

**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E MEDICINA**

**INVESTIGATIVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO SANGUE PERIFÉRICO DE  
PACIENTES COM LEPTOSPIROSE GRAVE**

**ALAN MOREIRA DE ARAÚJO**

**SALVADOR – BAHIA – BRASIL**  
**2013**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E MEDICINA**  
**INVESTIGATIVA**

**DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO SANGUE PERIFÉRICO**  
**DE PACIENTES COM LEPTOSPIROSE GRAVE**

**ALAN MOREIRA DE ARAÚJO**

Orientador: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Co-orientador: Eliana Almeida Gomes Reis

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

**SALVADOR – BAHIA – BRASIL**  
**2013**

“DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES  
COM LEPTOSPIROSE GRAVE.”

ALAN MOREIRA DE ARAÚJO

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dr. Roberto José Mayer Nascimento  
Professor Titular  
ICS/UFBA



---

Dra. Maria da Conceição Chagas de Almeida  
Pesquisadora Titular  
CPqGM / FIOCRUZ



---

Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras  
Pesquisadora Titular  
CPqGM / FIOCRUZ

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Ciência, que sempre me instigou a querer saber mais e mais. Dedico, também, ao mundo, pois pretendo utilizar experiência adquirida durante o desenvolvimento desse trabalho para fazer algo útil para a humanidade.

“Nós temos que tentar deixar o mundo um lugar melhor do que quando nós entramos nele. Como indivíduos, nós podemos fazer a diferença.”

Michio Kaku

## **AGRADECIMENTOS**

Quando me falaram desse trabalho pela primeira vez, eu pouco sabia sobre leptospirose ou técnicas de laboratório. O que eu sabia, de verdade, era da minha vontade de querer aprender e saber sempre mais. Aceitei esse desafio de peito aberto, entretanto eu jamais poderia prever todos os percalços que apareceriam durante a minha jornada. Talvez, sozinho, eu sucumbisse. Ou, provavelmente, não teria amadurecido tanto com essa nova experiência de vida. Se hoje eu estou aqui terminando o meu Mestrado, devo isso não só aos meus próprios esforços, mas, também, à atuação direta de pessoas que foram fundamentais para o meu desenvolvimento profissional e pessoal. Quero deixar registrado toda a minha gratidão a todos que foram tão importantes nessa etapa da minha vida.

### **A Deus**

Por tudo.

### **A minha mãe Luzia**

Por todo amor, apoio, carinho e força. Obrigado por ser meu norte e meu exemplo de vida.

### **A meu pai Renato**

Por todo carinho, apoio e incentivo. Obrigado por sempre ter me apoiado em todas as minhas decisões e me ajudado a chegar onde estou.

### **A minha esposa Nicolli**

Por todo amor, apoio, companheirismo e compreensão. Obrigado por me ajudar em todos os momentos e por me fazer mais feliz e mais forte a cada dia.

### **A minha irmã Aline e ao meu cunhado Gabriel**

Vocês fazem parte dessa trajetória. Obrigado por toda alegria, apoio e carinho.

### **A toda minha Família**

Por toda alegria que me proporcionam. Em especial à minha avó Evanir, que sempre acreditou em mim.

### **A Dra. Eliana Reis**

Pois sem ela nada disso teria acontecido. Obrigado por toda dedicação, apoio, incentivos e conselhos, mas principalmente, obrigado por acreditar em mim.

### **A Dr. Alberto Dutra**

Por ter me dado a oportunidade de trabalhar na Fiocruz-BA e por ter compartilhado o seu conhecimento comigo.

**A Dr. Mitermayer Galvão dos Reis**

Por ter me aceitado como aluno de mestrado e por toda ajuda dada durante o desenvolvimento desse trabalho.

**Aos Doutores Daniel Athanzio, Albert Ko, Guilherme Ribeiro e José Hagan**

Por toda ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

**A Guilherme Araújo**

Pela ajuda na coleta de amostra dos pacientes.

**A Theomira Carmo e Jaqueline Cruz**

Pela ajuda nas coletas de sangue e realização dos hemogramas.

**Aos funcionários das plataformas de Microscopia Eletrônica e de Citometria**

Por todo auxílio nos experimentos.

**Aos amigos que fiz na Fiocruz**

Lúcio Barbosa, Thassila Pitanga, Filipe Rego, Adenizar Chagas, Eder Silva, Lairton Borja, Marcos Farias, Isaac Queiroz, Cleiton Santos, Maurício Bandeira e todos os outros pela infinita ajuda, convívio e palavras de conforto e incentivo.

**Aos colegas do LPBM e da Pós-graduação**

Pela convivência diária, auxílio, aprendizado e momentos de descontração.

**Ao pessoal da secretaria do LPBM**

Em especial a Cleiton Guimarães pelo convívio e suporte administrativo.

**Aos professores do curso de Biotecnologia do CPqGM**

Pelo acréscimo de conhecimentos importantíssimos para o meu crescimento profissional.

**Aos professores da banca**

Que gentilmente aceitaram compor a banca de avaliação desse trabalho.

ARAÚJO, Alan Moreira de. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio no sangue periférico de pacientes com leptospirose grave. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

## RESUMO

Leptospirose é uma zoonose que pode levar a graves complicações, como a síndrome de Weil e a síndrome pulmonar hemorrágica, porém os mecanismos patogênicos que levam ao desenvolvimento das formas graves da doença ainda são desconhecidos. Após a penetração no indivíduo, as leptospiras invadem a corrente sanguínea e se disseminam para os órgãos. Dessa forma, a leptospirose apresenta características semelhantes as da sepse, doença que tem o estresse oxidativo como um dos principais responsáveis pelo seu agravamento. Entretanto, pouco se sabe sobre o envolvimento do estresse oxidativo na leptospirose. O presente estudo teve como objetivo avaliar se a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e os níveis do antioxidante glutatona (GSH) estão relacionados com as manifestações clínicas mais graves de pacientes hospitalizados com leptospirose. A produção de ROS e os níveis de GSH foram avaliados nas amostras de sangue de doze pacientes e nove indivíduos saudáveis através dos ensaios de quimioluminescência e de absorvância, respectivamente. Nós observamos que os níveis de ROS estavam aumentados ( $p=0.0012$ ) e os de GSH diminuídos ( $p=0.0002$ ) nos pacientes quando comparados com os indivíduos saudáveis. Dentre os pacientes, a diminuição de GSH estava correlacionada com a trombocitopenia ( $r=0.63$ ) e com elevados níveis de creatinina ( $r= -0.64$ ), enquanto que a produção de ROS estava fortemente correlacionada com os níveis elevados de potássio sérico ( $r=0.8$ ). A compreensão da importância biológica de ROS e do GSH na leptospirose faz-se necessária, pois uma investigação mais detalhada pode levar ao desenvolvimento de terapias adjuvantes focadas no estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** Leptospirose; *Leptospira*; glutatona; espécies reativas de oxigênio;

## ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonotic disease that causes severe manifestations such as Weil's disease and pulmonary hemorrhage syndrome, however the underlying mechanisms that lead to the development of severe forms are not clear. Leptospire penetrate through skin, reach the bloodstream and disseminate to the organs. Thus, leptospirosis and sepsis have similar characteristics. Although there is vast literature demonstrating that oxidative stress play an important role in the severity of sepsis, none is known about it in leptospirosis. The aim of this study was to evaluate whether reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant reduced glutathione (GSH) levels are related to complications in patients hospitalized with leptospirosis. ROS production and GSH levels were measured in blood samples of twelve patients and nine healthy controls using chemiluminescence and absorbance assays. We found that ROS production was higher ( $p=0.0012$ ) and GSH levels were lower ( $p=0.0002$ ) in leptospirosis patients compared with healthy individuals. Among patients, GSH depletion was correlated with thrombocytopenia ( $r=0.63$ ) and elevated serum creatinine ( $r= -0.64$ ), while a strong positive correlation was observed between ROS production and elevated serum potassium ( $r=0.8$ ). Additional investigation of the biological significance of ROS production and GSH levels is warranted as they may guide the development of novel adjuvant therapies for leptospirosis targeting oxidative stress.

**Key words:** Leptospirosis; *Leptospira*; glutathione; reactive oxygen species

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação de peroxinitrito na inflamação. ....	18
Figura 2: Oxidação e reciclagem do GSH. ....	20
Figura 3: Fontes de oxidantes e antioxidantes no corpo humano. ....	21

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

<b>ARF</b>	Acute Renal Failure
<b>CID</b>	Coagulação Intravascular Disseminada
<b>DMSO</b>	Dimethyl Sulfoxide
<b>DTNB</b>	Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>GLP</b>	Glicolipoprotena
<b>GSH</b>	Glutathiona em estado reduzido
<b>GSSG</b>	Glutathiona em estado oxidado
<b>HBSS</b>	Hank's Balanced Salt Solution
<b>HCM</b>	Hospital Couto Maia
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>iNOS</b>	inducible Nitric Oxide Synthase
<b>LPS</b>	Lipopolissacardeo
<b>MAT</b>	Microagglutination Test
<b>MCP-1</b>	Monocyte chemoattractant protein-1
<b>MIN</b>	Minuto
<b>NAC</b>	N- acetylcysteine
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
<b>NADPH oxidase</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
<b>NF-KB</b>	Nuclear Factor Kappa-B
<b>NI</b>	Normal Individual
<b>NO</b>	Nitric Oxide
<b>NON-ARF</b>	Non-Acute Renal Failure

<b>RBC</b>	Red Blood Cell
<b>RNS</b>	Reactive Nitrogen Species
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>RS</b>	Reactive Species
<b>SOD</b>	Superoxide Dismutase
<b>TBARS</b>	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
<b>TGO</b>	Transaminase Glutâmico Oxalacética
<b>TGP</b>	Transaminase Glutâmico Pirúvica
<b>TLR</b>	Toll-Like Receptor
<b>TLR 2</b>	Toll-Like Receptor 2
<b>TLR 4</b>	Toll-Like Receptor 4
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor alpha
<b>XO</b>	Xanthine Oxidase

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1. Leptospirose: aspectos gerais .....	13
1.2. Diagnóstico e tratamento .....	14
1.3. Patogenia .....	15
1.4. Resposta imune .....	16
1.5. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio .....	16
1.6. Glutathiona .....	19
1.7. Estresse oxidativo .....	20
1.8. Morfologia dos eritrócitos .....	22
2. HIPÓTESE .....	23
3. OBJETIVOS .....	23
3.1. GERAL .....	23
3.2. ESPECÍFICOS .....	23
4. JUSTIFICATIVA .....	24
5. METODOLOGIA .....	25
5.1. PACIENTES .....	25
5.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	25
5.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	25
5.4. COMITÊ DE ÉTICA .....	25
5.5. DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE .....	25
5.6. EXAMES LABORATORIAIS .....	26
5.7. REVISÃO DE PRONTUÁRIOS .....	26
5.8. AMOSTRAS DE SANGUE .....	26
5.9. QUANTIFICAÇÃO DE ROS EM SANGUE TOTAL .....	26
5.10. QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA (GSH) .....	27
5.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	28
6. RESULTADOS .....	29
7. DISCUSSÃO .....	35
8. CONCLUSÃO .....	38
9. REFERÊNCIAS .....	39

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Leptospirose: aspectos gerais

A leptospirose é uma doença infecciosa causada por bactérias do gênero *Leptospira* que acomete animais domésticos, silvestres e o homem. É contraída através do contato direto com a urina de animais infectados ou através de água ou locais úmidos que estejam contaminados com o microorganismo (Faine, 1994). Os ratos estão entre os principais transmissores, além de outros roedores, marsupiais, cães e animais usados na pecuária (Bharti et al., 2003; Vinetz, Glass, Flexner, Mueller, & Kaslow, 1996). Esta zoonose tem importância global e ocorre tanto em países em desenvolvimento, como em países industrializados, entretanto apresenta maior incidência em países tropicais e afeta principalmente pessoas de baixa renda, estando geralmente associada a locais que possuem saneamento básico precário, como as favelas e zonas rurais (Bharti et al., 2003; McBride, Athanazio, Reis, & Ko, 2005; Vinetz, 2001). Em locais endêmicos, a quantidade de pessoas infectadas aumenta durante a época de chuvas. Diversos surtos também já foram registrados após atividades recreativas em rios e lagos e em locais onde ocorreram alagamentos (Vinetz, 2001). Algumas ocupações oferecem maiores riscos de infecção, como trabalhadores de minas, esgoto e de plantação de arroz, soldados, ordenhadores de vaca e pecuaristas que trabalham em contato com suínos e bovinos (Faine, 1994).

