3, IgG e IgM em hamsters controles e infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola. Gráficos mostrando média e desvio padrão (Student's t-test- * p <0,05). As análises foram realizadas no software Flowjo V1033

Figura 3. Correlação linear: Plaquetas *versus* Fibrinogênio em hamsters infectados por *Leptospira interrogans* serovar Canicola no dia 4 pós-infecção (R = 0,84, P <0,001)34

Figura 4: C3, IgG e IgM ligados a eritrócitos em hamsters experimentalmente infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola no dia 4 pós-infecção (* P <0,05, ** P <0,001, teste t). Gráficos em *dot plots* exemplificam o *gate* de eritrócitos marcados com C3, IgG e IgM em hamsters controles e experimentalmente infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola. Gráficos mostrando média e desvio padrão (Student's t-test- * p <0,05; ** p <0,01). As análises foram realizadas no software Flowjo V1034

MANUSCRITO

Figura 1: Histopatologia tubular renal (Hematoxilina Eosina 200X) A: Animal do grupo C, conservando aspecto fisiológico de glomérulos e túbulos contorcidos, B: Animal do grupo IT: Túbulos contorcidos com leve edemaciamento, degeneração em alguns segmentos tubulares e C: Animal do grupo I: Túbulos contorcidos edemaciados e com a estrutura tubular necrosada ou em degeneração. glomérulos edemaciados, com o espaço urinário desestruturado e comprometido pela presença de eritrócitos.....61

Figura 2: Efeitos da deferoxamina (50 mg / Kg) em: **A:** Acetilcolinesterase renal, **B:** TBARS e **C:** relação de GSH / GSSG no rim. Os dados são expressos como % do controle. Cada barra representa a média ± Desvio Padrão. A média para uma variável com sobrescritos sem uma letra comum difere por ANOVA bidirecional, seguida pelo teste post-hoc de Newman Keuls (p <0,05).....62

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1. Média e desvios-padrão (\pm) para parâmetros de coagulação em animais saudáveis (controles) e hamsters experimentalmente infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola. Teste t de Student, com nível estatístico de significância32

Tabela 2. Média e desvio-padrão (\pm) para os parâmetros sem diferença estatística entre animais saudáveis (controles) e hamsters experimentalmente infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola. Teste t de Student, com nível estatístico de significância33

MANUSCRITO

Tabela1. Média e Desvio Padrão (\pm) para parâmetros do Ferro, Creatinina e Eritrograma com valor de P destacando a inexistência de diferença entre os grupos I e IT.....61

Tabela 2. Avaliação do tecido renal de hamsters infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola. DNTA: degeneração e necrose tubular aguda; PT: proteinose tubular; PCIT: presença de cilindros proteináceos intratubulares; HIT: hemorragia intratubular; H: hiperemia; NTI: nefrite tubulointersticial linfoplasmocitária; PNIT: presença de neutrófilos intratubulares; PMPEB: presença de material protéico (proteinose) no espaço de Bowman; -: ausência de lesão; +: lesão mínima; ++: lesão leve; +++: lesão moderada; ++++: lesão acentuada63

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 ARTIGO	22
Anti-erythrocyte IgG in hamsters with acute experimental infection by <i>Leptospira interrogans</i> serovar Canicola	23
Abstract	24
1. Introduction	24
2. Material and Methods	26
2.1. Experimental model	26
2.2. Virulence recovery, inoculum, inoculation process and success of experimental infection	26
2.3. Sampling and auxiliary analysis	27
2.4. Antibodies and C3 detection on the surface of erythrocytes	28
2.5. Determination of the percentage of reticulocytes	29
2.6. Antibodies and C3 detection on the surface of platelets	29
2.7. Reticulated platelet count	29
2.8. Determination of microparticles marked by CD61	30
2.9. Statistical analysis	31
3. Results	31
3.1. Clinical evaluation, characteristics of autopsy and cultures	31
3.2. Hematology	31
3.3. Platelet immunoglobulins, coagulation tests, CD61 ⁺ microparticles and reticulated platelets	32
3.4. Erythrocyte immunoglobulins, C3 erythrocyte and reticulocyte	34
3.5. Serum immunoglobulins	35
4. Discussion	35
5. Acknowledgments	38
6. References	42
3 MANUSCRITO	23

Redução da lesão renal em hamsters com infecção aguda por <i>Leptospira interrogans</i> Sorovar Canicola tratados com deferoxamina	43
Resumo.....	43
Abstract.....	44
Introdução	45
Material e Métodos.....	47
Desenho experimental	47
Ativação da virulência, inóculo bacteriano, inoculação, sucesso da infecção experimental e tratamento	48
Coleta de material, hematologia, ferro sérico e análises bioquímicas	49
Avaliação histopatológica renal	50
Lesão inflamatória, oxidativa e status antioxidante.....	50
Análise Estatística	51
Resultados e Discussão.....	52
Comitê de ética	57
Referências.....	57
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
5 REFERÊNCIAS.....	66

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de ARTIGO e MANUSCRITO. Essa tese de Doutorado está organizada seguindo a estrutura e apresentação de monografias, dissertações e teses (MDT) 2015. O item CONSIDERAÇÕES FINAIS, encontrado no final da tese, apresenta as interpretações discutidas sob um ponto de vista que buscou estabelecer uma conectividade entre os objetivos e resultados obtidos no artigo e manuscrito contidos neste trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS se referem somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO e CONSIDERAÇÕES FINAIS desta tese.

O artigo e o manuscrito estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas para as quais foram submetidos:

Artigo: Microbial Pathogenesis.

Manuscrito: Ciência Rural.

Os trabalhos descritos nesta tese foram desenvolvidos no Laboratório de Análises Clínicas Veterinária (LACVet) e Laboratório de Bioquímica e Estresse Oxidativo (BioOx) sob a coordenação da Prof^a. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes e Prof^a. Cinthia Melazzo de Andrade.

1. INTRODUÇÃO

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, os representantes patogênicos deste gênero utilizam ferro como fator de crescimento, 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. Lesão vascular com dano às células endoteliais de capilares é a causa básica das manifestações clínicas na doença aguda. Febre, icterícia, insuficiência renal, nefrite, anemia hemolítica, hemoglobinúria, e hemorragia pulmonar fatal são características clínicas relevantes (GAZI et al., 2011). A lesão é provavelmente devida a depósitos de complexos imunes nos pequenos vasos dos órgãos acometidos. A ativação da resposta imune determina a liberação de diversos fatores humorais, gerando o processo inflamatório (BETHLEM e CARVALHO, 2000). São conhecidos mais de 250 sorotipos de *Leptospira interrogans*, com possibilidade de que muitos sorotipos sejam endêmicos em determinadas áreas (SRIKRAM et al., 2011).

Leptospirose é um problema de saúde pública de grande importância em muitos países, especialmente na América Latina e no Sudeste Asiático. Estimativas indicam uma ocorrência de mais de um milhão de casos de leptospirose humana grave por ano em todo o mundo, com uma taxa de letalidade em torno de 10% (ABELA-RIDDER et al., 2010). A infecção tem características zoonóticas, os seres humanos são hospedeiros ocasionais em um ciclo (Figura 1) envolvendo animais selvagens e domésticos. 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). Roedores são os principais reservatórios por

excretarem a bactéria na urina contaminando o ambiente e permitindo assim que a doença seja transmitida a outros animais e seres humanos (LEVETT, 2001).

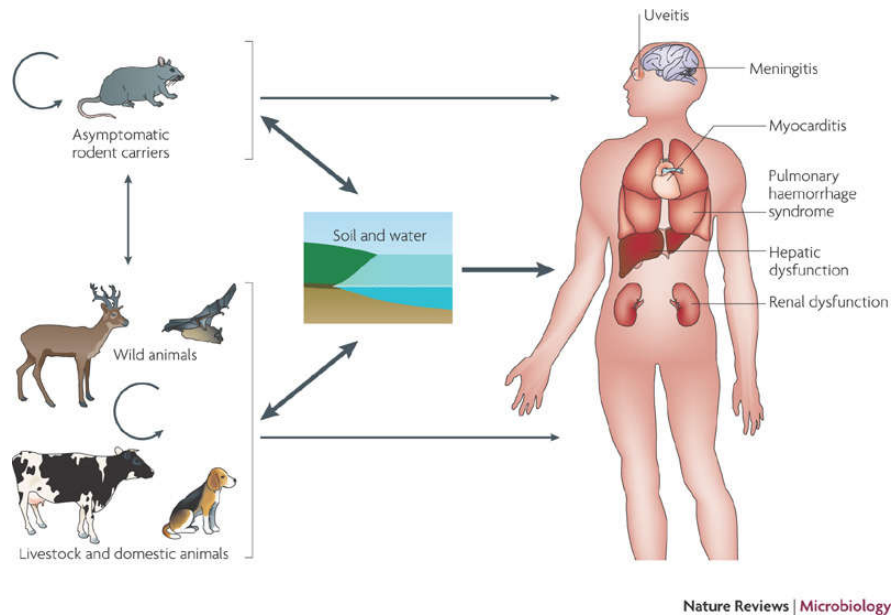


Figura 1. Ciclo da Leptospirose, envolvendo roedores, animais selvagens, domésticos e humanos (Fonte: Nature Reviews Microbiology 7, 736-747, Outubro de 2009)

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 e PRESCOTT, 1999). Em humanos, a bactéria penetra na mucosa ou pele não íntegras, dissemina-se pela corrente sanguínea, atingindo todos os órgãos. 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. Na Região Sul do Brasil os sorovares Icterohaemorrhagiae e Canicola são frequentemente isolados (FAVERO et al., 2002; FREIRE et al., 2007).

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 4º doença infecciosa mais frequentemente

diagnosticada, com prevalência de 6,4%, na Mesorregião Centro Ocidental Rio-Grandense. Os cães são reconhecidos como hospedeiros de manutenção global para o sorovar Canicola, e nas regiões urbanas, cães errantes apresentam grande importância do ponto de vista epidemiológico, atuando como principal reservatório deste sorovar (HARTSKEERL et al., 2011).

Outros trabalhos (CASTRO, 2011) apontam 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 intensa pluviosidade da região onde o estudo foi conduzido. De toda forma, o sorovar Canicola, em diversos estudos com espaços temporais e localizações diversas, apresenta importante correlação com a infecção em cães, uma vez que entre os cães está mais adaptado (ADLER e DELA PEÑA, 2010) com importância expressiva na área urbana e, por conseguinte, também com infecções humanas graves.

O conceito de que a anemia hemolítica associada com leptospirose é devida à produção de hemolisinas com atividade de fosfolipase (DOUGLAS e PLUE, 1980) tem sido firmado como base teórica já há algum tempo, no entanto, investigações mais detalhadas sobre mecanismos autoimunes e o envolvimento de mecanismos não hemolíticos na fisiopatologia de instalação da anemia na doença aguda tem sido negligenciados. As propriedades físicas dos eritrócitos favorecem o seu envolvimento nas reações de hipersensibilidade do tipo II (Figura 2). Sua superfície contém um arranjo complexo de antígenos de grupos sanguíneos que podem torná-los alvos de respostas de anticorpos, como ocorre comumente nos casos de reação transfusional ou doença hemolítica. Além do mais, as propriedades bioquímicas dos eritrócitos podem torná-los propensos a absorver substâncias como fármacos ou componentes antigênicos de agentes infecciosos ou tumores. Nessas situações, os eritrócitos podem se tornar o alvo direto como consequência de alterações nas proteínas de superfície reconhecidas como estranhas, ou atingidos indiretamente se existir resposta humoral à substâncias próprias (ZACHARY e McGAVIN, 2013).

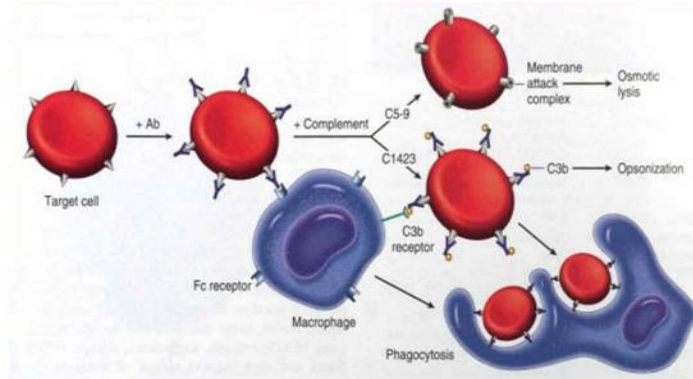


Figura 2. Mecanismo imune de envolvimento de anticorpos (Ab) e Sistema Complemento na hemólise imunomediada, destacando a opsonização, lise osmótica e eritrofagocitose. (Fonte: adaptado: COCO e SUNSHINE, 2009).

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) surge do desenvolvimento de anticorpos IgG ou IgM dirigidos contra a membrana dos eritrócitos. O grau de lise dos eritrócitos depende do tipo e da quantidade de anticorpos que se ligam à célula, e do envolvimento de fixação do complemento. A maioria dos casos de AHIM são resultado da ligação da IgG e do complemento aos eritrócitos (McCULLOUGH, 2003; GERSHWIN, 2010). A IgG possui dois locais de ligação ao antígeno (monoméricos) e geralmente não pode aglutinar diretamente os eritrócitos, a não ser que uma grande quantidade de anticorpo esteja presente. Quando uma molécula de IgG se liga ao eritrócito, ele é fagocitado por macrófagos que possuem múltiplos receptores para a porção de fragmento constante (FC) da molécula de IgG. Esses macrófagos são encontrados principalmente no baço, desse modo, a eritrofagocitose ativa resulta em esplenomegalia. Com o aumento na produção de imunoglobulinas, mais moléculas são ligadas aos eritrócitos, ocorrendo eritrofagocitose no fígado, o que resulta em hepatomegalia. Já, a IgM é uma molécula grande pentamérica que aglutina eritrócitos. A molécula de IgM ligada ao eritrócito pode permitir a ligação da serina C1, e a cascata do complemento é ativada. Após ativação do complemento, a IgM pode se descolar e se ligar a outros eritrócitos. O complexo eritrócito-IgM pode se ligar ao complemento e ser fagocitado por macrófagos no fígado (McCULLOUGH, 2003).

A ativação do sistema de complemento e a ligação das proteínas do complemento nos eritrócitos desempenham papéis fundamentais na AHIM. O

complemento pode causar lise intravascular imediata ou lise extravascular com produção de esferócitos. A C1 entra na cascata do complemento e, através de uma série de reações enzimáticas, gera o “complexo de ataque à membrana” (C8C9C5bC6C7) que se liga à membrana dos eritrócitos. Esse complexo de ataque à membrana resulta na formação de poros na membrana dos eritrócitos permitindo o fluxo de água e eletrólitos, que causa inchaço e lise celular na circulação (lise osmótica). O complexo C3b quando ligado na membrana do eritrócito pode ocasionar a lise dessas células ou fagocitose parcial de sua membrana por macrófagos localizados no baço, produzindo esferócitos (McCULLOUGH, 2003; WEISS e WARDROP, 2010).

Trombocitopenia chega a ocorrer em 50 a 80% dos acometidos por leptospirose, sempre relacionada à severidade da doença e pode ser, ao menos parcialmente, explicada por uma destruição/consumo periférico ou diminuição da trombopoiese, por possível efeito inibitório da bactéria, ou ainda a associação desses fatores. Estudos que relacionam a possibilidade de consumo exagerado por ocorrência de coagulação intravascular disseminada (CID) são contraditórios (EDWARDS et al., 1982; TSE et al., 2002). Não raro, há tentativas, por vezes frustradas, de aplicação de um escore para se supor a ocorrência de CID em associação com leptospirose grave. A trombocitopenia imunomediada (TIM) é uma condição caracterizada pela destruição imunomediada das plaquetas e pode ser classificada em primária ou secundária. Os animais acometidos apresentam diferentes graus de tendência clínica a sangramento. A TIM, por vezes, ocorre juntamente com a AHIM, condição conhecida como *Síndrome de Evans*. A TIM é classificada como secundária quando há uma clara associação entre trombocitopenia e uma condição subjacente, como neoplasias, agentes infecciosos, drogas e outras doenças imunomediadas. Diversos agentes infecciosos como vírus, bactérias, fungos e protozoários são associados à TIM, muitos dos quais também podem causar trombocitopenia por outros mecanismos (ZACHARY e McGAVIN, 2013).

O aumento de imunoglobulinas associadas à superfície das plaquetas em pacientes com patologias suportam o envolvimento de componente imunológico à trombocitopenia, muito embora, isso possa ser evidência insuficiente para concluir que o distúrbio subjacente deva ser considerado causa definitiva de TIM secundária (WEISS e WARDROP, 2010). A patogenia da TIM causada por

agentes infecciosos geralmente é multifatorial ou de causa desconhecida. A TIM associada à infecção pode ser causada por reação cruzada de anticorpos, produção de autoanticorpos induzida por bactérias, exposição de antígenos normalmente ocultos na membrana plaquetária pelo organismo, ligação de anticorpos antimicro-organismo ao agente infeccioso ligado à membrana plaquetária ou indução de imunocomplexos que se aderem à membrana plaquetária (STOCKHAM e SCOTT, 2011). Trombocitopenia causada por agentes infecciosos pode ser decorrente de diferentes combinações como, depleção na produção de plaquetas, modificações na distribuição das plaquetas, acréscimo do consumo, destruição imunomediada e não imunomediada. Trombocitopenia tem sido uma característica constante da leptospirose grave e, por vezes, é relacionada à ocorrência de coagulação intravascular disseminada (CHIERAKUL et al., 2008). Trombocitopenia também tem sido utilizada como ferramenta de mau prognóstico, mesmo isoladamente, em leptospirose aguda (TURGUT et al., 2002).

Micropartículas (MPs), cujo aumento tem sido alvo de estudos em sepse e em doenças que cursam com ativação da cascata de coagulação, à exemplo de leptospirose aguda, são definidas como uma população de vesículas originadas de diferentes tipos celulares após ativação ou apoptose, possuindo um tamanho entre 50 nm e 1000 nm e contendo material celular, como proteínas, mRNA e lipoproteínas, que são fundamentais para sua identificação por citometria de fluxo (MALLAT et al., 2000). Todas as células sanguíneas produzem MPs, e as plaquetas liberam a maior quantidade de MPs circulantes, correspondendo a 70%-90% do total de MPs no plasma de indivíduos saudáveis (BERCKMANS et al., 2001; VASINA et al., 2013). Micropartículas derivadas das plaquetas estão envolvidas na coagulação sanguínea, participam da patogênese da aterosclerose, injúria vasculares na inflamação e na proliferação de células ósseas. De outra parte, a capacidade de formar MPs é essencial para fisiologia da coagulação, um defeito neste via leva à *Síndrome Scott* em seres humanos, que equivale na medicina veterinária, a um distúrbio hemorrágico hereditário que acomete cães da raça pastor alemão, que tem como característica falta de atividade pró-coagulante das plaquetas. Aumento de MPs derivadas de plaquetas tem sido observado em pacientes humanos com hipertensão pulmonar (HERRING et al., 2013). Utilizando tecnologia e técnicas adequadas, as MPs, quando marcadas por CD 61,

juntamente com anexina como marcador de apoptose, são uma importante ferramenta e podem ser elucidativas em estudos de patogenia quando a atenção é voltada para fenômenos de ativação e consumo plaquetários (FRANÇA et al., 2015).

Leptospirose é considerada uma doença mediada por toxinas, conduzindo a peroxidação lipídica, já que lipopolissacarídeos de sua membrana desempenham um importante papel na citotoxicidade (LEVETT, 2001). A toxemia ativa mecanismos celulares de defesa antioxidante tais como a glutatona, 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).

Eventos hemolíticos, em determinadas situação inflamatórias/infecciosas, culminam com elevado aporte de ferro, e desbalanço em sua capacidade de internalização. O excesso de ferro biodisponível no organismo pode ser motivo de preocupação se levado 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 e 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.

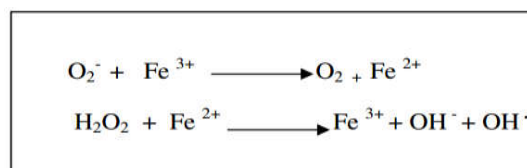


Figura 3- Reação de Fenton: Ânion Radical Superóxido (O_2^-) reage com Fe férrico (Fe^{3+}), liberando oxigênio e Fe Ferroso (Fe^{2+}), o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) reage com Fe Ferroso formando Fe Férrico e Radical Hidroxila ($\text{OH}\cdot$).

A Deferoxamina (DFX) (Figura 4) é um potente quelante férrico e pode inibir reações geradoras de espécies reativas de oxigênio, catalisadas por ferro. Já não é novo o conhecimento científico acerca de que DFX pode diminuir dano oxidativo em modelos animais em diversas doenças (HALLIWELL, 1987; HALLIWELL, 1989). Em cérebro de ratos adultos, a administração de DFX protege contra danos da isquemia focal quando dada 72 horas antes da agressão isquêmica (PRASS et al., 2002). Park et al. (2006) relataram que pré-tratamento subcutâneo com DFX diminui a peroxidação lipídica cerebral em ratos tratados com metanfetamina. DFX protege contra injúria isquêmica em cérebro de ratos neonatais quando administrada após a reperfusão (MU et al., 2005), resultados que despertam interesse de investigações sobre o efeito histoprotetor e antioxidante em situações agudas como o da leptospirose experimental em hamsters.

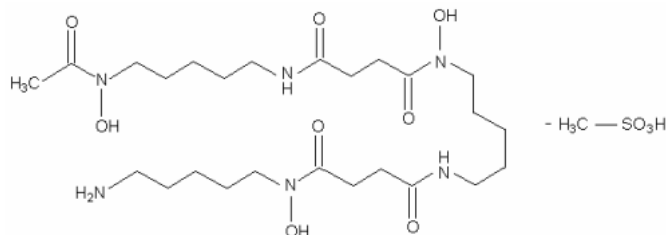


Figura 4. Estrutura química de deferoxamina.

Tentativas de investigações em doenças infecciosas, como malária, tem encontrado alguns resultados positivos (TRAORE et al., 1991; BUNNAG et al., 1992; ISAH e IBRAHIM, 2014). Em infecções bacterianas de características mais crônicas, como *Helicobacter pylori*, no entanto, os resultados foram menos expressivos em modelos animais (HUYNH et al., 2009). Muito embora, nesses estudos, a hipótese científica gira em torno da necessidade de ferro por parte do microorganismo. A utilização de quelante visa privar o agente infectante do metal, assim, esses pesquisadores sugerem que essa privação prejudique os processos vitais de tal agente. Em leptospirose aguda, é bastante frequente hemólise intensa. A capacidade do quelante, em atenuar os efeitos citotóxicos do ferro livre proveniente da lise eritrocitária e destruição de estruturas como tecido renal não

tem sido alvo de investigações, ponderando-se que esta bactéria também se demonstra ávida pelo metal, como concorda o fato de possuírem heme oxigenases (MURRAY et al., 2008).

A prevalência de Insuficiência Renal Aguda provocada por leptospirose em humanos está entre 10-60%, variando principalmente em função da idade do paciente e da severidade da infecção (VISITH e KEARKIAT, 2005). Em cobaias infectadas experimentalmente, nefrite focal intersticial foi detectada no quarto dia, e a lesão tubular progrediu até o sexto dia com perda de coesão celular epitelial (ALVES et al., 1991). Resultados semelhantes foram observados em seres humanos (DE BRITO et al., 2006). O tecido renal, por essas características e seu envolvimento na patogenia da doença, apresenta-se como um marcador sensível de leptospirose aguda, em análises histopatológicas.

Lenvando-se em consideração a importância de investigações que elucidem mecanismos de patogenia em Leptospirose, este estudo buscou avaliar a ligação de anticorpos na superfície de eritrócitos e plaquetas, o envolvimento de micropátulas plaquetárias e o comportamento de testes laboratoriais rotineiros de controle de hemostasia na infecção aguda experimental. Adicionalmente, objetivou-se avaliar o potencial antioxidante e histoprotetor de deferoxamina sobre o tecido renal dos animais que sofreram desafio infeccioso por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola.

2. ARTIGO:

Aceito para publicação na revista Microbial Pathogenesis.

**“Anti-erythrocyte IgG in hamsters with acute experimental infection by
Leptospira interrogans serovar Canicola”**

**Anti-erythrocyte IgG in hamsters with acute experimental infection by
Leptospira interrogans serovar Canicola**

Ânderson O. Sobroza^{a*}, Guilherme L. Dorneles^a, Márcia S. N. Machado^a, Cássia B. Silva^a, Letícia Petry^a, Andressa Schafer^a, Raqueli T. França^a, Cinthia M. de Andrade^a, Alfredo Q. Antoniazzi^b, Alexandre A. Tonin^{c,d}, Sonia T. A. Lopes^a, Micheli M. Pillat^e

^aDepartment of small animals clinic, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

^bDepartment of large animal clinic, Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

^cMestrado em Sanidade e Produção Animal Aplicadas a Pequenas Propriedades, Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), Santa Catarina, Brazil;

^dDepartment of Veterinary Medicine, Uninorte, Amazonas, Brazil.

^eDepartment of Biochemistry, Institute of Chemistry, Universidade de São Paulo São Paulo, Brazil

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

Abstract

The aim of this study was to evaluate the behavior of erythrocyte and platelet, as immunological markers, as well as evaluate the involvement of these factors in hemolytic and hemorrhagic reactions in hamsters experimentally infected by *Leptospira interrogans* Serovar Canicola. Our experimental design was composed by two randomized groups: Infected Group (IG) (n=12) and control group (CG) (n=6). Ninety-six hours after the inoculation, the presence of immunoglobulins (IgG and IgM) and complement C3 levels, related to erythrocytes and platelets, was assessed. Platelet's microparticles marked by CD61, reticulocytes and reticulated platelets were also quantified. Additionally, fibrinogen, prothrombin time, partially activated thromboplastin time and sera levels of IgG and IgM were assessed. Our results showed that levels of platelet decreased in IG ($P < 0.001$); as well as, there was presence of IgG and C3 associated with erythrocyte surface in the infected animals ($P < 0.01$, $P < 0.05$, respectively). Levels of prothrombin time and Activated Partial Thromboplastin Time were increased, while fibrinogen level was decreased ($P < 0.01$) in IG. CD61 microparticles were higher ($P < 0.05$) in IG due to platelet activation. Thus, it was established a positive correlation ($P < 0.01$) between platelets count and fibrinogen (Figure 3, $R = 0.84$, $P < 0.001$). Therefore, the platelet consumption component was preponderant in relation to autoimmune causes. Finally, regarding the erythrocytes, the autoimmune component played an important role, did not causing hemolytic reaction in this acute experimental time.