Mais de 500.000 casos de leptospirose são notificados no mundo a cada ano, com taxas de mortalidade acima de 10% (Ko, Goarant, & Picardeau, 2009). Só no Brasil, mais de 10.000 casos de leptospirose grave são registrados anualmente (McBride et al., 2005). A leptospirose era uma doença tipicamente rural, mas devido ao crescimento das metrópoles e à migração para as grandes cidades, a doença tornou-se um grave problema urbano. A situação pode tornar-se mais crítica, pois estima-se que o número de favelas dobre nos próximos vinte e cinco anos (UN-habitat, 2003). Acredita-se que o número de casos esteja subestimado, uma vez que a doença pode ser facilmente confundida com dengue ou outras doenças que apresentem um quadro febril agudo (McBride et al., 2005; Vinetz, 2001).

A leptospirose geralmente apresenta-se com um espectro de sinais e sintomas variados e inespecíficos, como febre alta, dor de cabeça e mialgia, fatores que podem levar a diagnóstico incorreto na fase inicial da doença devido à semelhança com outras doenças como dengue, gripe e hepatite. Aproximadamente 10% progridem para manifestações mais graves como icterícia, insuficiência renal e hemorragias (Síndrome de Weil). A hemorragia pulmonar é a forma mais letal da doença e as taxas de mortalidade em indivíduos com esse quadro

podem passar dos 50% (Dutta & Christopher, 2005; McBride et al., 2005; Spichler et al., 2008).

As leptospiras penetram no organismo através de lesões na pele ou através das mucosas dos olhos, nasofaríngea e rapidamente se disseminam pela corrente sanguínea e estabelecem uma infecção sistêmica. O período de incubação varia em média de 5 a 14 dias até o aparecimento dos primeiros sintomas. O início dos sintomas está diretamente relacionado com o aparecimento de anticorpos aglutinantes e a eliminação das leptospiras se dá através da opsonização e fagocitose das bactérias (Bharti et al., 2003; Ko et al., 2009; Wang, Sullivan, Sullivan, & Mandell, 1984).

O dano vascular e endotelial é uma característica da leptospirose grave que causa o rompimento de vasos capilares, hemorragias e plaquetopenia. As lesões primárias ocorrem no endotélio de pequenos vasos, levando à isquemia localizada e causando necrose tubular renal, danos hepatocelulares, meningites e miosites (Dutta & Christopher, 2005; Faine, 1999). A cascata de coagulação encontra-se ativada durante a doença, sendo que a Coagulação Intravascular Disseminada (CID) é comumente encontrada em pacientes que apresentam as manifestações mais graves (Ko et al., 2009). A trombocitopenia é uma característica marcante da leptospirose, entretanto observou-se, em modelos experimentais, que a diminuição do número de plaquetas não está relacionada com a CID (Yang et al., 2006b).

## **1.2. Diagnóstico e tratamento**

A sorologia é o método mais usado para o diagnóstico, sendo que o teste de microaglutinação (MAT) é utilizado como padrão devido a sua alta sensibilidade e especificidade (Bharti et al., 2003). O critério de confirmação da MAT inclui a soroconversão, um aumento de quatro vezes ou mais nos títulos entre duas amostras coletadas com um intervalo de 14 - 30 dias, ou com um título maior ou igual a 800 na primeira amostra (Gouveia et al., 2008).

Uma vez diagnosticado, o paciente com leptospirose é primariamente tratado com antibióticos. Entretanto, em infecções menos graves (que não requerem hospitalização), a maioria dos casos se resolve espontaneamente, sem a necessidade do uso de medicamentos. Nos casos mais graves é necessária a hospitalização e a administração de antibiótico de maneira intravenosa.

Ainda há muita controvérsia sobre os benefícios do tratamento com antibióticos devido à falta de evidências e de estudos clínicos randomizados que advoguem a favor do uso desses medicamentos (Brett-Major & Coldren, 2012). Alguns estudos com pacientes tratados

e não tratados mostram que não há diferença estatística entre os grupos em relação à normalização dos parâmetros bioquímicos, duração da doença e mortalidade (Katz, Ansdell, Effler, Middleton, & Sasaki, 2001; Vinetz, 2003). Outros apontam que o uso de antibióticos diminui a duração da doença (quando administrados precocemente) e reduz as taxas de mortalidade dos casos mais graves (Katz et al., 2001; Watt et al., 1988).

Pacientes com leptospirose grave podem sofrer danos em diversos órgãos e, até mesmo, evoluírem para falência múltipla de órgãos. Nestes casos, além do tratamento convencional com antibióticos, faz-se necessário o uso de terapias adjuvantes, como diálise (nos casos de insuficiência renal) e ventilação mecânica (nos casos de comprometimento respiratório), além de constante monitoração cardíaca. Ainda assim, os pacientes podem sofrer colapso cardiovascular e progredirem para um quadro de choque séptico, pois nem sempre as terapias convencionais são suficientes. Alguns trabalhos na literatura mostram que imunoglobulina intravenosa e corticóides podem ser utilizados quando o indivíduo não responde à terapia convencional (Dursun, Bostan, Artac, Varan, & Suleymanlar, 2007; Shenoy, Nagar, Chowdhury, Bhalgat, & Juvale, 2006).

### **1.3. Patogenia**

A patologia resultante da infecção por *L. interrogans* é causada, predominantemente, pela ativação do sistema imune inato devido à disseminação das bactérias pela corrente sanguínea, o que pode levar ao comprometimento renal e pulmonar (McBride et al., 2005; Vinetz et al., 1996). Ainda não se sabe quais fatores determinam a gravidade da doença, mas alguns estudos sugerem que as formas clínicas apresentadas pelos indivíduos infectados dependem da cepa ou sorovar da *Leptospira* (Thaipadungpanit et al., 2007), do tamanho do inóculo (Ganoza et al., 2006), e da resposta imune do hospedeiro (características como idade e estado de saúde do indivíduo enquadram-se nesse último item) (Evangelista & Coburn, 2010; Wagenaar et al., 2009a; Wagenaar et al., 2009b). Em modelos animais como hamsters e cobaias, as alterações no fígado e nos rins parecem estar relacionadas com a quantidade de leptospiras e seus fatores citotóxicos, a exemplo do complexo glicolipoproteico (GLP) (Diament, Brunialti, Romero, Kallas, & Salomao, 2002). Já foi mostrado que a GLP de *L. interrogans* inibe a atividade das bombas de sódio e potássio nas células tubulares renais de coelhos e ativa monócitos do sangue periférico (Younes-Ibrahim et al., 1995). Entretanto, poucas leptospiras são encontradas nos pulmões de animais infectados que apresentam hemorragia pulmonar (Bharti et al., 2003; Chagas-Junior et al., 2009). Esse fato reforça a

ideia de que mecanismos patogênicos indiretos podem estar sendo causados pela resposta imune do hospedeiro.

#### **1.4. Resposta imune**

Ainda não está bem esclarecido o papel da imunidade do hospedeiro na leptospirose ou na patogênese da doença. Estudos mostram que o lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana das leptospiros ativa linhagens de monócitos humanos por um mecanismo dependente do Toll-like receptor tipo 2 (TLR-2), diferentemente da resposta ao LPS de bactérias gram-negativas, onde a resposta imunológica se dá pela via do TLR-4 (Werts et al., 2001). Nem o LPS de leptospiros viáveis, tampouco leptospiros mortas por aquecimento foram capazes de ativar monócitos humanos de linhagem pela via TLR-4. Ainda, camundongos deficientes de TLR-2 não foram capazes de produzir as citocinas pró-inflamatórias TNF  $\alpha$  e IL-6 quando inoculados com LPS de leptospiros, sugerindo que essa via de sinalização é fundamental para que haja uma resposta efetiva contra essas bactérias (Werts et al., 2001). Camundongos C57BL/6 knock out para TLR-4 e TLR-2 desenvolveram a síndrome de Weil e sofreram colonização massiva nos órgãos. Ainda assim, esses animais apresentaram uma resposta inflamatória inesperada, independente dos TLRs, levantando a hipótese de que outras células (linfócitos T e B) e outros receptores (Nod-Like Receptors) podem estar diretamente envolvidos na resposta imune (Chassin et al., 2009).