Key words: Microparticle; platelets; immunoglobulins; leptospirosis; hemolysis.

1. Introduction

Leptospirosis is a worldwide public health problem with great relevance in several countries, especially in Latin America and Southeast Asia. Epidemiologic studies indicate the occurrence of more than one million cases of severe human leptospirosis per year throughout the world, with a fatality rate of approximately 10% [1]. Pathophysiologically it is characterized by vasculitis, and the damage to the capillary endothelial cells is the main cause of clinical manifestations, such as renal tubular dysfunction, liver damage and pulmonary hemorrhage [2]. The injury is most likely due to deposits of immune complexes in the small vessels of the

organs affected. Activation of immuno-inflammatory response determines the release of various humoral factors, which cause the inflammatory process [2]. Several different studies [3,4] have shown an important correlation of *Serovar canicola* and infection in dogs, since it is more adapted to dogs as hosts [5], with special significance in urban areas and, consequently, leading to human infections.

The increase of microparticles (MPs) has been the subject of studies in sepsis and in diseases with activation of the coagulation cascade, such as acute leptospirosis. Microparticles are defined as a population of vesicles originated from different cell types after activation or apoptosis. They measure between 50 nm and 1000 nm and contain cellular material, such as proteins, mRNA and lipoproteins, which are keys to their identification by flow cytometry [6]. All blood cells produce MPs, however platelets release the highest number of circulating MPs, corresponding to 70%-90% of total MP in the plasma of healthy individuals [7,8]. When appropriate technology and techniques are used to mark MPs, by CD 61, along with annexin as an apoptosis marker, they are an important tool and can be used as explanatory factor in studies of pathogenesis, since the attention is focused on the activation and platelet consumption phenomena [9].

Hemostatic disorders and clinical presentations with loss of erythroid mass, by either hemorrhages or hemolytic events, have been described in severe studies of infection by *L. interrogans* [10-12]. Such studies, however, have not been focused on the phenomena of platelet and/or erythrocyte opsonization. Therefore, this study aimed to: i) evaluate IgG, IgM and complement system activation by C3 in the erythrocyte and platelet membrane of hamsters experimentally infected by *Leptospira interrogans* sorovar *Canicola*; ii) analyze the medullary response against infection leading hematic and platelet loss (through the percentage of reticulocytes and reticulated platelets, respectively); iii) evaluate the micro expression, by CD61 binding, in platelet-poor plasma (PPP); and iv) perform a hemogram, quantification of serum IgG and IgM, assess prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT), as well as plasma fibrinogen levels.

2. Material and Methods

2.1. Experimental model

This study was approved by the Animal Welfare Committee of Federal University de Santa Maria (UFSM), under number 4923201015 and it is in accordance to Brazilian laws and ethical principles published by the *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal* (COBEA). As experimental models, we used hamsters (*Mesocricetus auratus*), since it is the ideal model for virulence and pathogenicity investigations in leptospirosis infection [13,14], providing a similar pattern when compared with to severe human leptospirosis. Hamsters underwent to a 15-day adaptation period in which they received commercial feed and water *ad libitum*. After adaptation, 2 animals were used for bacterial activation, and 18 for the establishment of the experimental groups (total of 20 hamsters). All of them were adults, males, with an average age of 60 days and weighing 80 to 96 grams. Hamsters were randomly divided into 2 groups [CG = control (n=6) and IG = infected (n=12)], housed in cages (3/each cage) in an experimental room (under controlled temperature and humidity, 25°C and 70%, respectively).

2.2. Virulence recovery, inoculum, inoculation process and success of experimental infection.

Leptospira interrogans sorovar Canicola used in our study was a virulent strain (LO4). In order to obtain a fully virulent pattern, 0.5 mL of culture, containing approximately 2×10^8 leptospire (quantified through Petroff-Hausser counting chamber in darkfield microscope), were inoculated intraperitoneally in one adult hamster (H1). When H1 showed severe clinical signs of leptospirosis (5 days post-infection), we performed its euthanasia, recovering samples of liver and kidney for further re-inoculation. A pool of these organs were obtained (composing a macerate) and, then, it was reinoculated in a second animal (H2) following a protocol of 1/10 proportion (g tissue/mL of distilled water at 28°C). The onset of clinical signs of disease in H2 was 4 days post-infection, period that was carried out the euthanasia.

Thus, after the second passage (virulence recovery), it was performed the liver and kidney collection for *Leptospira recovery*, carrying out the inoculation of

our infected group (IG). Inoculation was performed subcutaneously according to a consolidated methodology [15]. The animals in IG received, as inoculum, 0.5 mL of supernatant (pool macerated of kidney/liver) at 28° C and containing 20 to 30 leptospiras per microscopic darkfield (quantified through Petroff-Hausser counting chamber) at 400x magnification. Animals from CG received, also subcutaneously, 0.5 mL of sterile saline solution at 28 °C. Prostration, food and water ingestion and presence of blood in the cages were evaluated every 12 hours after inoculation.

For confirmation of infection success, it was performed two protocols: 1st: leptospire culture of urine aspirated from bladder. One drop of urine was placed between slide and coverslip and examined under darkfield microscopy at a magnification of 400x. 2nd: inoculation of renal and hepatic macerated tissue in EMJH media. Briefly, samples of kidney and liver (01 gram of pool) were mixed in modified EMJH medium with 5-fluorouracil (300 mg/L – Sigma USA) and nalidixic acid (20 mg/L), using a serial dilution technique, to evaluate the percentage of recovery of the added microorganisms. Other characteristics findings of severe leptospirosis were observed during necropsies and were also taken into account [free liquid (ascites) into the abdominal cavity, jaundice, blood in the intestinal lumen, hepatosplenomegaly and macroscopic renal changes].

2.3. Sampling and auxiliary analysis

Blood samples collection were carried out (by cardiac puncture with hamsters under anesthesia) on the fourth day post-infection (PI) in both groups. In average 5 ml of blood was obtained and divided into tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), sodium citrate and tubes without anticoagulant. Euthanasia was conducted by cervical dislocation after a deep anesthesia. Complete blood count and platelet count was carried out through a blood cell counter (BC 2800 Vet). Erythrocyte and platelet morphological evaluation was performed on blood smear stained with Fast Paranotico[®], using optical microscopy.

Quantification of IgG and IgM in serum was performed by immunonephelometric assay, using a Behring BN II Nephelometer (Dade Behring - USA) with reagents from Dade Behring. To measure Prothrombin time (PT) and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT), a commercial reagent containing

rabbit brain extract was used, with preservative and plasma activator for PT and ellagic acid and calcium chloride for APTT. For determination of Fibrinogen, via commercial kit (Labtest, Minas Gerais, BR), a standardized amount of Thrombin was added to a sample of diluted citrated plasma and the clotting time was measured. The coagulation time of diluted citrated plasma was found to be inversely proportional to the concentration of Fibrinogen. In order to obtain the concentration of Fibrinogen, coagulation time of plasma being tested was compared with the coagulation times for a series of dilutions of plasma containing a known concentration of Fibrinogen. For PT, APTT and Fibrinogen the formation of fibrin was monitored in a semi-automated device (Quick timer[®]).

2.4. Antibodies and C3 detection on the surface of erythrocytes

The detection of IgG, IgM and C3 in surface of erythrocytes was performed in samples containing, at least, 1 ml of whole blood. These samples were centrifuged at 1,500 g for 5 min, in order to obtain the fraction of plasma-free erythrocytes. Upon removing the proteins from the plasma, 100 μ L of erythrocytes were added to 4 mL of phosphate buffered saline solution (Phosphate Buffered Saline; PBS; Ca²⁺ +, Mg²⁺ +-free PBS, pH 7.4). The erythrocytes were washed three times with PBS to remove any remaining plasma proteins. After the last centrifugation, the pellet was resuspended in 5 mL of PBS. Aliquots containing 1,000,000 cells were incubated with the specific antibodies (anti-IGM, anti-IgG and anti-C3 conjugated with FITC fluorophore; Bethyl Laboratories, Inc.) in the dilution of 1:50 at 4°C for 45 min. After the incubation period, the samples were washed three times with PBS and then resuspended in 300 μ L of PBS for data acquisition in the flow cytometer BD FACSVerser (BD Bioscience), with 15,000 events being acquired per sample.

A gate in the dot-plot of the forward scatter channel (FS- forward scatter) versus the side scatter channel (SS-side scatter) was used to select the erythrocytes. To confirm the location of the gate, 7.3 μ m Beads were used. From the negative samples, it was possible to map out a region in fluorescence detector 1 (FL1-FITC), where events observed on the right were considered positive. The analyses were carried out on the software Flowjo V10.

2.5. Determination of the percentage of reticulocytes

In order to determine the percentage of reticulocytes, a thiazole orange solution at a concentration of 100 ng/mL was used. An aliquot of 5 μ L of whole blood with EDTA was added to 1 ml of thiazole orange solution. For all the samples, tubes that served as negative control were also prepared using 5 μ L of whole blood with EDTA added to 1 ml of PBS. The samples were incubated and protected at room temperature for 1 h [16]. After the incubation period, the acquisition of the data was performed in BD FACSVerse Flow cytometry in which 15,000 events were acquired per sample. The selection/gate of the population of erythrocytes was performed in the same way described in the subsection 2.4. From the negative samples, it was possible to trace a region in the FL1, where events observed on the right were considered positive for thiazole orange. The analyses were carried out on the software Flowjo V10.

2.6. Antibodies and C3 detection on the surface of platelets

The detection of antibodies on the surface of the platelets was determined in one aliquot of whole blood with EDTA containing 10^6 cells. The samples were washed three times with PBS containing 3 mM of EDTA and centrifuged at 1,500 g for 5 minutes. After washings, the cells were incubated for 30 min with specific antibody (anti-IGM, IgG and anti-C3 in conjunction with FITC, both in the dilution of 1:50) at room temperature and protected from light. After the incubation period, the samples were washed three times with PBS and then resuspended in 400 μ L of the same solution for data acquisition in BD FACSVerse Flow cytometry. Fifteen thousand events per sample were acquired at the gate of the platelets, with one gate in the dot-plot of FSC versus SSC used to select the platelets. Beads of 2 μ m diameter and samples incubated with the antibody anti-FITC CD61 (1:100; GeneTex) were used to assist in selecting the population regarding the platelets (Figure 1). Negative sample, consisted of cells not exposed to the antibodies [17]. The analyses were carried out using software Flowjo V10.

2.7. Reticulated platelet count

For reticulated platelet count, the thiazole orange solution, at a concentration of 20 ng/mL was used. An aliquot of whole blood with EDTA containing 10^6 cells was added to 560 μ L of thiazole orange solution. The samples were protected from light and incubated for 30 min at room temperature [18]. After the incubation period, data acquisition was performed in BD FACSVerser Flow cytometry, with events per sample. Gate selection of the platelet population was conducted in the same manner as described in the subsection 2.6. From the negative samples, it was possible to trace a region in the FL1, where events observed on the right were considered positive for thiazole orange. The analyses were carried out using Flowjo V10 software.

2.8. Determination of microparticles marked by CD61

For determination of microparticles marked by CD61, it was necessary to prepare platelet-poor plasma (PPP). In order to achieve this, 1 mL of anticoagulated blood (by using sodium citrate) was centrifuged at 1500 g for 10 min at 20°C, in order to obtain platelets rich in plasma (PRP). Thereafter, a new centrifugation at 13,000 g, for 10 min, at 20° C was conducted resulting in the oblation of PPP [19]. The MPs were isolated from the PPP by using two ultracentrifugation at 100,000 g for 60 min. The MPs pellet was resuspended and gently homogenized in vortex using wash buffer. Two aliquots of MPs were incubated, respectively, with annexin-V antibody and anti CD61 conjugated with FITC for 15 min in the dark at room temperature. The MPs were determined by adding a known number of beads (Figure 1) to the sample and adjusted to the final dilution of the original blood sample [19].

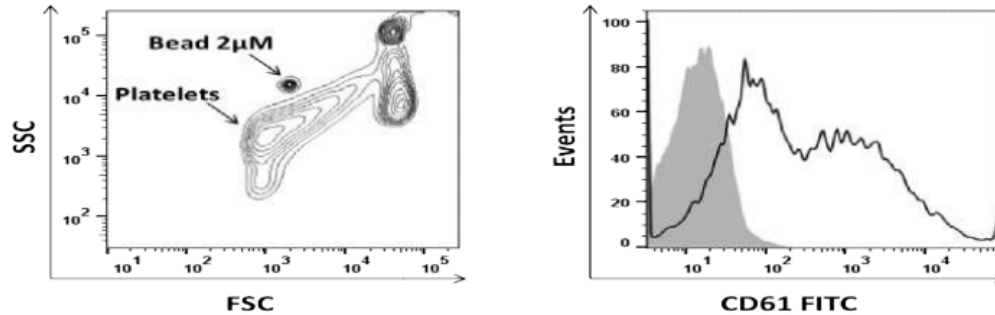


Figure 1. Gating strategy for identification of platelet populations. Dot-plot SSC (side scatter, granularity) versus FSC (forward scatter, cell size) showing the population of platelet and the beads of 2 μ m. Histogram showing the fluorescence intensity in the FL1 channel detection of sample incubated with anti-CD61 FITC antibody (platelet marker; black line), and a negative sample not exposed to antibody (gray). Analyses were performed with the Flowjo V10 software.

2.9. Statistical analysis

The data were submitted to the Student test (test t) for comparison of mean values. The significance level was 5%, and P values below 5% were considered statistically different. The effect of platelets count on fibrinogen concentration was examined by linear correlation. P values lower than 5% were considered to be statistically different.

3. Results

3.1. Clinical evaluation, characteristics of autopsy and cultures

Hamsters of IG presented clinical signs such as bristling fur, prostration, apathy, hypersensitivity to light and eye hyperemia, in average 48 h PI. Fecal blood loss was observed after 72 h. The cultures of the material used for bacterial recovery were positive, reaffirming the successful in our experimental model of infection. On necropsies, the infected animals confirmed the changes previously described (jaundice, hepato-splenomegaly, ascites).

3.2. Hematology

Platelet count was considered lower ($P < 0.001$) in the animals of IG (Table 1). Hematocrit parameter showed no statistical difference between both groups

($P > 0.05$, Table 2). The presence of some schistocytes and rare microspherocytes (less than 1%) were observed in IG.

Parameter	Control	Infected	P
TP (seconds)	10,83 ± 0,31	21,17 ± 0,79	P<0.001
TTP (seconds)	26,83 ± 1,74	52,00 ± 3,50	P<0.001
Platelets x 10 ³ / µl	321,0 ± 30,54	154,1 ± 21,20	P<0.001
Fibrinogen (mg/dL)	410,80±17,55	105,1 ± 16,79	P<0.001
Microparticles CD61 ⁺ / 15,000 beads	92,00 ± 2,775	210,1 ± 43,91	P< 0.05

Table 1. Mean values and standard deviations (±) for coagulation parameters in healthy animals (controls group - CG) and hamsters experimentally infected by *L. interrogans* serovar Canicola (Infected group – IG). Student's t test, with statistical and significance level.

3.3. Platelet immunoglobulins, coagulation tests, CD61⁺ microparticles and reticulated platelets

The markers of immunoglobulins and platelet complement (IgG, IgM and C3), did not show significant difference between both groups ($P > 0.05$), (Figure 2). In IG, PT and APTT results were increased and plasma fibrinogen was decreased (Table 1, $P < 0.001$). MPs, marked by CD61, were increased in Platelet-poor plasma on hamster of IG (Table 1, $P < 0.05$). However, the percentage of reticulate platelets did not differ between groups (Table 2, $P > 0.05$). It was found a positive correlation ($P < 0.01$) between levels of platelets and fibrinogen ($r = 0.84$, $P < 0.001$), (Figure 3).

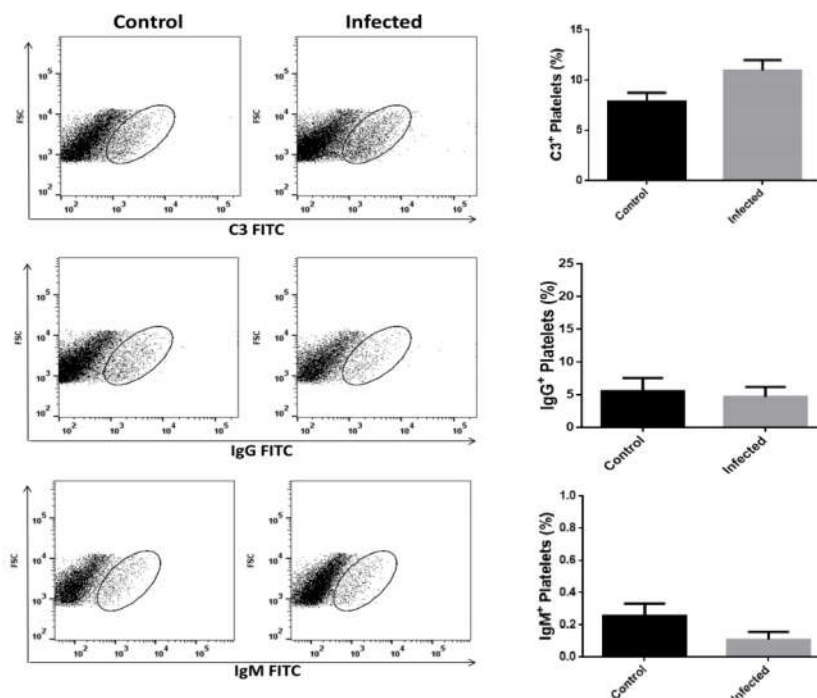


Figure 2. C3, IgG and IgM bound to platelets in hamsters experimentally infected by *Leptospira interrogans* serovar Canicola on day 4 post-infection. Dot plots exemplifying the gate of labeled platelets with C3, IgG and IgM in hamsters control and experimentally infected by *Leptospira interrogans* serovar Canicola. Graphics showing mean and standard deviation (Student's t-test * $p < 0.05$). Analyses were performed in Flowjo V10 software.

Parameter	Control	Infected	P
Hematocrit (%)	46,00 ± 0,80	45,00 ± 1,50	P>0.05
Serum IgG (mg/dl)	35,40 ± 3,50	39,80 ± 8,30	P>0.05
Serum IgM (mg/dl)	21,00 ± 3,56	23,12 ± 7,82	P>0.05
Reticulated platelets(%)	16,32 ± 2,19	15,89 ± 1,59	P>0.05
Reticulocytes (%)	3,71 ± 0,33	4,05 ± 0,74	P>0.05

Table 2. Mean values and standard deviations (±) for parameters without statistical difference between healthy animals (controls) and hamsters experimentally infected by *L. interrogans* serovar Canicola. Student's t test, with statistical and significance level.

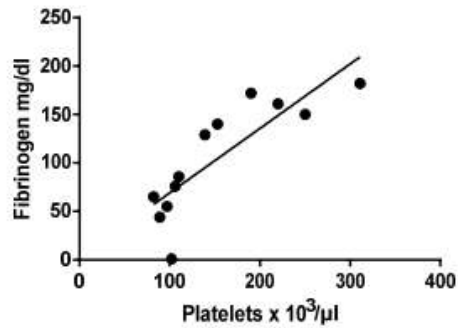


Figure 3. Linear correlation: Platelets versus Fibrinogen in hamsters infected by *Leptospira interrogans* serovar Canicola on day 4 post-infection ($R=0.84$, $P<0,001$).

3.4. Erythrocyte immunoglobulins, C3 erythrocyte and reticulocyte

Hamsters of IG showed higher percentage of IgG binding (Figure 4, $P<0.001$). No significant difference on IgM was noticed between both groups (Figure 4, $P>0.05$). A higher percentage of binding was also observed for C3 in IG (Figure 4, $P<0.05$). There was no difference in the percentage of reticulocytes between both groups (Table 2, $P>0.05$).

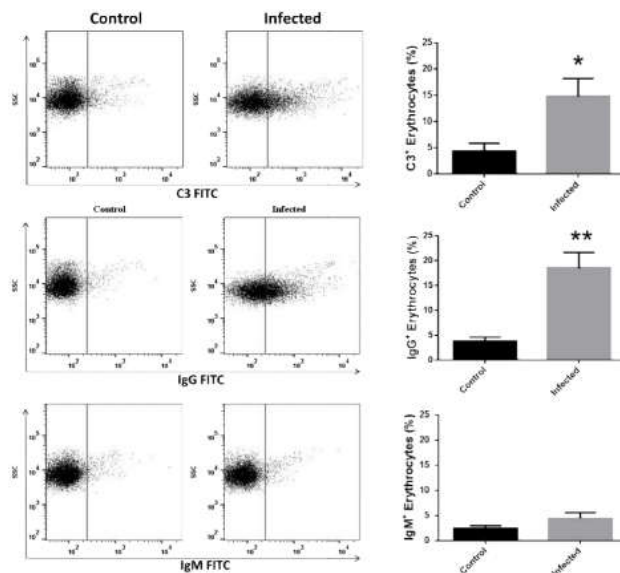


Figure 4: C3, IgG and IgM bound to erythrocytes in hamsters experimentally infected by *Leptospira interrogans* serovar Canicola on day 4 post-infection (* $P<0.05$, ** $P<0.001$, t test). Dot plots exemplifying the gate of labeled erythrocyte with C3, IgG and IgM in CG and experimentally infected by *Leptospira interrogans* serovar Canicola. Graphics showing mean and standard deviation (Student's t-test- * $p<0.05$; ** $p<0.01$). Analyses were performed in Flowjo V10 software.

3.5. Serum immunoglobulins

The dosage of IgM and IgG in serum was not significantly changed by the experimental infection (Table 2, $P>0.05$).

4. DISCUSSION

The lack of significant decrease in the hematimetric values between infected animals might be because the animals were not hydrated enough in the short period of the study. Losses were clinically confirmed by necropsy and blood found in intestines. Fluid loss followed the decrease in erythroid mass, thus obscuring laboratory results. Even though, clinical signs of acute disease were observed during our experimental study.

In this sense, studies involving acute infection by pathogenic serovars of *L. interrogans* also presented thrombocytopenia, having as the main justifications splenic sequestration and peripheral consumption [10, 20, 21]. Efforts to clarify thrombocytopenia, as a possible consequence of autoimmune involvement, in experimental models of leptospirosis has not been frequent; although other infectious diseases, that cause thrombocytopenia, involved immune disruption as part of the cause for this change [22]. By using the appropriate technique, our results demonstrate the absence of increase in platelet immunoglobulin's on IG. This observation brings important contribution on the pathophysiological point of view, eliminating autoimmune thrombocytopenia as explanatory basis for this condition. By eliminating the autoimmune activity as a cause of the decrease in platelet count, and considering the results presented in the remaining assessments of coagulation cascade, it is possible to recognize that this collection of information is compatible with consumptive coagulopathy. Other studies of pathogenesis with leptospirosis feature the prolongation of prothrombin time and activated partial thromboplastin, as well as decrease by consumption of coagulating proteins such as fibrinogen [20,21,23]. One must consider that

fibrinogen, since it is an acute phase protein [24], could be increased by an intense inflammatory situation, as proposed by the present experiment. However, its exaggerated consumption is linked to bacterial mechanisms of pathogenicity, and such use, in a disseminated manner, of fibrinogen and other coagulation factors, provoke the extension perceived in *in vitro* tests such as the ones carried out (PT and APTT).

On the one hand, non-compliance of the autoimmune component, in our results, may be evidenced by the absence of platelet opsonization markers. On the other hand, it may be ratified by the behavior of conventional coagulation tests. There seems to have been insufficient time for a proper spinal cord regenerative response, since the percentage of reticulate platelets did not differ statistically between the groups. Microparticles were found in large amount in situations of vascular damage and hypercoagulability, such as in disseminated intravascular coagulation [26-29]. Hematopoietic cells derived from MPs contribute significantly to the formation of fibrin [30]. Our results (MPsCD61⁺ increased in IG) demonstrate important platelet activation, which is consistent with performance in microthrombus consumers. Platelet disorders are often reported in sepsis and the role and behavior of the platelet MPs has been the target of revision studies [31]. In contrast to our results, there may be an autoimmune component associated with the overconsumption of platelets, and in this case, also with presence of activation monitored by CD61 [32].

When attention is focused on erythrocyte conditions, resulting from experimental infection, in which there was increased positivity for IgG and C3 among the infected, the results lead to a condition of opsonization for IgG with complement activation, resulting in clinically noticeable hemolysis if the hemorrhagic situation had not been superimposed. The following facts reinforce this perspective i) the microscopic findings in the blood smear analysis showed the presence of some schistocytes, ii) rare microspherocytes, which may not accumulate in the blood if the formation speed is below its removal speed [33]. Both alterations tend to be present in situations of intra and extra-vascular hemolysis.

As a result of erythrocyte conditions, anemia, of acute or chronic onset, has been described as a relevant signal in the onset and aggravation of leptospirosis

in pets, production animals as well as in humans. Some studies demonstrate severe hemolytic activity [10] without deepening the hemolytic mechanisms. Anti-erythrocyte IgG seems to act nonspecifically, since the acute onset of the experimental infection would have insufficient time for the seroconversion of IgG anti-leptospira [34]. What seems to occur is a clutter in the immune system and important pre-hemolytic opsonization. Leptospiras in circulation are avid by heme groups [35], leading to preliminary injury on erythrocyte membrane, which exposes self antigens, forming membrane immunocomplexes; thus, triggering opsonization, and targeting extravascular hemolysis, usually splenic.

Another possible mechanism demonstrated, by the presence of erythrocyte C3, which shows the participation of the complement system, is an intravascular hemolysis, producing schistocytes, which apparently began to accumulate in the peripheral blood. In our study, there was no erythrocyte regenerative medullary response, since no difference was found between groups for percentage of reticulocytes, due to there being a short amount of time between the first clinical signs and material collection.