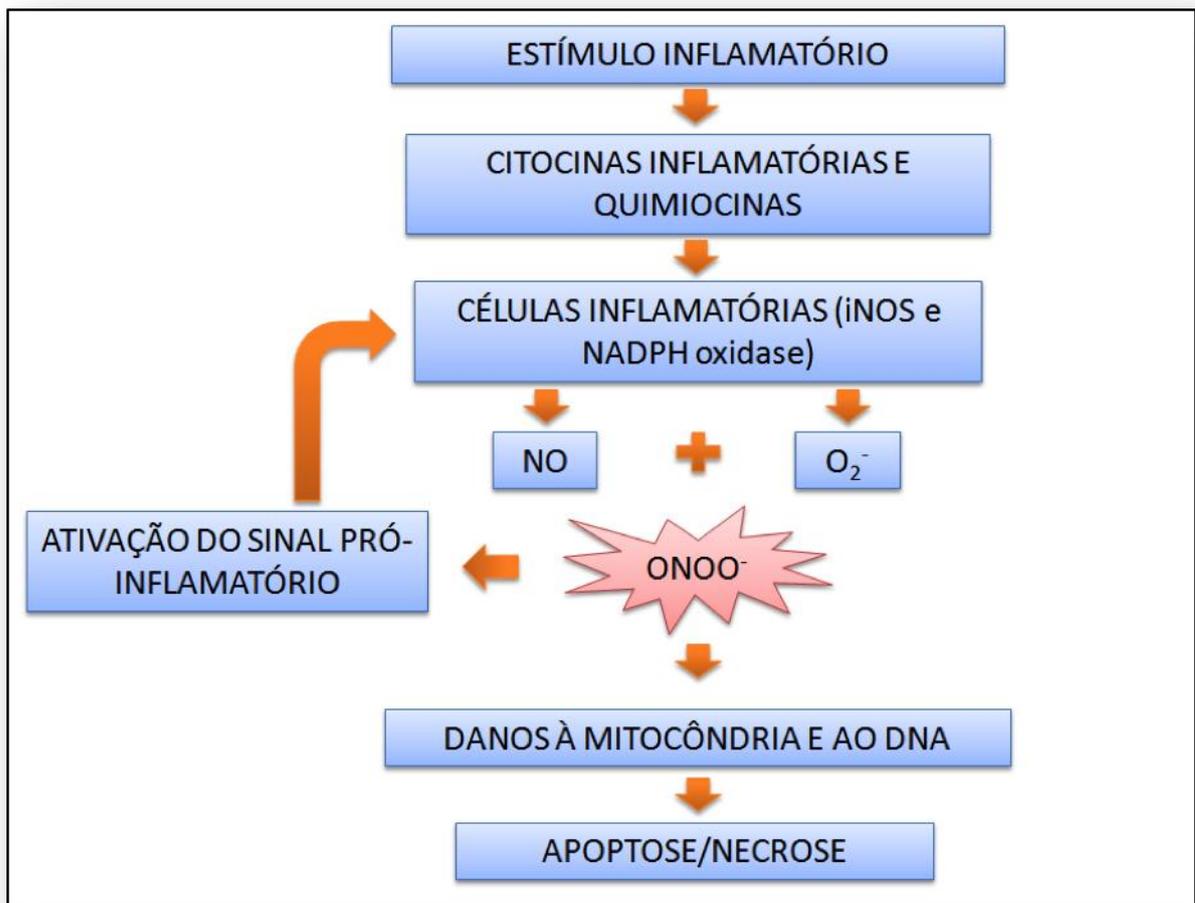
Estudos têm mostrado a participação das plaquetas na resposta imune. Já foi observado que as plaquetas expressam TLR-4 e são recrutadas para os sítios inflamatórios, podendo, ainda, interagir sinergicamente com os neutrófilos e estimular a produção de ROS nesses fagócitos (Andonegui et al., 2005; Clark et al., 2007; Semple & Freedman, 2010). Sabe-se que presença de lipopolissacarídeo (LPS) na corrente sanguínea leva à diminuição do número de plaquetas circulantes (Zhang et al., 2009), porém os mecanismos que causam a trombocitopenia na leptospirose ainda são pouco compreendidos (Nicodemo et al., 1997).

#### **1.5. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio**

Os fagócitos profissionais, como monócitos, macrófagos e neutrófilos, quando ativados, utilizam Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ROS/RNS) para eliminar os micro-organismos invasores. Superóxido ( $O_2^-$ ) e Óxido Nítrico (NO) são as principais substâncias microbicidas utilizadas pelas células do sistema imune inato e são produzidas pelas enzimas Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase (NADPH oxidase) e

Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS), respectivamente (Babior, 1999; Knowles & Moncada, 1994). Já foi demonstrado que proteínas da membrana externa de leptospiros estimulam a produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , da proteína quimioatratora de monócito (MCP-1) e a expressão de iNOS em células tubulares renais de camundongos através da ativação do fator de transcrição NF-kB (Yang et al., 2006a; Yang et al., 2000; Yang et al., 2002). Outro estudo evidenciou que as proteínas da membrana externa de *Leptospiras* patogênicas induziram o recrutamento do NF-kB para o núcleo e o subsequente aumento da transcrição dos genes de iNOS, TNF- $\alpha$  e MCP-1. O mesmo não ocorreu com proteínas de leptospiros não patogênicas (Yang et al., 2000). A nefrite intersticial aguda causada pela leptospira é caracterizada pelo infiltrado de células inflamatória nos rins, dentre elas, os monócitos. A alta expressão de iNOS pelas células tubulares renais e pelos monócitos gera uma alta produção de óxido nítrico. O NO é importante para a oxigenação renal, pois ajuda a prevenir lesão por hipóxia, porém altas quantidades dessa substância podem ser altamente agressivas às células, uma vez que ela reage com o  $O_2^-$  para formar peroxinitrito (ONOO $^-$ ) (Cerqueira, Athanazio, Spichler, & Seguro, 2008; Halliwell, 2006). O peroxinitrito é um poderoso oxidante que pode causar danos a diversas biomoléculas e organelas, como proteínas, glutathiona (GSH), mitocôndrias e DNA (Halliwell & Whiteman, 2004).

O superóxido, em condições normais, é prontamente dismutado pela enzima superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A SOD, normalmente, é encontrada em concentrações micromolares no plasma e é caracterizada por ser o maior captador de  $O_2^-$  no organismo. O NO, por sua vez, está presente no endotélio em concentrações que variam entre 5 e 10 nanomoles, não competindo efetivamente pela molécula de  $O_2^-$ . Porém, quando a concentração de NO chega ao nível de micromoles, essa molécula compete diretamente pelo  $O_2^-$ , chegando a reagir quase seis vezes mais rápido do que a SOD, em condições fisiológicas (Beckman & Koppenol, 1996; Pacher, Beckman, & Liaudet, 2007). O NO é a única molécula conhecida que, em condições patológicas, é produzida em níveis suficientemente elevados a ponto de competir diretamente com a SOD pelo  $O_2^-$  (Beckman & Koppenol, 1996). Os mecanismos de lesão associados à produção de NO devem-se majoritariamente à produção de ONOO $^-$  (Beckman & Koppenol, 1996). O papel do NO na inflamação está bem descrito (Pacher et al., 2007).



**Figura 1: Formação de peroxinitrito na inflamação.**

*O mecanismo é iniciado por um estímulo (LPS, GLP etc.) e culmina no aumento de produção de citocinas e quimiocinas. Em seguida, células inflamatórias e enzimas como iNOS, NADPH oxidase e xantina oxidase (XO) são ativadas, resultando na liberação de grandes quantidades de NO e O<sub>2</sub><sup>-</sup>. O óxido nítrico prontamente reage com o superóxido e forma peroxinitrito. Danos à mitocôndria e ao DNA levam a célula a entrar em apoptose e/ou necrose. O próprio ONOO<sup>-</sup> ainda participa nas vias de regulação do sinal pro-inflamatório, fazendo com que ocorra a amplificação desse sinal.*

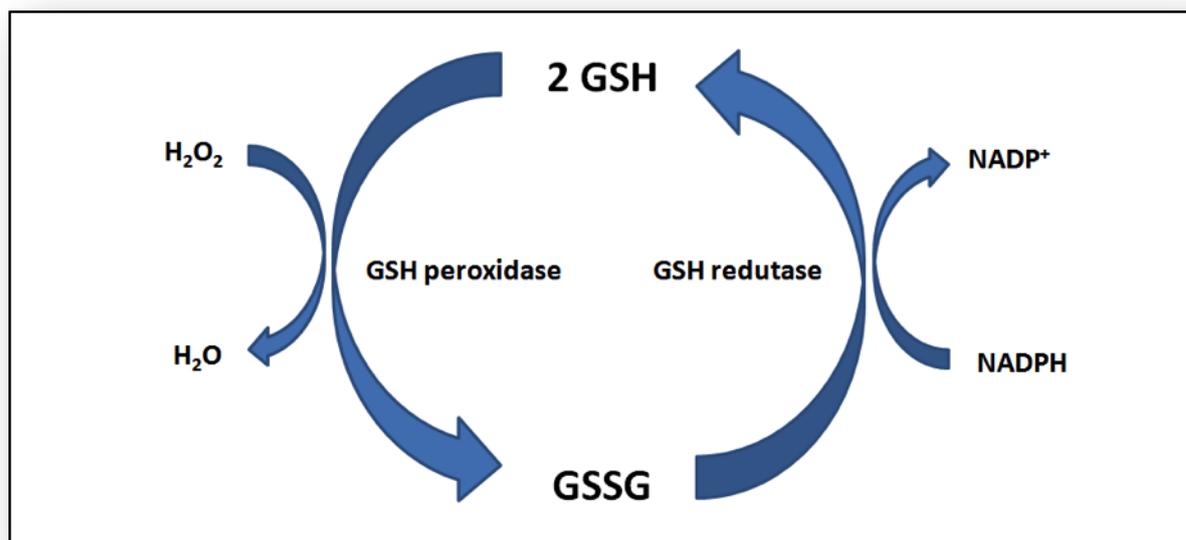
Camundongos knock out para iNOS foram infectados com *L.interrogans* sorovar copenhageni e observou-se que os animais tiveram uma redução significativa no desenvolvimento da nefrite intersticial aguda, quando comparado com tipos selvagens (Bandeira et al., 2011).

A produção de NO no plasma de pacientes com leptospirose grave foi estudada pelo nosso grupo, que observou a elevação significativa dessa substância, chegando a atingir níveis cinco vezes mais elevados em pessoas infectadas quando comparado com indivíduos saudáveis (Maciel et al., 2006). Ainda nesse estudo, observou-se uma correlação positiva entre os níveis de NO e creatinina sérica, sugerindo envolvimento do óxido nítrico na

imunopatogênese da insuficiência renal. Outros estudos também encontraram níveis significativamente mais elevados de NO (Kalugalage et al., 2013) e de nitrito (um dos subprodutos do óxido nítrico) (Gunaratna et al., 2012) no soro de pacientes com leptospirose. Kalugalage e colaboradores corrigiram os valores de NO em função dos valores de creatinina e sugeriram que a utilização desse método poderia servir como biomarcador de gravidade da doença (Kalugalage et al., 2013). Marangoni e colaboradores demonstraram que células de Kupffer produzem ROS quando incubadas com leptospiras, mesmo quando as bactérias não são previamente opsonizadas. Mesmo após a opsonização, não houve aumento na produção de ROS. Além disso, Através da técnica de Western blotting observou-se a expressão da iNOS, que foi detectada duas horas após a incubação com as leptospiras, atingindo seu pico em após 6 horas e permanecendo evidente até 22 horas após a incubação (Marangoni et al., 2006).

### **1.6. Glutathiona**

Para impedir a ação das diversas Espécies Reativas (RS), o organismo dispõe de uma variedade de antioxidantes. A glutathiona (GSH) é o antioxidante mais abundante nas células animais (Wu, Fang, Yang, Lupton, & Turner, 2004). É um tripeptídeo formado por glicina, cisteína e ácido glutâmico e está presente em todos os tecidos do organismo. O GSH possui um grupamento sulfidril que funciona como um doador de elétrons que permite que radicais livres e ROS/RNS sejam neutralizados. Uma vez oxidada, a glutathiona (GSSG) é reciclada na presença da enzima Glutathiona Redutase e do NADPH e volta a seu estado reduzido. Quando a quantidade de oxidações supera a velocidade de reciclagem da enzima Glutathiona redutase, a célula passa a transportar o GSSG para fora, uma vez que ela não tolera o acúmulo dessa substância. Dessa maneira, um ambiente altamente oxidante pode agir como um depletor de GSH, diminuindo a quantidade de GSH na célula e aumentando a quantidade de GSSG no plasma (Griffith, 1999).