The non-occurrence of difference in the quantification of serum immunoglobulins, between the two groups, possibly is because there was insufficient time for seroconversion, which has been estimated between 5 and 7 days. [34]. Furthermore, the degree of immunoglobulin consumption, by opsonization (evidenced by cytometry techniques), was not enough to decrease IgG serum levels.

Therefore, based on our results, we reached some very interesting conclusions: i) we excluded the direct autoimmune factors as a cause of platelet decrease in acute infection by *L. interrogans* Serovar Canicola and demonstrated the participation of the IgG and complement system in pre-hemolytic opsonization (at this point we believe that a model of chronic experimental infection may be of great explanatory value); ii) we observed that there was no erythrocyte and platelet regenerative medullary response as a consequence of clinical hemorrhage; and iii) It is also possible to conclude that inflammatory endothelial causes have been motivating the activation of the cascade, the consumption of coagulation factors and clinical hemorrhage for this experimental infection. Microparticles, marked by CD61, proved to be an important tool for monitoring Platelet Activation, which strengthens the possibility of CD61 uses as an auxiliary

marker of diagnostic and/or as a possible therapeutic target in future studies of infectious diseases with clinical bleeding.

5.Acknowledgments:

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq). We also acknowledge fellowships from CNPq and CAPES. M.M.P. is grateful for a postdoctoral fellowship from FAPESP (2015/19478-3).

6.References

- [1] Abela-Ridder B, Sikkema R, Hartskeerl RA. Estimating the burden of human leptospirosis. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36: 5–7.
- [2] Bethlem P, Carvalho R, Pulmonary leptospirosis. *Curr Opin Pulm Med* 2000; 6: 436-41.
- [3] Castro JRD, Salaberry SRS, Souza MAD, Lima-Ribeiro AMC. Predominant *Leptospira* spp. serovars in serological diagnosis of canines and humans in the City of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil 2011. *Rev Soc Bras Med Trop*; 44(2):217-22.
- [4] Mascoll R, Pinheiro SR, Vasconcellos SA, Ferreira F, Morais ZM, Pinto CO, 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. *Arq Inst Biol* 2002; 69(2): 25-32.
- [5] Adler B, De La Penã MA. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 2010;140:287–96.
- [6] Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000;101(8):841-43.
- [7] Vasina EM, Cauwenberghs S, Staudt M, Feige MA, Weber C, Koenen RR, et al. Aging- and activation-induced platelet microparticles suppress

apoptosis in monocytic cells and differentially signal to proinflammatory mediator release. *Am J Blood Res* 2013;3(2):107-23.

[8] Berckmans RJ, Neuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack CE, Stark A. Cell derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 2001; 85(4):639-46.

[9] França CN, De Oliveira IMC, Do Amaral JB, Tegani, DM, Fonseca FAH. Micropartículas como Possíveis Biomarcadores da Doença Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol* 2015; 104 (2):169-74.

[10] Sobroza ÂO, Tonin AA, Da Silva AS, Dornelles G L, Wolkmer P, Duarte M M, et al. Iron metabolism in hamsters experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar Pomona: Influence on disease pathogenesis. *Comp immunol microb infect dis* 2014; 37(5): 299-304.

[11] Langston CE, Heuter KJ. Leptospirosis: A re-emerging zoonotic disease. *Vet Clin N Am: Small Animal Practice* 2003; 33: 791-807.

[12] Bernheimer AW, Bey RF, Copurification of *Leptospira interrogans* Serovar pomona Hemolysin and Sphingomyelinase C. *Infect Immun* 1986; 54: 262-64.

[13] Haake DA. Hamster model of leptospirosis. *Curr Protoc Microbiol* 2006 September:12E.

[14] Silva EF, Santos CS, Athanzio DA, Seyffert N, Seixas FK, Cerqueira GM, et al. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model *Vaccine* 2008; 26: 3892–96.

[15] Macedo NA, Morais ZM, Camargo CRA, Alves CJ, Azevedo SS, Júnior RN, et al. 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* 2004; 41: 194-200.

[16] Lee LG, Chen C, Chiu LA. Thiazole Orange: A New Dye for Reticulocyte Analysis. *Cytometry* 1986; 7: 508-17.

- [17] Cortese ML, Sica M, Piantedosi D, Ruggiero G, Pero ME, Terrazzano G, et al. Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 2009;164:778-82.
- [18] Wilkerson MJ, Shuman W, Swist S, Harkin K, Meinkoth J, Kocan AA. Platelet Size, Platelet Surface-Associated IgG, and Reticulated Platelets in Dogs with Immune-Mediated Thrombocytopenia. *Vet Clin Pathol* 2001;30:141-49.
- [19] Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, et al. Sickle blood contains tissue factor–positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 2003; 102(7): 2678-83.
- [20] Chierakul W, Tientadakul P, Suputtamongkol Y, Wuthiekanun V, Phimda K, Limpiboon R, et al. Activation of the Coagulation Cascade in Patients with Leptospirosis. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 254–60.
- [21] Lin YP, McDonough SP, Sharma Y, Chang YF. *Leptospira* immunoglobulinlike protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen alphaC domain inhibits fibrin clot formation platelet adhesion and aggregation. *Mol. Microbiol* 2011; 79: 1063–76.
- [22] Kohn B, Linden T, Leibold W. Platelet-bound antibodies detected by a flow cytometric assay in cats with thrombocytopenia. *J. Feline Med Surg* 2006; 8(4): 254-60.
- [23] Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Moller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect. Immun.* 2007; 75: 2441–50.
- [24] Eckersall PD, Bell R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Vet J* 2010;185(1): 23-7.
- [25] Janiszewski M, Do Carmo AO, Pedro MA, Silva E, Knobel E, Laurindo FR. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway. *Crit Care Med* 2004; 32(3):818-25.

[26] Diamant M, Nieuwland R, Berckmans RJ, Pablo RF, Smit JWA, Sturk A, et al. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes. *Circulation* 2002; 106:2442-47.

[27] Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, Maquelin KN, Roozendaal KJ, Jansen PG et al. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation* 1997; 96:3534-41.

[28] Holme PA, Solum NO, Brosstad F, Roger M, Abdelnoor M. Demonstration of platelet derived microvesicles in blood from patients with activated coagulation and fibrinolysis using a filtration technique and western blotting. *Thromb Haemost* 1994; 72(5):666-71.

[29] Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood* 2004; 104(10):3190-97.

[30] Reid VL, Webster NR. Role of microparticles in sepsis. *Br J Anaesth* 2012;109(4): 503-13.

[31] Burke AP, Mont E, Kolodgie F, Virmani R. Thrombotic thrombocytopenic purpura causing rapid unexpected death: value of CD61 immunohistochemical staining in diagnosis. *Cardiovasc Pathol* 2005; 14(3):150-55.

[32] STOCKHAM SL, SCOTT MA. *Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2011; 8: 368-75.

[33] Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(2):296–326.

[34] Hauk P, Negrotto S, Romero EC, Vasconcellos SA, Genovez MÉ, et al. Expression and characterization of HlyX hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni: potentiation of hemolytic activity by LipL32. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333(4): 1341-47.

3. MANUSCRITO

Submetido para publicação na revista Ciência Rural.

“Redução da lesão renal em hamsters com infecção aguda por *Leptospira interrogans* Sorovar Canicola tratados com deferoxamina”

Redução da lesão renal em hamsters com infecção aguda por *Leptospira interrogans* Sorovar Canicola tratados com deferoxamina

Ânderson Oliveira Sobroza^{1*}, Cássia Bagolin da Silva¹, Roberto Marinho Maciel¹, Cristiane Cademartori Danesi¹, Aline Alves Courtes¹, Débora Farina Gonçalves¹, Ingrid Kich da Silva¹, Rômulo Pillon Barcelos¹, Micheli Mainardi Pillat², Guilherme Lopes Dornelles¹, Cinthia Melazzo de Andrade¹, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes¹.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito antioxidante, anti-inflamatório e histoprotetor da deferoxamina (DFX) no tecido renal, em doses terapêuticas, em hamsters infectados experimentalmente com *Leptospira interrogans* Sorovar Canicola durante a fase aguda da doença. Para isso, foram utilizados 18 animais, divididos em 4 grupos: “C” e “CT”= controle e controle tratado, respectivamente, com 3 animais cada, “I” e “IT”= infectado e infectado tratado, respectivamente, com 6 animais cada. O tratamento utilizado foi administrado por via subcutânea nos dias -1, 0, 1, 2 e 3. No 4º dia os animais foram submetidos à coleta sanguínea e eutanásia. Tecido renal foi utilizado para avaliação histopatológica (HE), inflamatória (AChe) e oxidativa (TBARS e GSSH/GSSG). Foi realizado também eritrograma, dosagem de ferro sérico, índice de saturação de transferrina (IST), capacidade total de ligação do ferro e creatinina sérica. Os valores de Ferro sérico e IST esiveram diminuídos entre os

¹Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brasil

²Universidade de São Paulo (USP), São Paulo-SP, Brasil

*Ânderson Oliveira Sobroza, e-mail: farmanderson2003@yahoo.com.br

infectados, e os de creatinina aumentados ($P < 0,05$). Tratamento com DFX não causou alteração nesses 3 parâmetros. Em contrapartida, avaliação histopatológica demonstrou importante grau de proteção tubular por DFX. Ao mesmo tempo AChE e TBARS demonstraram importante alteração (decréscimo e aumento, respectivamente) pela infecção experimental, que foi atenuada ($P < 0,05$) pelo efeito de DFX. A Razão GSSH/GSSG apresentou decréscimo causado pela infecção ($P < 0,05$) e entre os 2 grupos infectados não apresentou diferença. Com base nos resultados conclui-se que há severa lesão renal na infecção experimental e há proteção tecidual por DFX, sobretudo a nível tubular.

Palavras-chave: quelante, histopatológico, rim, espiroqueta, TBARS

ABSTRACT

The objective of this work was to determine the antioxidant, anti-inflammatory and histoprotective effect of deferoxamine (DFX) in renal tissue at therapeutic doses in hamsters in acute leptospirosis. For this, 18 animals were used, divided into 4 groups: "C" and "CT" = control and treated control, respectively, with 3 animals each, "I" and "IT" = infected and treated infected respectively, with 6 Animals each. The treatment was administered subcutaneously on days -1, 0, 1, 2 and 3. On the 4th day the animals were submitted to blood collection and euthanasia. Renal tissue was used for histopathological evaluation (HE), inflammatory (AChE) and oxidative (TBARS and GSSH / GSSG). Erythrogram, serum iron dosage, transferrin saturation index (STI), total iron binding capacity and serum creatinine were also performed. Serum iron and STI values were decreased among those infected, and those with

increased creatinine levels ($P < 0.05$). Treatment with DFX did not cause change in these 3 parameters. On the other hand, histopathological evaluation demonstrated an important degree of tubular protection by DFX. At the same time, AChE and TBARS showed a significant alteration (decrease and increase, respectively) by the experimental infection, which was attenuated ($P < 0.05$) by the effect of DFX. The GSSH / GSSG ratio presented decrease caused by the infection ($P < 0.05$) and between the 2 infected groups showed no difference. Based on the results it is concluded that there is severe renal damage in the experimental infection and tissue protection by DFX, especially at the tubular level.

Keywords: chelator, histopathological, kidney, spirochete, TBARS

INTRODUÇÃO

Os representantes patogênicos do gênero *Leptospira* utilizam ferro como fator de crescimento, são Gram negativas e vivem em tecidos de animais, no solo úmido, na lama e em águas paradas, como em banhados (FAINE, 1982). Febre, icterícia, insuficiência renal, nefrite e anemia hemolítica são características clínicas relevantes em leptospirose grave (GAZI et al., 2011). Sorovar Canicola apresenta importante correlação com a infecção em cães uma vez que entre os cães está mais adaptado (ADLER e DELA PEÑA, 2010) e, potencialmente, pode causar doença humana devido à proximidade entre as duas espécies. Nos países desenvolvidos, leptospirose humana é causa incomum de insuficiência renal aguda (IRA) (KOKUDO et al., 2009). Em contrapartida, em localizações onde é endêmica, como na Tailândia e Singapura, leptospirose é responsável por mais de 20% dos casos de IRA. A incidência de IRA varia de 10% a 60%, dependendo

da gravidade da doença e fatores relacionados ao hospedeiro (SITPRIJA et al., 2003).

Eventos hemolíticos têm importante papel na patogenia da leptospirose aguda e estão relacionados ao aumento de oxidantes totais com expressiva reposta na linha de defesa antioxidante. Elevam o aporte de ferro biodisponível e causam desbalanço em sua capacidade de internalização (SOBROZA et al., 2014). Como consequência, há uma facilitação nas reações que produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Tais moléculas podem danificar quase todos os componentes celulares, incluindo DNA, membranas lipídicas e proteínas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A Deferoxamina (DFX), molécula hexavalente de elevado peso molecular, fixa ferro em uma proporção de 1:1. DFX apresenta absorção gastrintestinal mínima por via oral, devendo ser administrada por via subcutânea. A excreção do complexo DFX: ferro é predominantemente renal (BRITTENHAM, 1994; PORTER, 2001). Modelos experimentais com hamsters são utilizados para estudar o efeito de DFX em função das semelhanças com metabolismo do ferro em humanos no que se refere a estabilidade metabólitos formados (STEWART et al., 1996). Já não é novo o conhecimento científico acerca de que DFX pode diminuir dano oxidativo em modelos animais (HALLIWELL, 1987; HALLIWELL, 1989). Em investigações comportamentais crônicas costuma-se utilizar doses no limite inferior da terapêutica (VALVASSORI, 2008), enquanto que em modelos que proporcionam situações agudas, como isquemia e reperfusão, utilizam-se doses maiores (PHAELANTE, 2015). Tentativas de investigações em doenças infecciosas, como malária, tem encontrado alguns resultados positivos (TRAORE

et al.,1991; BUNNAG et al., 1992; ISAH e IBRAHIM, 2014). Em infecções bacterianas de características crônicas, como *Helicobacter pylori*, os resultados foram menos expressivos (HUYNH et al., 2009).