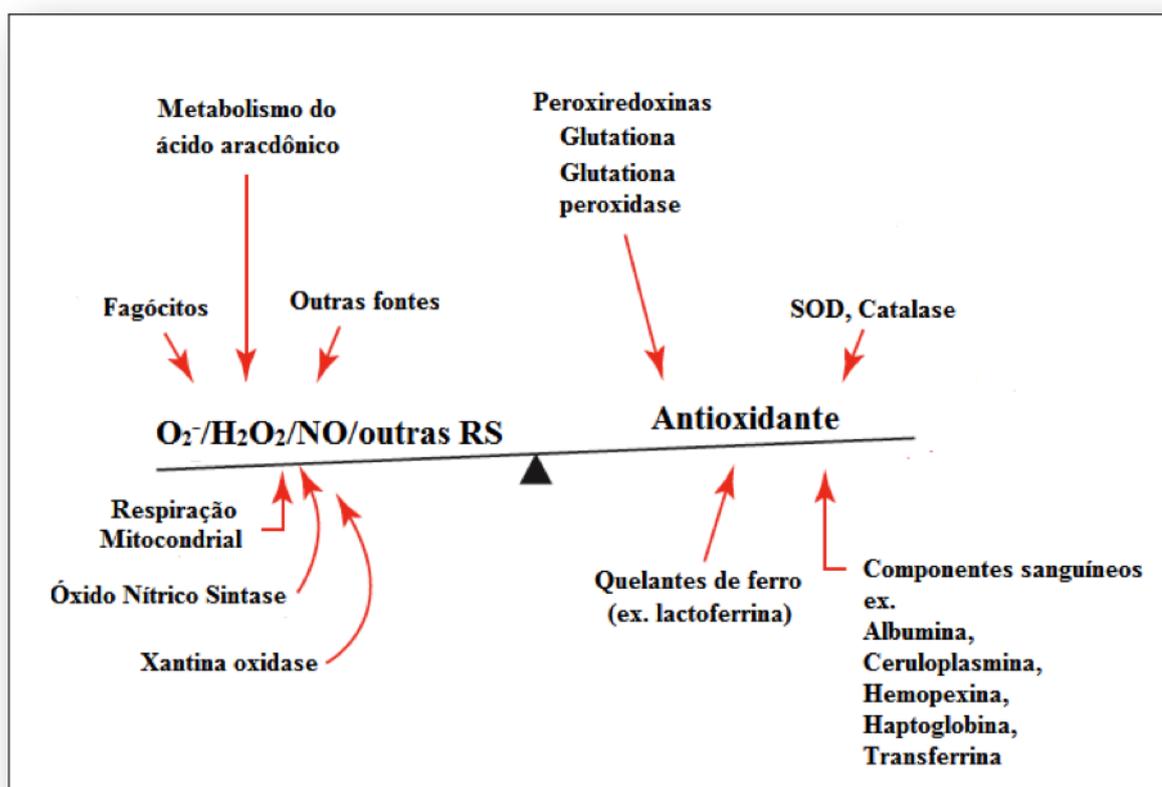


**Figura 2: Oxidação e reciclagem do GSH.**

Após ser oxidado diretamente por uma RS ou enzimaticamente através da enzima GSH peroxidase, o GSH é reciclado pela Glutathione Redutase na presença do doador de elétrons NADPH.

### 1.7. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado pela perda do equilíbrio redox da célula, onde a quantidade de oxidantes supera a capacidade antioxidante (Jones, 2008). Como consequência, moléculas importantes como lipídios de membrana, enzimas e DNA sofrem oxidações, alteram as suas estruturas e perdem a funcionalidade. O dano causado pelas ROS às biomoléculas é o que caracteriza o *dano oxidativo* (Halliwell & Whiteman, 2004). Já se sabe que o estresse oxidativo e o dano oxidativo estão envolvidos na imunopatogênese de doenças como câncer, doenças inflamatórias do intestino (doença de Crohn, colite ulcerosa), Alzheimer, sepse, artrite reumatoide, aterosclerose, dentre outras (Halliwell, 2012; Pacher et al., 2007). Em algumas delas, as RS são a causa, em outras são consequências que acabam agravando o quadro clínico.



**Figura 3: Fontes de oxidantes e antioxidantes no corpo humano.**

Imagem adaptada de (Halliwell, 2011), mostrando a relação entre oxidantes e antioxidantes no organismo.

Alguns trabalhos utilizam Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) como parâmetro para avaliar os níveis e peroxidação lipídica em cultura de células ou no soro de animais. Já foi mostrado que animais infectados com *Leptospira interrogans* possuem altos níveis de TBARS. Hamsters tratados com N-acetilcisteína (NAC) (um tipo de antioxidante) mostraram uma diminuição significativa nos níveis de TBARS (Spichler et al., 2007); Ratos Wistar infectados com leptospiras de diferentes sorogrupos foram avaliados quanto aos níveis de TBARS e das enzimas antioxidantes SOD e catalase, nos diferentes órgãos do corpo. O nível das variáveis estudadas oscilou bastante entre os diferentes órgãos e grupos, no entanto 100% dos animais apresentaram níveis significativamente maiores de peroxidação lipídica nas células epiteliais do túbulo renal, quando comparados com o grupo controle (Tonin et al., 2011); Um estudo com gados infectados mostrou o aumento dos níveis de NO e Malondialdeído (outro subproduto de peroxidação lipídica). Ainda nesse estudo, foram detectados níveis significativamente mais baixos de glutathione (GSH) nos eritrócitos dos

animais, fato que sugere a presença de estresse oxidativo na leptospirose, pois a depleção de GSH pode estar diretamente relacionada com o aumento substâncias oxidantes no sangue (Erdogan et al., 2008). Um recente estudo avaliou o efeito do dano oxidativo por ação do  $H_2O_2$  sobre a viabilidade de leptospiras e foi observado que a espécie de leptospira patogênica que expressa a catalase KatE é resistente ao dano oxidativo. Além disso, hamsters infectados com a cepa mutante inativada para KatE desenvolveram uma infecção leve, evidenciando que KatE é um fator de virulência extremamente necessário para que essas bactérias consigam estabelecer infecção (Eshghi et al., 2012).

### **1.8. Morfologia dos eritrócitos**

O eritrócito é constantemente submetido à oxidação, devido a seu papel biológico de transporte de oxigênio, mas a sua capacidade antioxidante supera em 250 vezes a capacidade oxidante do meio em que se encontra (Cimen, 2008). Ainda assim, estas células podem sofrer danos em sua membrana plasmática nas situações em que estresse oxidativo está presente, como ocorre em algumas patologias. Como consequência, o eritrócito sofre diversas alterações por conta das inúmeras peroxidações lipídicas, como influxo de cálcio, ativação dos canais de potássio e cloro, encolhimento celular, alterações de morfologia, depleção de GSH e exposição da fosfatidilserina para o folheto externo da membrana (Föller, Huber, & Lang, 2008; Lang et al., 2008). Já foi mostrado que, nas situações em que a hemácia não consegue reciclar o GSH de forma eficiente a ponto de conter a oxidação, ela passa a sofrer alterações em sua morfologia devido às peroxidações lipídicas (Masaaki, Masatoshi, Koichi, & Keisuke, 1994). A diminuição de GSH em eritrócitos já foi observado em sepse (Nemeth & Boda, 2001), câncer, doenças neurodegenerativas, insuficiência renal crônica, dentre outras (Alhamdani, 2005; Ceballos-Picot et al., 1996; Durak, Akyol, Basesme, Canbolat, & Kavutcu, 1994).

## **2. HIPÓTESE**

O desequilíbrio redox está relacionado com as alterações patofisiológicas observadas na leptospirose grave.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. GERAL**

Estudar o estresse oxidativo na leptospirose grave.

### **3.2. ESPECÍFICOS**

1. Avaliar a produção de ROS no sangue periférico de pacientes com leptospirose grave
2. Quantificar os níveis de GSH nos eritrócitos dos pacientes com leptospirose grave.
3. Correlacionar os níveis de ROS e GSH com os parâmetros bioquímicos (creatinina, potássio sérico, ureia TGO e TGP) dos pacientes.
4. Correlacionar os níveis de ROS e GSH com a quantidade de plaquetas dos pacientes.

#### 4. JUSTIFICATIVA

Para entender quais fatores levam ao aparecimento da forma mais grave da leptospirose, os pesquisadores vêm trabalhando em três frentes distintas: estudos sobre o genoma das leptospirosas, a fim de identificar genes que possam estar relacionados com o desenvolvimento da Síndrome de Weil nos pacientes; ecologia e meio ambiente, visando entender as vias de penetração no indivíduo e a relação entre o inóculo e a gravidade da doença; e resposta imune do hospedeiro, buscando entender a interação das células de defesa com a bactéria. O presente estudo foca nesse terceiro ponto. Leptospirose e sepse se assemelham em diversos aspectos, pois ambas as doenças são caracterizadas pela disseminação de bactérias através da corrente sanguínea até os órgãos, além de sinais clínicos como trombocitopenia, anemia, hemorragias e icterícia. Existe uma vasta literatura descrevendo o papel do estresse oxidativo na sepse e sua importância biológica na imunopatogênese da doença (Halliwell, 2012; Pacher et al., 2007), contudo, pouco se sabe sobre o envolvimento das ROS na leptospirose. Desse modo, faz-se necessário a elaboração de estudos nessa área a fim de elucidar qual a real participação desses compostos na patogênese da doença, uma vez que uma maior compreensão dos mecanismos patogênicos proporcionará a utilização de novas estratégias terapêuticas.

## **5. METODOLOGIA**

Através de um estudo de vigilância foram coletadas trinta amostras de sangue em tubos EDTA de pacientes com suspeita clínica de leptospirose nos períodos compreendidos entre Maio de 2011 e Janeiro de 2013. Todas as coletas foram realizadas no Hospital Couto Maia (HCM).

### **5.1. PACIENTES**

Os pacientes diagnosticados com leptospirose foram estratificados em dois grupos, baseado em parâmetros laboratoriais e clínicos: Pacientes sem insuficiência renal (Non-ARF), caracterizados por níveis normais de creatinina sérica e pacientes com Insuficiência Renal (ARF) caracterizados pela presença de oligúria e níveis elevados de creatinina sérica (acima de 1.5 mg/dL).

### **5.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Pacientes diagnosticados com leptospirose através dos exames de microaglutinação (MAT), Ensaio por Imunoabsorbância Ligado à Enzima (ELISA) (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil), ou por hemocultura.

### **5.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Pacientes com o diagnóstico negativo para leptospirose.

### **5.4. COMITÊ DE ÉTICA**

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-BA), Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), Comitês de Ética do Hospital Couto Maia e Universidade de Yale. A utilização das amostras foram autorizadas pelos próprios pacientes ou pelo responsável legal através da assinatura do “Termo de consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE).

### **5.5. DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE**

O critério de confirmação da MAT é através da soroconversão, um aumento de quatro vezes ou mais nos títulos entre duas amostras coletadas com um intervalo de 14 - 30 dias ou um título  $\geq 1:800$  (Ko, Galvao Reis, Ribeiro Dourado, Johnson, & Riley, 1999). O painel da MAT inclui 10 sorogrupos de referência e um isolado local (*Leptospira interrogans* serovar

Copenhageni strain Fiocruz L1-130). Esse painel identifica as cepas mais frequentes, das quais 90% são *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Ko *et al.*, 1999).

## **5.6. EXAMES LABORATORIAIS**

Todos os exames laboratoriais foram realizados no Hospital Couto Maia. As análises bioquímicas (alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia, creatinina, potássio e hemograma) foram realizados nos equipamentos Siemens Dimension RL, Prodimol SelectION Plus e os hemogramas no equipamento ABX PENTRA 80, de acordo com as instruções dos fabricantes.

## **5.7. REVISÃO DE PRONTUÁRIOS**

Os dados clínicos relacionados à apresentação e ao desfecho da doença foram coletados através da revisão de prontuário dos pacientes e posteriormente inseridos no software EpiInfo.

## **5.8. AMOSTRAS DE SANGUE**

As amostras de sangue (2ml) dos pacientes foram coletadas em tubos vacutainer EDTA (Becton Dickinson Vacutainer system San Jose, CA, USA) e transportadas do Hospital Couto Maia para o LPBM em caixas térmicas refrigeradas com ice packs e conservadas por 1 hora e 30 minutos antes do início dos experimentos. As amostras dos indivíduos saudáveis foram coletadas no próprio LPBM e foram mantidas em ice packs pelo mesmo período de tempo antes do início dos experimentos.

## **5.9. QUANTIFICAÇÃO DE ROS EM SANGUE TOTAL**

Cinquenta microlitros de sangue total foi adicionado a placas de Petri de 35X10mm e diluído em 0,5ml de solução salina balanceada de Hank (HBSS) (Gibco Invitrogen Auckland NZ) contendo 6mmol de KCl e 6mm de MgCl<sub>2</sub>. Em seguida, a placa contendo a amostras foi incubada dentro do luminômetro, a 37° C, ao passo que a leitura basal de fótons foi iniciada. Após 200 segundos de leitura inicial, 55µl de L-012 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) foi adicionado à placa, dando-se a continuação da leitura por mais 17 minutos, ou até a amostra atingir um platô de fótons emitidos e começar a decrescer. A produção de ROS no sangue total foi avaliada através de quimioluminescência. Para tal, utilizamos a substância L-012, que é um emissor secundário de elétrons derivado do luminol e que reage com diversas espécies reativas de oxigênio como superóxido, peroxinitrito, ácido hipocloroso e radical

hidroxila (Imada et al., 1999). Para detecção da luz emitida, foi utilizado um contador de fótons de alta sensibilidade, dotado de um tubo fotomultiplicador constituído de uma superfície de gálio, e que obtém uma resposta acima de 10% da eficiência quântica nos comprimentos de onda 200-900nm (Noronha-Dutra, Epperlein, & Woolf, 1993).

### **5.10. QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA (GSH)**

A glutationa total foi medida nos eritrócitos através do Glutathione Assay Kit (Sigma, CS0260). O kit se baseia numa reação cinética na qual o GSH causa uma redução contínua do Ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico (DTNB), formando um composto de cor amarela, o TNB, e glutationa na forma oxidada, o GSSG. O GSSG é reciclado na presença da enzima Glutathione Redutase e do doador de elétrons NADPH, volta para a sua forma reduzida (GSH) e reinicia o ciclo. Dessa maneira, a quantidade de GSH na amostra é diretamente proporcional à intensidade da cor amarela, que é medida no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 412nm. Todos os passos abaixo foram feitos de acordo com o protocolo do kit.

Inicialmente, o sangue foi transferido para tubos de 1,5ml e centrifugado a 600 x g por 10 minutos a fim de separar os eritrócitos do plasma. Em seguida, 50µl de eritrócitos foi estocado a -70° C até o dia do experimento.

No dia determinado, 50ul de hemácias foram desproteinizadas com 50µl de solução de ácido sulfosalicílico a 5% (dissolvido em água ultra pura), agitadas vigorosamente por 1 minuto e armazenadas em 2-8° C por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos em temperatura ambiente, a fim de separar o sobrenadante do precipitado. Após a centrifugação, 10ul do sobrenadante foi pipetado e diluído 10 vezes para que os valores de GSH se mantivessem dentro da curva de detecção, uma vez que o maior ponto da curva tem a concentração de 50µM e o menor ponto 3.125µM. A curva foi feita em diluição seriada, diluindo-se concentrações conhecidas de GSH em Ácido sulfosalicílico a 5%. Em seguida, as amostras (já desproteinizadas) foram transferidas para a placa de 96 poços, pipetando-se o volume de 10ul por poço e fazendo cada amostra em triplicata.

Diversas soluções foram preparadas para a dosagem de GSH total. Todas as substâncias citadas abaixo foram dissolvidas em água ultrapura, exceto o DTNB que foi dissolvido em DMSO (472301, Sigma-Aldrich). As soluções estoque foram diluídas em tampão fosfato de potássio (100mM, pH 7.0) contendo EDTA (1mM) e DTNB. O DTNB foi preparado na concentração de trabalho ideal para o experimento.

Inicialmente, uma solução foi preparada misturando-se as seguintes substâncias: 8 ml de tampão fosfato de potássio (100mM, pH 7.0) contendo EDTA (1mM), 228 $\mu$ l da enzima glutationa redutase (6 unidades/ml) e 228 $\mu$ l de DTNB (1,5 mg/ml). Em seguida, 150 $\mu$ l da solução foram adicionados com uma pipeta multicanal em cada poço (já contendo 10 $\mu$ l das amostras desproteinizadas) e, imediatamente, incubou-se a placa por 5 min em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Por fim, com uma pipeta multicanal, adicionou-se 50 $\mu$ l de NADPH (40 mg/ml) em cada poço e imediatamente iniciou-se a leitura da placa no espectrofotômetro.

A glutationa total das amostras foi medida por leitura cinética durante 5 min, com intervalos de 1 min, em um comprimento de onda de 412nm. O espectrofotômetro utilizado foi o Spectramax M5 (Molecular Devices Corporation, CA).

### **5.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As análises estatísticas foram feitas no software GraphPad 6 (Graph Pad, CA, USA). A distribuição de dados mostrou-se não Gaussiana. As comparações feitas entre dois grupos experimentais foram feitas pelo teste de Mann-Whitney. As análises de correlação foram feitas pelo teste de Spearman. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p \leq 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### MANUSCRITO

Alan M. Araújo, Eliana A. G. Reis, Daniel A. Athanazio, Guilherme S. Ribeiro, José e. Hagan, Guilherme C. Araujo, Alcineia O. Damião, Nicolli S. Couto, Albert I. Ko, alberto Noronha-Dutra, Mitermayer G. Reis. *Oxidative Stress Markers Correlate With Renal Dysfunction And Thrombocytopenia In Severe Leptospirosis*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 90(4), 2014, pp. 719-723 doi:10.4269/ajtmh.13-0667.

Neste trabalho, avaliou-se a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e os níveis de Glutationa (GSH) no sangue total e nas hemácias, respectivamente, de doze pacientes com leptospirose grave. Os níveis de ROS e GSH dos pacientes foram comparados com os níveis encontrados em indivíduos saudáveis. Ainda, foram feitas análises de correlação com algumas alterações bioquímicas e hematológicas características da doença.

#### **Conclusão do manuscrito:**

Em conclusão, nós mostramos que o estresse oxidativo está presente na leptospirose grave e pode ter um papel fundamental no agravamento da doença, porém mais estudos são necessários para que se possa determinar com precisão qual a relação entre a produção excessiva de ROS e as alterações fisiológicas características da leptospirose, como a trombocitopenia e a insuficiência renal.

## Oxidative Stress Markers Correlate with Renal Dysfunction and Thrombocytopenia in Severe Leptospirosis

Alan M. Araújo,† Eliana A. G. Reis,† Daniel A. Athanazio, Guilherme S. Ribeiro, José E. Hagan, Guilherme C. Araujo, Alcinea O. Damião, Nicoli S. Couto, Albert I. Ko, Alberto Noronha-Dutra, and Mitermayer G. Reis\*

Laboratory of Pathology and Molecular Biology, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil; Faculty of Medicine, Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil; Institute of Collective Health, Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil; Department of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale School of Public Health New Haven, Connecticut

**Abstract.** Leptospirosis is a zoonotic disease that causes severe manifestations such as Weil's disease and pulmonary hemorrhage syndrome. The aim of this study was to evaluate whether reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant reduced glutathione (GSH) levels are related to complications in patients hospitalized with leptospirosis. The ROS production and GSH levels were measured in blood samples of 12 patients and nine healthy controls using chemiluminescence and absorbance assays. We found that ROS production was higher and GSH levels were lower in leptospirosis patients compared with healthy individuals. Among patients, GSH depletion was correlated with thrombocytopenia and elevated serum creatinine, whereas a strong positive correlation was observed between ROS production and elevated serum potassium. Additional investigation of the biological significance of ROS production and GSH levels is warranted as they may guide the development of novel adjuvant therapies for leptospirosis targeting oxidative stress.

### INTRODUCTION

Leptospirosis is a widespread zoonosis caused by pathogenic leptospires. The disease occurs in different settings including rural and/or occupational settings, large urban areas with poor sanitation, and recreational exposure.<sup>1</sup> Human infections are mostly asymptomatic or manifest as a mild febrile illness that is clinically indistinguishable from disease caused by other infectious agents. On the other hand, 5–10% of human infections will evolve to severe forms, such as Weil's disease, characterized by acute renal failure (ARF), hemorrhage, and jaundice with 5–30% related case fatality, and severe pulmonary hemorrhagic syndrome, with ≥ 50% related case fatality.<sup>2–5</sup>

Additional tools for the treatment of severe forms are urgently needed because a major issue in the management of patients is the limited effect of antibiotics when initiated late in the course of the disease.<sup>4</sup> The pathophysiology of the serious life-threatening complications of leptospirosis, such as ARF, thrombocytopenia, and pulmonary hemorrhages, are poorly understood.<sup>6,7</sup> The comprehension of underlying disease mechanisms is a critical step for the development of adjuvant and supportive therapies that may improve leptospirosis outcomes.

The association between markers of oxidative stress and target organ dysfunction in clinical leptospirosis has not been investigated. It is well established that *Leptospira* membrane components may enhance expression of pro-inflammatory markers from renal tubular cells *in vitro*, including inducible nitric oxide synthase.<sup>8–10</sup> We have previously reported a positive correlation between serum levels of nitric oxide and serum creatinine levels in patients with severe leptospirosis.<sup>11</sup> Only a single study has previously investigated the effect of *N*-acetylcysteine (NAC) as an adjuvant antioxidant therapy, using a hamster model treated with antibiotics (ampicillin) late in the course of infection. The study found that the adjuvant antioxidant therapy did not reduce the level of leptospiral

antigens or increase the expression of renal tubule transporters in the experimental model.<sup>12</sup> In other infectious diseases, and notably in sepsis, reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant depletion are associated with tissue damage and disease severity.<sup>13–18</sup> Severe leptospirosis has clinical features similar to sepsis syndromes from other Gram-negative organisms, such as a systemic inflammatory response<sup>7,19</sup> and hemodynamic changes (combined high cardiac index/low systemic vascular resistance).<sup>20</sup> In this study, we evaluated whether ROS production and antioxidant depletion are related to clinical complications in severe leptospirosis.

### MATERIALS AND METHODS

**Patients.** Between May 11 and May 31, 2011, we performed active hospital-based surveillance for severe leptospirosis in the state reference hospital for infectious diseases in Salvador, Brazil. A total of 18 patients met clinical criteria for suspected leptospirosis, and 12 patients with laboratory-confirmed leptospirosis were included in this study. Clinical data related to disease presentation and clinical outcome were extracted by review of patient records using a standardized questionnaire and entered into a database. The primary outcome of interest was ARF on admission, defined as serum creatinine concentration above 1.5 mg/dL. Subjects were grouped based on clinical status: subjects who developed ARF ( $N = 7$ ), and those who did not ( $N = 5$ ). Blood samples were collected in 2 mL Vacutainer tubes with EDTA (Becton Dickinson Vacutainer System San Jose, CA) at hospital admission for ROS and glutathione (GSH) analysis and 14–30 days later for laboratory confirmation of leptospirosis. An additional tube of 8 mL without anticoagulant was collected for biochemical analysis (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, urea, and creatinine) at hospital admission. Healthy, leptospirosis-negative individuals ( $N = 9$ ) from our laboratory were included as control subjects.