O neurotransmissor Acetilcolina (ACh) possui ação anti-inflamatória (DAS, 2007) e está envolvido em processos de regulação da inflamação em Leptospirose (DA SILVA et al., 2012). O envolvimento em doenças infecciosas causadas por *Staphylococcus aureus* (KAWASHIMA et al., 1980) e *Tripanossoma evansi* (WOLKMER et al., 2010) também foram pesquisados. Esses estudos concluíram que alterações na atividade enzimática de colinesterases estão relacionadas com a resposta imunitária e os sinais clínicos destas infecções. O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito antioxidante, anti-inflamatório e histoprotetor da DFX no tecido renal, em doses terapêuticas, em hamsters infectados experimentalmente com *Leptospira interrogans* Sorovar Canicola.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Modelos experimentais utilizando hamsters (*Mesocricetus auratus*) têm sido descritos como os ideais para investigações de virulência e patogenicidade com *Leptospira interrogans* (HAAKE, 2006; SILVA et al., 2008) e se assemelham em muito à leptospirose humana grave. Os animais passaram por um período de adaptação de 15 dias, recebendo ração comercial e água *ad libitum*. Após a adaptação foram utilizados 2 animais para ativação da virulência bacteriana (descrito a seguir) e 18 hamsters (para formação dos grupos) 2+18=20 animais- adultos, machos, com idade média de 60 dias e peso médio de 80-96

gramas. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (**C**= controle, com 3 animais, **CT**= controle tratado, com 3 animais, **I**=infectado, com 6 animais e **IT**= infectado tratado, com 6 animais) e alojados em gaiolas com 3 animais cada, em uma sala de experimentação com temperatura e umidade controlada (25°C; 70% UR).

Ativação da virulência, inóculo bacteriano, inoculação, sucesso da infecção experimental e tratamento

O inóculo, para a fase de ativação de virulência, foi constituído por uma cultura pura de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe autóctone e virulenta LO4, oriunda do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ/USP, São Paulo, Brasil. Da qual, 0,5 mL em meio semi-sólido, foram inoculados intraperitonealmente em um hamster adulto, sendo obtidas novamente as bactérias e reinoculadas no segundo animal através de macerado de fígado e rim na proporção de 1/10 (g tecido/mL de água destilada a 28°C), após eutanásia do primeiro animal no 4° dia pós-infecção (PI).

A inoculação nos animais dos grupos I e IT, a partir do segundo hamster, uma vez realizada a segunda passagem para ativação de virulência, se deu por via subcutânea, segundo metodologia consolidada (MACEDO et al., 2004). Animais do grupo C e CT foram inoculados pela via subcutânea com 0,5 mL de solução fisiológica estéril a 28 °C. A cada 12 horas após à inoculação os animais foram avaliados quanto à prostração, ingestão de alimento e água e presença de sangue nas gaiolas.

Os animais dos grupos CT e IT receberam por via subcutânea, doses de 50mg/kg de DFX, nos dias -1, 0, 1, 2 e 3. Nos mesmos horários, os animais dos grupos C e T receberam volume similar, de solução fisiológica estéril.

Aspirado vesical e/ou tecido renal/hepático foram destinados ao laboratório de diagnóstico em leptospirose da UFSM (Lablepto) para reisolamento. Também foram levados em conta, como reafirmação de sucesso da infecção experimental, achados de necropsias compatíveis com leptospirose grave, tais quais: cavidade com líquido livre, icterícia, sangue na luz intestinal, hepatoesplenomegalia e alterações macroscópicas renais.

Coleta de material, hematologia, ferro sérico e análises bioquímicas

As coletas de sangue para as análises foram realizadas no 4º dia pós-infecção (PI) nos 4 grupos. As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca pós anestesia com Isoflurano 100% (3 a 4% na câmara inalatória), 5mL de sangue foram obtidos e foram divididos em tubos contendo ácido etileno diaminotetracético (EDTA) e tubos para obtenção de soros, sendo processados imediatamente após a coleta. Realizou-se eutanásia por deslocamento cervical após aprofundamento da anestesia. Eritrograma foi realizado por aparelho automatizado BC 2800 Vet, a avaliação morfológica eritrocitária foi realizada em esfregaço sanguíneo corado com Panótico Rápido®, utilizando-se microscopia óptica.

O ferro sérico, capacidade latente de ligação do ferro e creatinina sérica foram dosados, mediante utilização de *kits* comerciais (Labtest, Minas Gerais, BR), sendo as leituras realizadas através de analisador semi-automático Bio-2000 (BioPlus Ltda., São Paulo, BR). Toda a vidraria utilizada para os primeiros dois testes foi embebida em ácido clorídrico a 10% durante 3h e, em seguida, a mesma foi enxaguada com água desionizada (sistema Milli-Q da Millipore Corporation) antes de ser usada. A capacidade total de ligação do ferro e índice

de saturação de transferrina foram obtidos por cálculo considerando os resultados de ferro sérico e capacidade latente de ligação do ferro.

Avaliação histopatológica renal

O rim direito foi fixado em solução de formalina tamponada neutra a 10%, embebidos em parafina e utilizados para exame histopatológico. As secções foram cortadas, desparafinizados, hidratadas e coradas com hematoxilina-eosina. Morfologia e alterações patológicas renais foram observadas em ampliação de 400x, descritas em laudo correspondente e quantificadas de acordo com Humphries (2014).

Lesão inflamatória, oxidativa e status antioxidante

O Rim esquerdo foi destinado para esta avaliação. Uma porção deste foi homogeneizados (1:10) em tampão 10 mM Tris (pH 7.4) e centrifugada a 2.500 rpm durante 12 min. A fração do sobrenadante foi utilizada para as análises.

Atividade de acetilcolinesterase foi determinada de acordo com o método de Ellman et al. (1961). Em resumo, utilizou-se 875 µL da mistura da reação, contendo tampão fosfato de potássio (0.1 M, pH 8), 50 µL de ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, 10 mM), 25 µL de homogenato e 50 µL de iodeto de acetiltiocolina (9 mM). Alterações da absorbância foram monitoradas durante 2 minutos a 412 nm.

A peroxidação lipídica foi determinada medindo as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como descrito por (OHKAWA, et al., 1979). Uma alíquota (200 µL) de homogenato foi misturado com 500 µL de ácido tiobarbitúrico

(TBA, 0.6%), 200 μ L de dodecilsulfato de sódio (SDS, 8.1%), e 500 μ L de ácido acético (500 mM, pH 3.4) sendo incubado a 100°C durante 1 h. Níveis de TBARS foram medidos a 532 nm utilizando uma curva padrão de malondialdeído (MDA) e os resultados foram relatados como a proteína nmol MDA / mg.

Para mensurar os níveis de GSH e GSSG, foi utilizado o método descrito por Hissin e Hilf (1976). Resumidamente, 400 μ L de homogenato foi misturado a 200 μ L de ácido tricloroacético (TCA 13%) sendo centrifugado a 4°C em 13.000 rpm durante 10 minutos. Para dosagem da GSH, 100 μ L do sobrenadante foi diluído em 1.800 μ L do tampão fosfato com EDTA (fosfato de sódio (100 mM) e EDTA (5mM), pH 8) e 100 μ L de O-ftalaldeído (OPT 1 mg/mL). As misturas foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 minutos e a medida da fluorescência foi analisada através de um espectrofluorímetro RF-5301 PC Shimadzu (Kyoto, Japão) com comprimento de onda de 420 nm de emissão e 350 nm de excitação. Para dosagem dos níveis de GSSG, 250 μ L do sobrenadante foi incubado à temperatura ambiente com 100 μ L de N-etilmaleimida (NEM 0.04 M) por 30 minutos à temperatura ambiente, após 140 μ L da mistura foi adicionado a 1.760 μ L do tampão hidróxido de sódio (NaOH, 0.1 N), a seguir foi adicionado 100 μ L de OPT e incubado durante 15 minutos, utilizando o procedimento descrito acima para o ensaio de GSH.

Análise Estatística

Os resultados das análises de ferro, creatinina, e eritrograma foram submetidos ao teste de Student (teste t) para comparação entre médias. Os demais resultados foram submetidos ao teste post-hoc de Newman Keuls. Todos para 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais dos grupos I e IT apresentaram instalação de sinais clínicos, principalmente a partir das 48 horas PI, como: eriçamento do pêlo, prostração e heperemia ocular. Foi observado perda sanguínea fecal após às 72 horas. As culturas dos materiais utilizados para recuperação bacteriana foram positivas, reafirmando o sucesso da infecção experimental. As necropsias dos animais infectados confirmaram as alterações descritas anteriormente: icterícia, hepatoesplenomegalia, cavidade com líquido livre. Nos eritrogramas, os parâmetros contagem total de eritrócitos e volume corpuscular médio (Tabela 1) não apresentaram diferença estatística entre os 4 grupos ($P > 0,05$). Não foram evidentes, à microscopia ótica, presença de policromasia ou quaisquer outras alterações que denotassem resposta regenerativa medular frente à perda sanguínea intestinal. Os animais não foram suficientemente hidratados visto que a hemorragia só ficou evidente após o terceiro dia. A resposta de fase aguda envolve, sabidamente, alterações comportamentais como a diminuição da ingestão de água (HART, 1988). Perda de fluidos acompanhou a perda de massa eritrocitária mascarando os resultados laboratoriais.

O Ferro sérico e o índice de saturação de transferrina (Tabela 1) estiveram diminuídos entre os animais dos grupos I e IT, comparados aos respectivos grupos controles ($P < 0,01$), consequência direta da hemorragia clínica. O tratamento não parece ter causado efeito entre os animais infectados. Na infecção aguda, tal qual a proposta pelo experimento, o Fe é necessário tanto para célula hospedeira como pelo patógeno. Os macrófagos necessitam de Fe intracelular suficiente para atuar como cofator na indução de mecanismos de defesa

antimicrobianas eficazes, incluindo o *burst* oxidativo dependente de NADPH e a produção de óxido nítrico catalisada pela NO sintase (RATLEDGE et al., 2000). Limitar a disponibilidade de Fe intracelular é uma maneira na qual o hospedeiro pode controlar a replicação de patógenos intracelulares, como refletido pela regulação negativa do receptor de transferrina em macrófagos ativados (RYU et al., 2000). A DFX promove quelação de ferro não ligado à transferrina, logo IST baixo, tal qual demonstrado entre os infectados, se correlaciona com baixa global de ferro, por perda e/ou com aumento de outras formas potencialmente lesivas de armazenamento/carreamento de ferro.

A creatinina sérica (Tabela 1) esteve aumentada ($P < 0,05$) entre os animais dos grupos I e IT, comparadas aos respectivos controles, e não apresentou diferença entre eles. Para ferro sérico, IST e creatinina a infecção experimental causa alterações importantes, o tratamento com DFX não. Para CTLF, contagem de Eritrócitos e VCM, nem a infecção experimental, tampouco o tratamento causaram diferença estatística.

O rim é alvo primário da *Leptospira* durante a infecção aguda. As condições nos túbulos renais favorecem a sobrevivência dessas bactérias (MONAHAN et al., 2008; YANG et al., 2001). Lesões tubulares têm expressiva importância no mecanismo de dano renal que precede a instalação de IR em humanos (DAHER et al., 2010). Nossos resultados, obtidos pela avaliação histopatológica, indicam importante atuação protetora da DFX a nível tubular (Tabela 2).

Os túbulos contorcidos proximais e distais formaram microambientes alvo de interessante proteção tecidual. Observando o parâmetro “degeneração e necrose tubular aguda” (Figura 1), há uma clara inversão de resultados entre os

grupos I e IT, sendo que entre os animais tratados as alterações histológicas quantificadas através dos escores foram mais brandas (Tabela 2). No que se refere à “presença de material proteico (proteinose) no espaço de Bowman” o perfil de inversão foi semelhante. Não houve nenhum tipo de agravamento de lesões histológicas provocadas pela terapia testada isoladamente ou tampouco em associação à infecção experimental. Determinadas infecções bacterianas, à exemplo de Salmoneloses demonstram maior virulência em experimentos que envolvam quelação, por inibição de processos de defesa do hospedeiro (COLLINS et al., 2002). Esse mecanismo não está presente no modelo experimental do qual trata nosso trabalho, uma vez que, a nível renal, tecido particularmente sensível à infecção, a utilização do quelante não só não agravou a infecção, mas também protegeu o tecido.