**Ethical approval.** The study was approved by the Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil; the Ethics Committee of the Brazilian National Research (CONEP) and the ethics review committees at

\* Address correspondence to Mitermayer Galvão Reis, Oswaldo Cruz Foundation, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal – Salvador/BA CEP: 40296-710. E-mail: miter@bahia.fiocruz.br

† These authors contributed equally to this work.

Hospital Couto Maia and Yale University. Written informed consent was obtained from all participants.

**Laboratory diagnosis.** Laboratory confirmation of leptospirosis was made by the microscopic agglutination test (MAT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Molecular Devices Corporation, CA) (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil), or blood culture. The MAT confirmation criteria included seroconversion or a 4-fold rise in titer between acute and convalescent sera obtained on the day of hospital admission and after 14–30 days of convalescence, or a single titer of  $\geq 1:800$ .<sup>21</sup> The MAT panel included 10 reference strains and a local isolate.

*Leptospira interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130, representing nine serovars and nine serogroups. This panel effectively identifies most locally circulating *Leptospira*, 90% of which are *L. interrogans* serovar Copenhageni.<sup>21</sup>

**Assay for ROS detection in peripheral blood samples.** Reactive oxygen species were evaluated in venous blood from severe leptospirosis patients and normal healthy individuals within 60 minutes after sample collection. The ROS were determined as described previously.<sup>22</sup> Briefly, the blood samples (50  $\mu$ L) were incubated in 0.5 mL  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -free Hank's balanced salt solution (HBSS) (Invitrogen, Auckland, NZ) containing 6 mmol/L KCl, and 6 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  in the presence of 90  $\mu$ mol/L L-012 (Sigma, St. Louis, MO). After incubation for 3 min at 37°C, chemiluminescence intensity was recorded continuously for 20 min using the Photon Counter<sup>23</sup>; the ROS production was evaluated by the maximal chemiluminescence intensity.

**Determination of total glutathione.** Total glutathione (GSH + glutathione disulfide) levels were measured in red blood cells (RBCs) using the Glutathione Assay kit (Sigma CS0260) and following the manufacturer's instructions. Peripheral blood samples were collected in EDTA tubes, aliquots of 50  $\mu$ L of erythrocytes were washed in HBSS, and the samples were centrifuged at 600  $\times$  g for 1 min (4°C), and then

stored at  $-70^\circ\text{C}$  until use. To perform the assay, erythrocytes were deproteinated in 5% 5-sulfosalicylic acid, and centrifuged at 10,000  $\times$  g for 10 min at 25°C. The supernatant was collected and used for spectrophotometric analysis at 412 nm in a UV Sofmax automated plate reader. Each assay was performed in triplicate. The GSH levels were normalized as a ratio of total GSH per 1,000,000 RBCs.

**Statistical analysis.** Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) and Epi Info 3.5.4 software (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). Clinical characteristics between patients with and without ARF were compared using Fisher's exact test or Mann-Whitney/Wilcoxon test for qualitative and quantitative data, respectively. As the ROS and GSH data were not normally distributed, they were plotted using box and whiskers plots, and statistical differences between groups were determined using Mann-Whitney-Wilcoxon test. Correlation analysis was performed using Spearman's test. Differences were considered significant at  $P \leq 0.05$ .

## RESULTS

**Patient characteristics.** The age range and sex distribution for patients with ARF, patients without ARF, and for the control group were 24–51 years (100% male), 17–61 years (80% male), and 21–39 years, (56% male), respectively (Table 1). Clinical characteristics of inpatients with and without ARF were similar, with the exception of elevated serum creatinine and urea in patients with ARF ( $P < 0.05$ ). (Table 1). The median days of symptoms at hospital admission was 6 (range: 5–10) days for patients with ARF compared with 4 (range: 1–15) days for patients without ARF. All patients survived. Patients with ARF had a higher frequency of oliguria (43% versus 20%), lower hematocrits (median of 27.9% versus 37.4%), and fewer platelets (median of 53,000/ $\mu$ L versus 142,000) at initial presentation, when compared with

TABLE 1  
Characteristics of studied patients\*

Characteristics	Total patients (N = 12)	Patients with ARF (N = 07)	Patients without acute ARF (N = 05)
<b>Demographics</b>			
Age	40.5 (17.0–61.0)	38.0 (24.0–51.0)	43.0 (17.0–61.0)
Male gender	11 (91.7)	7 (100.0)	4 (80.0)
<b>Clinical presentation</b>			
Days of symptoms before presentation	5.5 (1.0–15.0)	6.0 (5.0–10.0)	4.0 (1.0–15.0)
Jaundice	11 (91.7)	7 (100.0)	4 (80.0)
Oliguria	4 (33.3)	3 (42.9)	1 (20.0)
Serum creatinine (mg/dL)*†	1.6 (0.5–6.2)	2.1 (1.6–6.2)	1.0 (0.5–1.4)
Urea (mg/dL)*†	57.0 (30.0–290.0)	76.0 (57.0–290.0)	34.0 (30.0–53.0)
Potassium (mEq/L)	3.6 (2.8–4.9)	3.2 (2.8–4.9)	3.9 (3.2–4.8)
AST (U/L)	122.5 (30.0–567.0)	167.0 (50.0–567.0)	100.0 (30.0–201.0)
ALT (U/L)	69.0 (31.0–238.0)	73.0 (31.0–238.0)	65.0 (45.0–101.0)
Total WBC ( $\times 1,000/\mu\text{L}$ )	13.3 (7.3–21.2)	16.0 (7.3–21.2)	10.9 (8.1–19.0)
Hematocrit	37.3 (22.5–46.7)	27.9 (22.5–46.7)	37.4 (34.7–42.6)
Hemoglobin	11.7 (7.0–14.8)	10.7 (7.0–14.8)	11.8 (11.2–13.9)
Platelets ( $\times 1,000$ )	89.5 (10.0–549.0)	53.0 (10.0–297.0)	142.0 (32.0–549.0)
<b>Clinical course and outcomes</b>			
Treatment with antibiotics before admission	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Hemodialysis	3 (25.0)	3 (42.9)	0 (0.0)
Intensive care unit admission	2 (16.7)	1 (14.4)	1 (20.0)
Severe pulmonary hemorrhage syndrome	4 (33.3)	3 (42.9)	1 (20.0)

\* N = number.

† P-value (Mann-Whitney/Wilcoxon Test) for the comparison between patients with and without acute renal failure (ARF) was 0.004.

ARF = acute renal failure; AST = aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase; WBC = white blood cell.

hospitalized patients without ARF. In addition, patients with ARF had a higher frequency of severe pulmonary hemorrhage syndrome (42.9% versus 20%) and more frequently needed hemodialysis (42.9% versus 0%), when compared with hospitalized patients without ARF.

**High production of ROS and low level of GSH in severe leptospirosis patients.** The ROS production was significantly higher ( $P = 0.0003$ ) and GSH levels were significantly lower ( $P = 0.0002$ ) in leptospirosis patients compared with healthy subjects (Figure 1A and B). Subgroup analysis showed that severe leptospirosis patients with and without ARF had ROS production significantly higher than healthy subjects ( $P = 0.0012$  and  $P = 0.0043$ , respectively) (Figure 1C). However, no significant difference was observed in the production of ROS between patients with and without ARF (Figure 1C).

In contrast, GSH levels were significantly lower in severe leptospirosis patients with and without ARF ( $P = 0.0290$  and  $P = 0.0002$ , respectively) compared with healthy subjects (Figure 1D). No significant differences were observed in the levels of GSH among severe leptospirosis patients with and without ARF (Figure 1D).

### GSH levels from patients with severe leptospirosis correlate with renal dysfunction status.

An additional analysis was performed to determine the correlation between oxidative stress and the following parameters: serum urea, creatinine, alanine transaminase, aspartate transaminase, serum potassium, and platelet count. We found a strong positive correlation between ROS production and serum potassium ( $r = 0.7975$ ;  $P = 0.0027$ ) (Figure 2A). In addition, GSH levels positively correlated with platelet count ( $r = 0.6294$ ;  $P = 0.0323$ ) (Figure 2B). Finally, a moderate negative correlation between serum creatinine and GSH levels ( $r = -0.6070$ ;  $P = 0.0385$ ) was also observed, meaning that higher serum creatinine levels are associated with lower GSH levels (Figure 2C). No significant differences were observed for the other parameters (data not shown).

## DISCUSSION

In this study, we investigated the association between markers of oxidative stress and target organ dysfunction in clinical leptospirosis. The GSH depletion has been reported

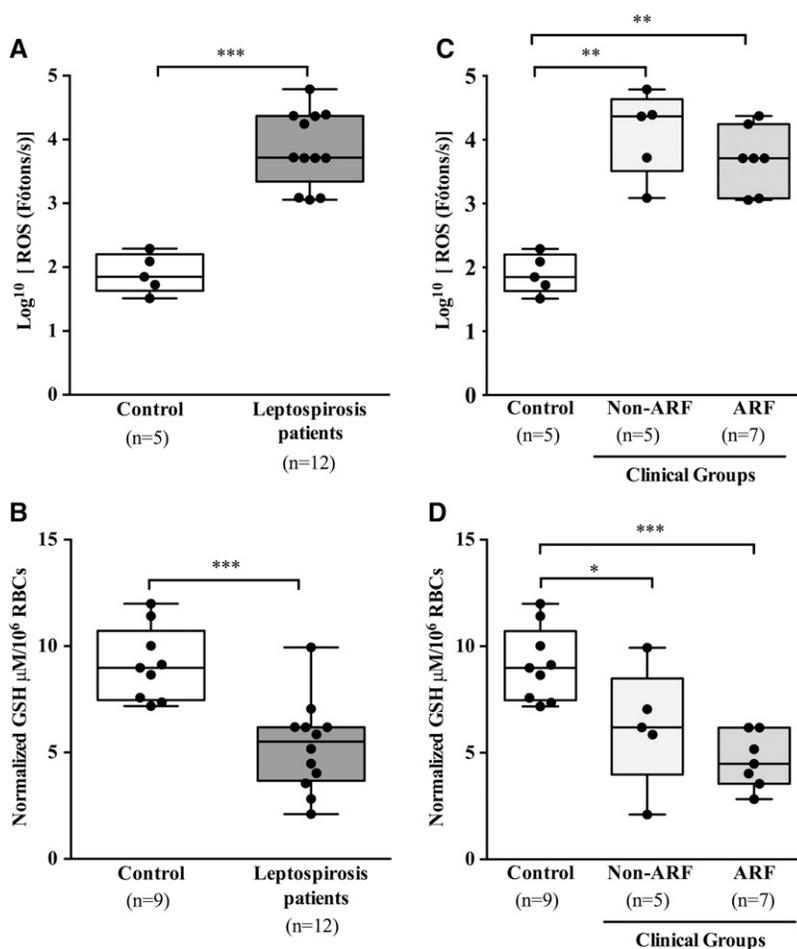


FIGURE 1. Oxidative stress in leptospirosis patients. (A) Reactive oxygen species (ROS) detection in peripheral blood samples of patients with severe leptospirosis at the day of admission and in five healthy control subjects (ROS detection was not possible for all controls caused by technical problems), and (C) clinical groups non-acute renal failure (non-ARF), acute renal failure (ARF), and control. (B) Glutathione (GSH) levels in erythrocytes samples of patients with severe leptospirosis at the day of admission and nine normal control individuals, and (D) clinical groups non-ARF, ARF, and control. The results are expressed as box plot format. The bottom, median, and top lines of the box mark the 25th, 50th, and 75th percentiles, respectively. The vertical line with whiskers shows the range of values. Significant differences at  $P < 0.05$ , Spearman's test are identified by the “\*” compared with the normal group. The GSH data were normalized per 10<sup>6</sup> red blood cells (RBCs).

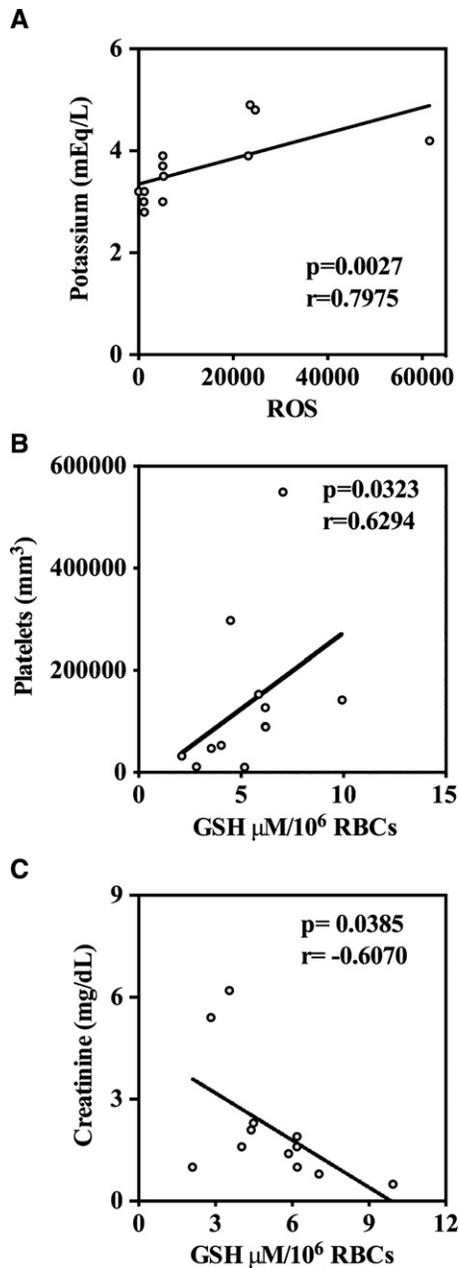


FIGURE 2. Correlation between serum potassium and reactive oxygen species (ROS) concentration in whole blood of leptospirosis patients (A); platelet count and glutathione (GSH) levels in erythrocyte of leptospirosis patients (B); and serum creatinine and GSH levels (C). The GSH data were normalized per  $10^6$  red blood cells (RBCs). Spearman's correlation indices ( $r$  and  $P$  values) are shown in the figure.

in cattle with clinical signs of leptospirosis<sup>24</sup>; the relationship between oxidative stress and clinical markers of severity has not been investigated in human leptospirosis. The present results agree with previous data from studies of sepsis from other Gram-negative infections. In these previous reports, oxidative stress was associated with clinical severity and the onset of multiple organ failure.<sup>15–18</sup> Oxidative stress in leptospirosis is probably a non-specific feature shared with many severe diseases with tissue damage from different etiologies. We did not test alternative control groups to test in which

extent oxidative stress in leptospirosis differs from other severe infectious diseases (e.g., Sepsis by gram negatives). Anyway, the associations identified in this study may be of relevance to seek molecular targets for adjuvant therapies.

The correlations between ROS and serum potassium, and GSH and serum creatinine are consistent with a previous report, where we described that serum nitric oxide level (another free radical) correlates with serum creatinine levels in patients with severe leptospirosis.<sup>11</sup> Although renal involvement in leptospirosis typically presents as hypokalemia without oliguria, if the disease progresses to oliguric renal failure, hyperkalemia is a strong predictor of unfavorable outcome.<sup>6,21</sup> Thrombocytopenia is a consistent feature of severe leptospirosis; however, its pathogenesis remains poorly understood. Diverse factors involved in host homeostasis such as excessive platelet activation, uremia, and disseminated intravascular coagulation have been implicated<sup>7</sup>; in this study, we identified oxidative stress as a potential contributory factor for platelet depletion in severe leptospirosis.

The proposed relation between oxidative stress and target organ dysfunction in leptospirosis, specifically renal failure and thrombocytopenia, opens the possibility of therapies focused on antioxidant defenses. As mentioned previously, our group previously tested the antioxidant NAC as an adjuvant treatment in leptospirosis. No objective effect on outcome was added from NAC treatment when compared with ampicillin treatment alone.<sup>12</sup> Antioxidant therapies have been more exhaustively tested in sepsis models and patients with no proven benefit.<sup>25–27</sup> More recently, NAC proved to be beneficial in the model of cecal ligation and puncture in rats preventing kidney and lung injuries, and leading to higher survival rates. In that study, NAC was administered in a higher dose (126 mg/day) and as a pre-treatment (2 days before induction of sepsis). Thus, in light of our findings of significant associations between markers of oxidative stress and clinical complications in patients, we proposed that further experimental studies (with different study designs) are needed to test adjuvant therapies for severe leptospirosis.<sup>28</sup>

In conclusion, we report that oxidative stress occurs in patients with severe leptospirosis and correlates with renal dysfunction and thrombocytopenia. These results encourage further studies in experimental models to explore the underlying physiopathology of leptospirosis. In addition, evaluation of new antioxidant strategies as adjuvant therapies in leptospirosis is urgently needed.

Received November 16, 2013. Accepted for publication December 27, 2013.

Published online February 3, 2014.

Acknowledgments: We thank the staff at Hospital Couto Maia and Secretaries of Health for Salvador and the state of Bahia for their assistance in surveillance for leptospirosis and infrastructural support.

Financial support: This work was supported by CNPq grant no. 558714/2008-0; Program of Nucleus of Excellency; Brazilian Research Council no. 020/2009; National Institutes of Health (U01 AI088752, R01 AI052473, R01 TW009504, and D43 TW00919).

Disclaimer: None of the authors have any conflicts of interests.

Authors' addresses: Alan M. Araújo, Laboratory of Pathology and Molecular Biology, Oswaldo Cruz Foundation, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal – Salvador Bahia Brazil 40296-710, E-mail: amoreiradearaujo@gmail.com. Eliana A. G. Reis, Laboratory of Pathology and Molecular Biology, Oswaldo Cruz Foundation, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal – Salvador Bahia Brazil 40296-710,

E-mail: eagreis@gmail.com. Daniel Abensur Athanzio, Faculty of Medicine, Federal University of Bahia Brazil, Praça XV de novembro, s/n - Largo do Terreiro de Jesus, 40025010, E-mail: daa@ufba.br. Guilherme S. Ribeiro, Institute of Collective Health, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil 40110-040, E-mail: gsribeiro@ufba.br. Jose Hagan, Yale University, New Haven, CT, and Oswaldo Cruz Foundation, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador Bahia Brazil 40296-710, E-mail: jose.hagan@gmail.com. Guilherme C. Araujo, Laboratory of Pathology and Molecular Biology, Oswaldo Cruz Foundation, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador Bahia Brazil 40296-710, E-mail: guyaraujo@gmail.com. Alcineia O. Damião, Laboratory of Pathology and Molecular Biology, Oswaldo Cruz Foundation, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador Bahia Brazil 40296-710, E-mail: alcidamiao@gmail.com. Nicolli S. Couto, Laboratory of Pathology and Molecular Biology, Oswaldo Cruz Foundation, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador Bahia Brazil 40296-710, E-mail: nicolli.sorice@gmail.com. Albert I. Ko, Yale University, New Haven, CT, and Oswaldo Cruz Foundation, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador Bahia Brazil 40296-710, E-mail: albert.ko@yale.edu. Alberto Noronha-Dutra, Oswaldo Cruz Foundation, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador Bahia Brazil 40296-710, E-mail: dutra.alberto@gmail.com. Mitermayer G. Reis, Laboratory of Pathology and Molecular Biology, Oswaldo Cruz Foundation, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/Bahia Brazil 40296-710, E-mail: miter@bahia.fiocruz.br.

## REFERENCES

- Ko AI, Goarant C, Picardeau M, 2009. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7: 736–747.
- McBride AJ, Athanzio DA, Reis MG, Ko AI, 2005. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 18: 376–386.
- Medeiros FR, Spichler A, Athanzio DA, 2010. Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. *Acta Trop* 115: 155–162.
- WHO, 2003. *Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control*. Malta: World Health Organization.
- Gouveia EL, Metcalfe J, de Carvalho AL, Aires TS, Villasboas-Bisneto JC, Queiroz A, Santos AC, Salgado K, Reis MG, Ko AI, 2008. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis* 14: 505–508.
- Cerqueira TB, Athanzio DA, Spichler AS, Seguro AC, 2008. Renal involvement in leptospirosis—new insights into pathophysiology and treatment. *Braz J Infect Dis* 12: 248–252.
- Medeiros Fda R, Spichler A, Athanzio DA, 2010. Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. *Acta Trop* 115: 155–162.
- Yang CW, Hung CC, Wu MS, Tian YC, Chang CT, Pan MJ, Vandewalle A, 2006. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. *Kidney Int* 69: 815–822.
- Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hong JJ, Yu CC, Vandewalle A, Huang CC, 2000. *Leptospira* outer membrane protein activates NF-kappaB and downstream genes expressed in medullary thick ascending limb cells. *J Am Soc Nephrol* 11: 2017–2026.
- Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hsieh WJ, Vandewalle A, Huang CC, 2002. The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 13: 2037–2045.
- Maciel EA, Athanzio DA, Reis EA, Cunha FQ, Queiroz A, Almeida D, McBride AJ, Ko AI, Reis MG, 2006. High serum nitric oxide levels in patients with severe leptospirosis. *Acta Trop* 100: 256–260.
- Spichler A, Ko AI, Silva EF, De Brito T, Silva AM, Athanzio D, Silva C, Seguro A, 2007. Reversal of renal tubule transporter downregulation during severe leptospirosis with antimicrobial therapy. *Am J Trop Med Hyg* 77: 1111–1119.
- Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR, 1995. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med* 23: 646–651.
- Galley HF, Davies MJ, Webster NR, 1996. Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome. *Crit Care Med* 24: 1649–1653.
- Cowley HC, Bacon PJ, Goode HF, Webster NR, Jones JG, Menon DK, 1996. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit Care Med* 24: 1179–1183.
- Chuang CC, Shiesh SC, Chi CH, Tu YF, Hor LI, Shieh CC, Chen MF, 2006. Serum total antioxidant capacity reflects severity of illness in patients with severe sepsis. *Crit Care* 10: R36.
- Borrelli E, Roux-Lombard P, Grau GE, Girardin E, Ricou B, Dayer J, Suter PM, 1996. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit Care Med* 24: 392–397.
- Cross CE, Forte T, Stocker R, Louie S, Yamamoto Y, Ames BN, Frei B, 1990. Oxidative stress and abnormal cholesterol metabolism in patients with adult respiratory distress syndrome. *J Lab Clin Med* 115: 396–404.
- Wagenaar JF, Goris MG, Gasem MH, Isbandrio B, Moalli F, Mantovani A, Boer KR, Hartskeerl RA, Garlanda C, van Gorp EC, 2009. Long pentraxin PTX3 is associated with mortality and disease severity in severe leptospirosis. *J Infect* 58: 425–432.
- Siriwanij T, Suttinont C, Tantawichien T, Chusil S, Kanjanabuch T, Sitprijia V, 2005. Hemodynamics in leptospirosis: effects of plasmapheresis and continuous venovenous hemofiltration. *Nephrology (Carlton)* 10: 1–6.
- Ko AI, Galvao Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD Jr, Riley LW, 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 354: 820–825.
- Mashimo M, Nishikawa M, Higuchi K, Hirose M, Wei Q, Haque A, Sasaki E, Shiba M, Tominaga K, Watanabe T, Fujiwara Y, Arakawa T, Inoue M, 2006. Production of reactive oxygen species in peripheral blood is increased in individuals with *Helicobacter pylori* infection and decreased after its eradication. *Helicobacter* 11: 266–271.
- Noronha-Dutra AA, Epperlein MM, Woolf N, 1993. Reaction of nitric oxide with hydrogen peroxide to produce potentially cytotoxic singlet oxygen as a model for nitric oxide-mediated killing. *FEBS Lett* 321: 59–62.
- Erdogan HM, Karapehlivan M, Citil M, Atakisi O, Uzlu E, Unver A, 2008. Serum sialic acid and oxidative stress parameters changes in cattle with leptospirosis. *Vet Res Commun* 32: 333–339.
- Mishra V, 2007. Oxidative stress and role of antioxidant supplementation in critical illness. *Clin Lab* 53: 199–209.
- Rinaldi S, Landucci F, De Gaudio AR, 2009. Antioxidant therapy in critically septic patients. *Curr Drug Targets* 10: 872–880.
- Victor VM, Espulgues JV, Hernandez-Mijares A, Rocha M, 2009. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants. *Infect Disord Drug Targets* 9: 376–389.
- Campos R, Shimizu MH, Volpini RA, de Braganca AC, Andrade L, Lopes FD, Olivo C, Canale D, Seguro AC, 2012. N-acetylcysteine prevents pulmonary edema and acute kidney injury in rats with sepsis submitted to mechanical ventilation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302: L640–L650.