A via anti-inflamatória colinérgica é mediada por Acetilcolina (ACh), que atua inibindo a produção de fator de necrose tumoral, Interleucina-1 e fator inibidor da migração de macrófagos (BOROVIKOVA et al., 2000). Os sinais da via anti-inflamatória colinérgica são eferentes e mediados por receptores nicotínicos de ACh em macrófagos teciduais. Ativação do nervo vago aferente por endotoxina ou citocinas pró-inflamatórias estimula a resposta anti-inflamatória hipotalâmica-adrenal-pituitária, levando a sinais anti-inflamatórios através do nervo eferente (PAVLOV e TRACEY, 2006; DAS, 2007). Colinesterases são enzimas responsáveis pela metabolização de ACh e, portanto, limitam o tempo de ação desse neurotransmissor.

Avaliação do perfil inflamatório através da dosagem de acetilcolinesterase renal demonstrou uma redução provocada pela infecção experimental ($P < 0,05$) e controlada pela utilização de DFX ($P > 0,05$) quando comparada aos controles

(Figura 2A). Em tecido renal a ACh possui expressiva ação anti-inflamatória, nesse contexto a redução de atividade de ACh atua como mecanismo protetivo, aumentando o tempo de ação de ACh e limitando o dano causado pela infecção. Resultados semelhantes foram encontrados por Baldissera et al. (2016), nesse estudo os autores correlacionaram o aumento de níveis de estresse oxidativo com a redução de colinesterases renais. Nossos resultados demonstram que esse mecanismo protetivo se torna desnecessário no grupo tratado com DFX. Pode-se atribuir à terapia testada um efeito anti-inflamatório próprio que dispensa mecanismos neuroquímicos consolidados, como a via colinérgica.

A peroxidação lipídica foi maior em animais infectados ($P < 0,05$) e o tratamento com DFX foi capaz de manter os valores de TBARS comparáveis estatisticamente aos dos grupos controles (Figura 2B). Diversos são os mecanismos de atuação propostos para os efeitos antioxidantes de DFX já que o estresse oxidativo pode ser iniciado pelo ferro livre e, em tais circunstâncias, a DFX atua como um inibidor eficaz através da influência direta da quelação, hipótese interessante já que trabalhos de nosso grupo (SOBROZA et al., 2014) mostram aumento de ferro e ferritina, na ausência de hemorragia clínica. Além do mais, DFX também pode afetar diretamente reações oxidativas atuando como substrato para as peroxidases e na eliminação de espécies reativas (MOREHOUSE et al., 1987). DFX também pode atuar como um doador de elétrons (TURNER et al., 1991) e inibir a atividade pro-oxidante da mioglobina e, muito provavelmente, da hemoglobina livre pós hemolítica (REEDER e WILSON, 2005). A confluência dessas possíveis ações farmacológicas desencadeou uma menor peroxidação lipídica renal nos animais do grupo tratado.

Para atenuar a evolução de danos às moléculas biológicas, existe um organizado sistema antioxidante e detoxificador formado por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. O Sistema não enzimático glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG) assume papel importante nesse cenário (PANDA et al., 2001). Sob condições de excesso de agentes oxidantes, tal qual condicionado na infecção experimental, haverá diminuição da atividade da catalase (componente enzimático) e desequilíbrio entre o consumo de glutathione reduzida (GSH) e a produção de glutathione oxidada (GSSG) (LANZETTI, et al., 2008). Nas situações em que o sistema de oxirredução está íntegro, haverá recuperação da GSH. A análise indireta do estresse oxidativo, feita por meio da concentração de tripeptídeos como a GSH e GSSG, pode fornecer informações importantes sobre o desequilíbrio redox. Nossos resultados (Figura 2C) demonstram uma diminuição na razão GSH/GSSG de 3,5 para 2 entre os animais infectados ($P < 0,05$) que não foi influenciada pelo tratamento com DFX. Embora, como já mencionado na seção anterior (TURNER et al., 1991), possa existir um mecanismo de troca eletrônica entre DFX e sistema não enzimático glutathione, nesse caso, devido à gravidade da infecção, o consumo oxidativo foi preponderante em relação a qualquer reposição possível por parte da molécula de DFX.

Em suma, os resultados apresentados nos permitem concluir que o padrão de lesão renal é severo na infecção aguda por *L. interrogans* Sorovar Canicola, e que, apesar de não termos percebido aumento de ferro biodisponível dosável sericamente, a utilização do quelante DFX, por ter demonstrado ação anti-inflamatória e antioxidante, atenua a lesão renal tecidual, sobretudo a nível tubular. Estudos com Sorovares menos patogênicos e/ou em modelos

experimentais que proporcionem uma infecção crônica poderão ser elucidativos no que se refere ao aprofundamento do conhecimento sobre terapia coadjuvante em leptospirose.

COMITÊ DE ÉTICA

Este trabalho obteve aprovação pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob o protocolo 4923201015 .

REFERÊNCIAS

BOROVIKOVA, L. V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v.405, p.458–462, 2000.

BRITTENHAM, G. M. et al. Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major. **The New England Journal of Medicine**, v.331, p.567-73, 1994.

COLLINS, H. L.; STEFAN H. E.; KAUFMANN.; ULRICH E. S. Iron chelation via deferoxamine exacerbates experimental salmonellosis via inhibition of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-dependent respiratory burst. **The Journal of Immunology**, v. 168.7, P.3458-3463, 2002.

DAHER, E. D. F.; ABREU, K. L.; SILVA JUNIOR, G. B. Insuficiência renal aguda associada à leptospirose. **Jornal brasileiro de nefrologia**, v. 32, n. 4, p. 408-415, 2010.

DAS, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Medical Science Monitor**, v.13, p. 214-221, 2007.

DA SILVA, C. B. et al. Cholinesterases as markers of the inflammatory process in rats infected with *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. **Journal of medical microbiology**, v. 61, n. 2, p. 278-284, 2012.

ELLMAN, G. L. ; COURTNEY, K. D.; ANDRES, J. R.; FEATHER-STONE R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, p.88-95,1961.

HAAKE, D. A. Hamster model of leptospirosis. **Current Protocols in Microbiology**, v. September, p.12E, 2006.

HART, B. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neuroscience Biobehavior*, v. 12, p.123-137, 1988.

HISSIN, P. J.; HILF R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, v.74(1), p. 214-226, 1976.

HUMPHRYES, P. C. et al. Vaccination with Leptospiral outer membrane lipoprotein LipL32 reduces kidney invasion of *Leptospira interrogans* serovar Canicola in hamsters. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21.4, p.546-551, 2014.

KAWASHIMA, K.; ISHIKAWA, H.; MOCHIZUKI, M. Radioimmunoassay for acetylcholine in the rat brain. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 3, p. 115–123, 1980.

KOKUDO, T. et al. Weil's disease in a patient living in Tokyo. **Internal Medicine**, v. 48, p.1707-1710, 2009.

LANZETTI, M. et al. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**, v.24(4), p.375-381, 2008.

MACEDO, N. A. et al. Influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e a evolução da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar Pomona. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p.194-200, 2004.

MONAHAN, A. M.; CALLANAN J. J.; NALLY J. E. Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. **Veterinary Pathology**, v. 46(5), p. 792-799, 2008.

MOREHOUSE, K. M.; FLITTER W. D.; MASON R. P. The enzymatic oxidation of desferal to a nitroxide free radical. **FEBS Letteres**, v. 222, p.246–250, 1987.

OHKAWA, H.; OHISHI N.; YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95(2), p. 351-358. 1979.

PANDA K. et al. Cigarette smoke-induced protein oxidation and proteolysis is exclusively caused by its tar phase: prevention by vitamin C. **Toxicology Letters**, v. 123(1), p. 21-32, 2001.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. 6, p. 1037-1040, 2006.

PHAELANTE, A. et al. N-acetylcysteine Plus Deferoxamine Improves Cardiac Function in Wistar Rats After Non-reperfused Acute Myocardial Infarction. **Journal of cardiovascular translational research**, v. 8.5, p. 328-337, 2015.

PORTER J. B. Practical management of iron overload. **British Journal of Haematology**, v.115, p.239-252, 2001.

RATLEDGE, C.; DOVER L. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 881, 2000.

REEDER, B. J.; WILSON M. T. Desferrioxamine inhibits production of cytotoxic heme to protein cross-linked myoglobin: a mechanism to protect against oxidative stress without iron chelation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 18, p.1004–1011, 2005.

RYU, S. Y. et al. Modulation of transferrin synthesis, transferrin receptor expression, iNOS expression and NO production in mouse macrophages by cytokines, either alone or in combination. **Anticancer Research**, v. 20, p.3331, 2000.

SILVA, E. F. et al. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. **Vaccine**, v. 26, p.3892–3896, 2008.

SITPRIJA, V.; LOSUWANRAK, K.; KANJANABUCH, T. Leptospiral nephropathy. **Seminars in Nephrology**, v. 23, p. 42-48, 2003

SOBROZA, A. O. et al. Iron metabolism in hamsters experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar Pomona: Influence on disease pathogenesis. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 37, n. 5, p. 299-304, 2014.

STEWART A. et al. An improved animal model for studying desferrioxamine. **British Journal of Haematology**, v. 95, p. 654–659, 1996.

TURNER, J. J. et al. The formation of free radicals by cardiac myocytes under oxidative stress and the effects of electron-donating drugs. **Biochemistry Journal**, v. 277, p. 833–837, 1991.

VALVASSORI, S. S. et al. Effect of N-acetylcysteine and/or deferoxamine on oxidative stress and hyperactivity in an animal model of mania. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 32.4, p.1064-1068, 2008.

WOLKMER, P. et al. Trypanosoma evansi: cholinesterase activity in acutely infected Wistar rats. **Experimental Parasitology**, v.125, p. 251–255, 2010.

YANG, C. W.; WU M. S.; PAN M. J. Leptospirosis renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation** v. 16(5), p.73-77, 2001

Tabela1: Média e Desvio Padrão (\pm) para parâmetros do Ferro, Creatinina e Eritrograma com valor de P destacando a inexistência de diferença entre os grupos I e IT.

Parâmetro	C	CT	I	IT	P: I x IT
Fe sérico mcg/dl	282,70 \pm 13,91	232, 15 \pm 11,50	140, 38 \pm 17,24	143,66 \pm 29,32	P>0,05
CTLF mcg/dl	551,27 \pm 25,92	497,86 \pm 30,44	513,96 \pm 67,96	498,25 \pm 62,13	P>0,05
IST %	51,94 \pm 3,72	53,86 \pm 4,66	27,73 \pm 4,81	28,01 \pm 9,12	P>0,05
Creatinina mg/dl	0,72 \pm 0,09	0,81 \pm 0,06	2,60 \pm 1,31	2,24 \pm 1,54	P>0,05
Eritrócitos x 10 ⁶ / μ L	8,62 \pm 0,45	8,37 \pm 0,54	8,12 \pm 0,86	8,27 \pm 0,91	P>0,05
VCM (fl)	55 \pm 0,63	56 \pm 0,42	54 \pm 0,51	54 \pm 0,72	P>0,05

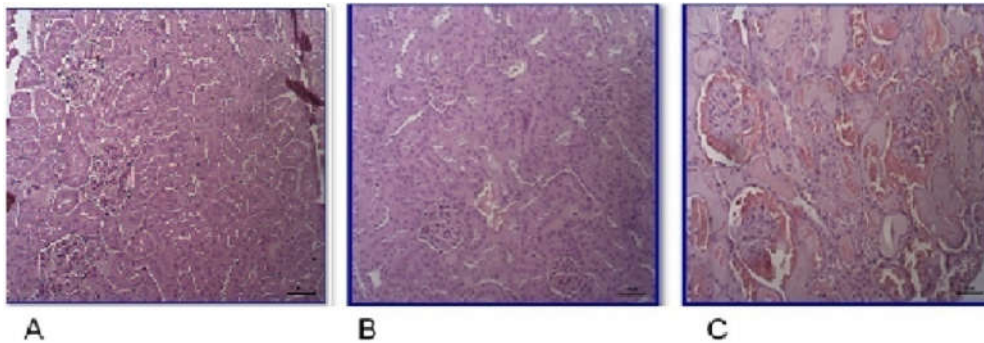


Figura 1: Histopatologia tubular renal (Hematoxilina Eosina 200X) A: Animal do grupo C, conservando aspecto fisiológico de glomérulos e túbulos contorcidos, B: Animal do grupo IT: Túbulos contorcidos com leve edemaciamento, degeneração em alguns segmentos tubulares e C: Animal do grupo I: Túbulos contorcidos edemaciados e com a estrutura tubular necrosada ou em degeneração. Glomérulos edemaciados, com o espaço urinário desestruturado e comprometido pela presença de eritrócitos.

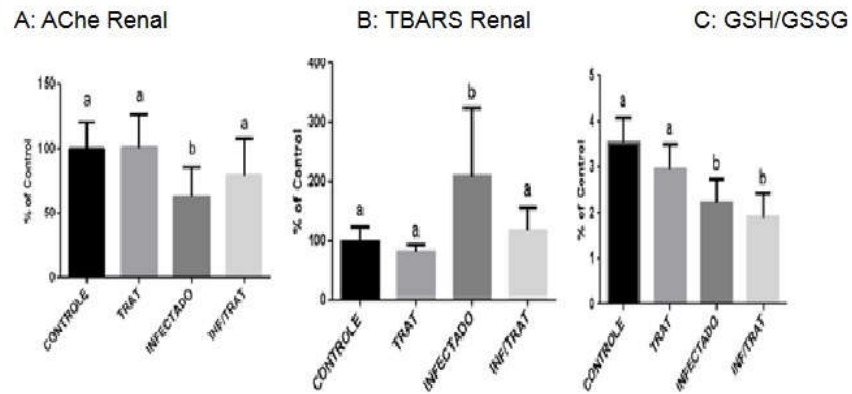


Figura 2: Efeitos da deferoxamina (50 mg / Kg) nem: **A**: Acetilcolinesterase renal, **B**: TBARS e **C**: relação de GSH / GSSG no rim. Os dados são expressos como % do controle. Cada barra representa a média \pm Desvio Padrão. A média para uma variável com sobrescritos sem uma letra comum difere por ANOVA bidirecional, seguida pelo teste post-hoc de Newman Keuls ($p < 0,05$).

Tabela 2: Avaliação do tecido renal de hamsters infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola. DNTA: degeneração e necrose tubular aguda; PT: proteinose tubular; PCIT: presença de cilindros proteináceos intratubulares; HIT: hemorragia intratubular; H: hiperemia; NTI: nefrite tubulointersticial linfoplasmocitária; PNIT: presença de neutrófilos intratubulares; PMPEB: presença de material protéico (proteinose) no espaço de Bowman; -: ausência de lesão; +: lesão mínima; ++: lesão leve; +++: lesão moderada; ++++: lesão acentuada

	DNTA	PT	PCIT	HIT	H	NTI	PNIT	PMPEB
C1	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	-	-	-	-	-	-	-	-
CT1	-	-	-	-	-	-	-	-
CT2	-	-	-	-	-	-	-	-
CT3	-	-	-	-	-	-	-	-
I1	++	+++	++	++++	++++	+	+	+++
I2	++++	++++	++++	++++	++++	+	+	+++
I3	++++	++++	++++	++++	++++	+	+	+++
I4	+++	++++	++++	++++	++++	+	+	+++
I5	+++	++++	++++	++++	++++	+	-	+
I6	+++	+++	++++	+++	+++	+	+	+
IT1	++	+++	+++	+++	+++	+	-	+++
IT2	++	++++	++++	+++	++	+	+	++
IT3	++	++++	++++	+++	++	+	+	++
IT4	+	-	+	+	-	-	-	-
IT5	+	+++	+++	++	+	+	+	++
IT6	++	++++	++++	+++	++	+	-	+++

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tanto hemorragias quanto eventos hemolíticos, têm sido descritos nas apresentações graves de infecção por *Leptospira interrogans* (BERNHEIMER e BEY, 1986; LANGSTON e HEUTER, 2003; SOBOZA et al., 2014). Leptospirose pode provocar determinadas situações nas quais os eritrócitos podem se tornar alvos diretos como consequência de alterações nas proteínas de superfície reconhecidas como estranhas, ou atingidos indiretamente se existir resposta humoral a substâncias próprias (ZACHARY e McGAVIN, 2013). O grau de lise dos eritrócitos, sabidamente, depende do tipo e da quantidade de anticorpos que se ligam à célula, e do envolvimento de fixação do complemento. A maioria dos casos de AHIM são resultado da ligação da IgG e do complemento aos eritrócitos (McCULLOUGH, 2003; GERSHWIN, 2010).

A patogenia da TIM causada por agentes infecciosos geralmente é multifatorial ou de causa desconhecida. A TIM associada à infecção pode ser causada por reação cruzada de anticorpos, produção de autoanticorpos induzida por bactérias, exposição de antígenos normalmente ocultos na membrana plaquetária pelo organismo, ligação de anticorpos antimicro-organismo ao agente infeccioso ligado à membrana plaquetária ou indução de imunocomplexos que se aderem à membrana plaquetária (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

Utilizando tecnologia e técnicas adequadas, as MPs, quando marcadas por CD 61 juntamente com anexina são uma importante ferramenta e tornam-se elucidativas em estudos de patogenia quando a atenção é voltada para fenômenos de ativação e consumo plaquetários (FRANÇA et al., 2015). Adicionalmente, avaliação de presença de anticorpos ligados à parede dos eritrócitos e plaquetas contribui cientificamente para determinarmos se o envolvimento hemolítico e/ou hemorrágico são atribuídos ou não a mecanismos imunomediados.

O rim é alvo primário da *Leptospira* durante a infecção aguda. As condições nos túbulos renais favorecem a sobrevivência dessas bactérias (MONAHAN et al., 2008; YANG et al., 2001). Lesões tubulares têm expressiva importância no mecanismo de dano renal que precede a instalação de

Insuficiência Renal Aguda em humanos (DAHER et al., 2010). Em localizações onde é endêmica, leptospirose é responsável por quantidade expressiva dos casos de Insuficiência Renal Aguda, cuja incidência varia de 10% a 60%, dependendo da gravidade da doença e fatores relacionados ao hospedeiro (SITPRIJA et al., 2003).

No artigo, buscamos demonstrar o envolvimento de anticorpos com ativação de complemento na fisiopatogenia pré-hemolítica envolvida na doença aguda. IgG com ativação de sistema complemento foi encontrada em maior quantidade em eritrócitos de animais infectados. Ao mesmo tempo, pelo comportamento dos testes rotineiros de coagulação adicionados à ausência de imunoglobulinas G e M ligadas às plaquetas e presença de correlação estatística entre diminuição de plaquetas e fibrinogênio, proporcionamos um entendimento que, nesta infecção experimental, o componente “consumo” foi preponderante para explicar o decréscimo na contagem de plaquetas e a hemorragia clínica entre os animais infectados.

Levando-se em consideração os resultados do manuscrito, foi possível inferir que DFX, na dose em que foi utilizada, atua, coadjuvadamente, reduzindo o dano renal agudo. A confluência de diversos possíveis mecanismos sinérgicos atribuídos à DFX desencadeou uma menor peroxidação lipídica renal, nos animais do grupo tratado, acompanhada de uma modulação no sistema antiinflamatório colinérgico, as custas de consumo de reservas antioxidantes e ratificada pela observação de atenuação nas lesões histopatológicas.

Estudos futuros relacionados às flexibilizações das doses de DFX, bem como os que considerem a utilização de outros Sorovares de *Leptospira interrogans* podem trazer contribuições interessantes e complementares aos achados desta Tese. Modelos experimentais que permitam avaliação do estado crônico também podem somar cientificamente neste contexto.

5. REFERÊNCIAS

ABELA-RIDDER, B.; SIKKEMA, R.; HARTSKEERL, R. A. Estimating the burden of human leptospirosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.36, p. 5–7, 2010.

ADLER, B.; DELA PEÑA, M. A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, n.3, p. 287-296, 2010.

ALVES, V. A. et al. Leptospiral antigens (*L. interrogans* serogroup icterohaemorrhagiae) in the kidney of experimentally infected guinea pigs and their relation to the pathogenesis of the renal injury. **Experimental Pathology**, v. 42, p.81–93, 1991.

BERCKMANS, R. J.; NEIUWLAND, R.; BOING, A. N.; ROMIJN F. P.; HACK C. E.; STARK, A. Cell derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 85, n.4, p. 639-646, 2001.

BERNHEIMER A.W.; BEY, R.F.; Copurification of *Leptospira interrogans* Serovar pomona Hemolysin and Sphingomyelinase C. **Infection and Immunity**, v. 54, p.262-264, 1986.

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

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.

BUNNAG, D. et al. Plasmodicidal effect of desferrioxamine B in human vivax or falciparum malaria from Thailand. **Acta tropica**, v. 52.1, p.59-67, 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. D.; SALABERRY, S. R. S.; SOUZA, M. A. D.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Predominant *Leptospira* spp. serovars in serological diagnosis of canines and humans in the City of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n.2, p. 217-222, 2011.

CHIERAKUL, W. et al. Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, p.254–260, 2008.

DAHER, E. D. F.; ABREU, K. L.; SILVA JUNIOR, G. B. Insuficiência renal aguda associada à leptospirose. **Jornal brasileiro de nefrologia**, v. 32, n. 4, p. 408-415, 2010.

DE BRITO T. et al. Immunohistochemical and in situ hybridization studies of the liver and kidney in human leptospirosis. **Virchows Archiv**, v. 448, p.576–583, 2006.

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.

EDWARDS, C. N.; NICHOLSON, G.D. ; EVERARD, C.O. Thrombocytopenia in leptospirosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.31, p. 827–829, 1982.

FAINE, S. et al. 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.

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. **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, n.4, p. 223-230, 2008.

FRANÇA, C.N.; DE OLIVEIRA, I.M.C.; DO AMARAL, J.B.; TEGANI, D.M.; FONSECA, F. A. H. Micropartículas como Possíveis Biomarcadores da Doença Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.104 , n.2, p. 169-174, 2015.

FREI, B.; STOCKER, R.; AMES, B. N. Antioxidant defences and lipidperoxidation 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.

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.

GERSHWIN, L. J. Autoimmune Diseases in Small Animals. **Veterinary Clinical Small Animal**, v.40, p.439-457, 2010.

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

HALLIWELL B. Oxidants and human disease: some new concepts. **The FASEB Journal**, v. J1, p. 358-364, 1987.

HALLIWELL B. Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: what is its mechanism of action? **Free Radical Biology & Medicine**, v.7, p.645-5, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford University Press**, Oxford. 4ª Ed., 704, 2007.

HARTSKEERL, R.A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W.A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p.494–501, 2011.

HERRING, J. M.; McMICHAEL, M. A.; SMITH, S. A. Microparticles in Health and Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.27, p.1020-1033, 2013.

HUYNH, H.Q. et al. Lactoferrin and desferrioxamine are ineffective in the treatment of *Helicobacter pylori* infection and may enhance *H. pylori* growth and gastric inflammation in mice. **Letters in Applied Microbiology**, v.48, p.517–522, 2009.

ISAH, M. B.; MOHAMMED A. I. The role of antioxidants treatment on the pathogenesis of malarial infections: a review. **Parasitology research**, v. 113, n.3, p.801-809, 2014.

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.

LANGSTON C.E.; HEUTER K.J. Leptospirosis: A re-emerging zoonotic disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, p.791-807, 2003.

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

MALLAT, Z.; BENAMER, H.; HUGEL, B.; BENESSIANO, J.; STEG, P.G.; FREYSSINET, J. M.; et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. **Circulation**, v.101, n.8, p.841-843, 2000.

MONAHAN, A. M.; CALLANAN, J. J.; NALLY J. E. Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. **Veterinary Pathology**, v. 46(5), p. 792-799, 2008.

PARK M. J. et al. Effect of alpha-tocopherol and deferoxamine on methamphetamine-induced neurotoxicity. **Brain Research**, v. 1109, p. 176-182, 2006.

PRASS K. et al. Desferrioxamine induces delayed tolerance against cerebral ischemia in vivo and in vitro. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 22, p. 520-525, 2002.

McCULLOUGH, S. Immune-mediated hemolytic anemia: understanding the nemesis, **Veterinary Clinical Small Animal**, v.33, p.1295-1315, 2003.

MU, D. et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha and erythropoietin upregulation with deferoxamine salvage after neonatal stroke. **Experimental Neurology**, v.195, p.407-415, 2005.

MURRAY, G. L. et al. Leptospira interrogans requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. **Microbes and Infection**, v.10.7, p. 791-797, 2008.

SITPRIJA, V.; LOSUWANRAK, K.; KANJANABUCH, T. Leptospiral nephropathy. **Seminars in Nephrology**, v. 23, p. 42-48, 2003

SOBROZA Â. O. et al. Iron metabolism in hamsters experimentally infected with Leptospira interrogans serovar Pomona: Influence on disease pathogenesis. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.37, n.5, p.299-304, 2014.

SRIKRAM, A. et al. Cross-protective immunity against leptospirosis elicited by a live, attenuated lipopolysaccharide mutant. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n.6, p. 870-879, 2011.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. 2ª ed. 2011.

TRAORE, O. et al. Preliminary report on the use of desferrioxamine in the treatment of Plasmodium falciparum malaria. **American journal of hematology**, v. 37.3, p.206-208, 1991.

TSE, K. C. et al. Potential benefit of plasma exchange in treatment of severe icteric leptospirosis complicated by acute renal failure. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n.2, p.482-484, 2002.

TURGUT M. et al. Thrombocytopenia complicating the clinical course of leptospiral infection. **Journal of International Medical Research**, v.30, p.535–540, 2002.

VASINA, E.M. et al. Aging- and activation-induced platelet microparticles suppress apoptosis in monocytic cells and differentially signal to proinflammatory mediator release. **American Journal of Blood Research**, v.3, n.2, p.107-123, 2013.

VISITH, S.; KEARKIA, T. P. Nephropathy in leptospirosis. **Journal of postgraduate Medicine**, v. 51, p.184–188, 2005.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th ed. 2010. 1206p.

YANG, C. W.; WU M. S.; PAN M. J. Leptospirosis renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 16, n.5, p.73-77, 2001.

ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. **Bases da Patologia em Veterinária**. 5ª ed. 2013. p. 1324.