## 7. DISCUSSÃO

Nas doenças infecciosas, observa-se a presença do estresse oxidativo devido à ativação de um grande número de fagócitos, com produção de quantidades elevadas de ROS, localmente, que pode causar lesões teciduais. Já foi constatado que o estresse oxidativo tem papel importante na patogênese de doenças infecciosas como septicemia (Cohen, 2002) e colite (doença de crohn) (Iborra et al., 2011; Maor, Rainis, Lanir, & Lavy, 2008). Outros estudos já evidenciaram o aumento da produção de ROS nas gastrites causadas por *Helicobacter pylori* (Mashimo et al., 2006), malária (Becker et al., 2004), AIDS (Gil et al., 2003) e dengue (Seet et al., 2009). Os resultados demonstrados neste trabalho estão de acordo com estudos anteriores realizados em septicemia, doença que apresenta características patofisiológicas e clinicopatológicas muito parecidas com as encontradas na leptospirose. Nestes estudos demonstrou-se que o estresse oxidativo encontrava-se associado à gravidade da doença e à falência múltipla de órgãos (Borrelli et al., 1996; Chuang et al., 2006; Cowley et al., 1996; Cross et al., 1990).

O aumento da produção de ROS no sangue periférico dos pacientes já era esperado, pois existe uma fase de septicemia após a contaminação por leptospiras que dura, em média, uma semana. Além disso, apenas os casos de internação foram envolvidos neste estudo, o que representa apenas uma pequena parcela dos indivíduos infectados que evoluiu para as formas mais graves por não conseguir debelar a infecção. O mesmo era esperado em relação aos níveis de GSH, pois a depleção de GSH de hemácias devido à ação de oxidantes e radicais livres já foi vastamente estudada (Agrawal, Sultana, & Gupta, 1991; Ceballos-Picot et al., 1996; Cimen, 2008; Lu, 2009; Masaaki et al., 1994; Meister & Anderson, 1983).

A comparação da produção de ROS e dos níveis de GSH entre os grupos ARF e Non-ARF não foi significativa, o que pode ser devido ao nosso pequeno número amostral, uma das limitações do nosso estudo. Além disso, apenas uma amostra foi coletada de cada paciente, portanto não há como saber se houve aumento na produção de ROS ou diminuição dos níveis de GSH nos dias subsequentes à internação. Ainda, os grupos foram estratificados baseando-se no quadro clínico do indivíduo apenas no dia da admissão, portanto é possível que pacientes do grupo Non-ARF tenham evoluído para um quadro de insuficiência renal.

A correlação positiva entre os níveis de ROS e potássio sérico, apresentada do presente trabalho, sugere que o aumento de ROS pode resultar num maior comprometimento renal. Embora os envoltimentos renais em leptospirose encontrem-se, normalmente, na forma não oligúrica e hipocalêmica, sabe-se que a doença pode progredir para a forma oligúrica, na

qual a hipercalemia é um importante indicador de gravidade (Cerqueira et al., 2008; Esen, Sunbul, Leblebicioglu, Eroglu, & Turan, 2004; Ko et al., 1999). Além disso, diversos estudos já mostraram a relação entre a produção de ROS e insuficiência renal aguda (Balakrishnan, Blumberg, Pereira, & Jaber, 2003; Feng et al., 2013; Himmelfarb et al., 2004).

A correlação negativa entre GSH e creatinina já era esperada, conforme demonstrado previamente em um estudo realizado por nosso grupo, quando foi observado que os níveis de NO encontravam-se positivamente correlacionados com níveis séricos de creatinina (Maciel et al., 2006). Além disso, os resultados encontrados corroboram com outro estudo feito com 233 pacientes com insuficiência renal, que mostrou que o nível de glutathione no sangue desses indivíduos estava significativamente diminuído em comparação aos controles saudáveis. Ainda nesse estudo, observou-se uma correlação negativa entre níveis de GSH do sangue e a creatinina sérica muito semelhante à observada nesse trabalho (Ceballos-Picot et al., 1996). O desequilíbrio do estado redox do organismo associado aos marcadores de gravidade e de disfunção renal forma um corpo crescente de evidências que apontam para uma participação direta do estresse oxidativo na fisiopatologia renal característica da leptospirose grave.

Nesse trabalho, nós mostramos que o estresse oxidativo também pode ter papel importante no processo de ativação plaquetária. Trombocitopenia é uma característica marcante na leptospirose, entretanto, a sua patogênese ainda é muito pouco compreendida. Diversos fatores, como ativação excessiva de plaquetas, uremia, Coagulação Intravascular Disseminada (CID), além de fatores genéticos, parecem estar envolvidos (Medeiros Fda, Spichler, & Athanazio, 2010). Existe um número crescente de trabalhos mostrando que plaquetas tornam-se ativadas na presença de LPS, porém não se sabe se a ativação ocorre por influência direta do LPS ou se é por ação indireta de outros mecanismos inflamatórios (Andonegui et al., 2005; Semple & Freedman, 2010; Zhang et al., 2009). Quando ativadas, as plaquetas interagem com os neutrófilos e estimulam estas células, fazendo com que ocorra uma resposta mais vigorosa com liberação de grande quantidade de ROS (Clark et al., 2007). Clark e colaboradores mostraram que neutrófilos ativados apenas por LPS causam menos danos ao endotélio do que os ativados por plaquetas (Clark et al., 2007). Dessa maneira, não fica evidente se as plaquetas estão sendo ativadas pelo LPS das leptospirosas e, em seguida, interagindo com os neutrófilos para estimular a produção de ROS ou se o aumento da produção de ROS está envolvido no processo de ativação das plaquetas.

Os dados de correlação demonstrados nesse trabalho entre estresse oxidativo e insuficiência renal e trombocitopenia, chamam atenção para a possibilidade do uso de terapias focadas na utilização de antioxidantes. Por exemplo, foi mostrado que o NAC foi capaz de

reduzir os níveis séricos das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) (Spichler et al., 2007). Da mesma forma, o tratamento com glutathione reduziu o estresse oxidativo e a mortalidade em ratos com septicemia (Sun et al., 2006). Ainda, há a possibilidade de terapias focadas em alvos moleculares específicos, como o peroxinitrito. Substâncias como porfirinas de Ferro (Fe) e Manganês (Mn) são boas candidatas devido a sua capacidade de reagir rapidamente com o peroxinitrito, além de outras características, como ser uma substância estável in vivo, atravessar a membrana plasmática facilmente, ser rapidamente regenerada in vivo após uma reação com um oxidante, não ser tóxica para as células e não produzir subprodutos tóxicos (Crow, 2000). Muitos trabalhos, in vitro e in vivo, já mostraram a capacidade que as porfirinas possuem de reduzir o dano oxidativo causado pelo peroxinitrito (Estevez et al., 1998; Misko et al., 1998; Salvemini et al., 1999; Salvemini, Wang, Stern, Currie, & Misko, 1998; Seija et al., 2012; Szabo, Day, & Salzman, 1996).

O estresse oxidativo causa disfunção mitocondrial, o que pode levar a uma falência múltipla de órgãos (Galley, 2011; Victor, Espulgues, Hernandez-Mijares, & Rocha, 2009). Portanto, as novas estratégias terapêuticas estão testando possíveis maneiras de direcionar os antioxidantes diretamente para alguns compartimentos celulares, principalmente para as mitocôndrias. Alguns trabalhos com modelos experimentais de septicemia têm mostrado bons resultados na utilização do tratamento com antioxidantes direcionados às mitocôndrias, nos quais se pôde observar a diminuição de danos ao fígado e aos rins, além de reduzir o estresse oxidativo e os níveis de IL-6 (Lowe, Thottakam, Webster, Murphy, & Galley, 2008; Lowe, Webster, Murphy, & Galley, 2013).

## **8. CONCLUSÃO**

Em conclusão, nós mostramos que o estresse oxidativo está presente na leptospirose grave e correlaciona-se com algumas alterações patofisiológicas características da doença, como insuficiência renal e plaquetopenia. A produção excessiva de ROS pode desempenhar um papel importante no desfecho clínico, como já foi mostrado em outras doenças infecciosas. Portanto mais estudos são necessários para que haja uma maior compreensão das correlações encontradas. Este estudo chama a atenção para uma possível utilização de antioxidantes em terapias adjuvantes no tratamento da leptospirose.

## 9. REFERÊNCIAS

- Agrawal, D., Sultana, P., & Gupta, G. S. 1991. Oxidative damage and changes in the glutathione redox system in erythrocytes from rats treated with hexachlorocyclohexane. *Food Chem Toxicol*, 29(7): 459-462.
- Alhamdani, M. S. 2005. Impairment of glutathione biosynthetic pathway in uraemia and dialysis. *Nephrol Dial Transplant*, 20(1): 124-128.
- Andonegui, G., Kerfoot, S. M., McNagny, K., Ebbert, K. V., Patel, K. D., & Kubes, P. 2005. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*, 106(7): 2417-2423.
- Babior, B. M. 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood*, 93(5): 1464-1476.
- Balakrishnan, V. S., Blumberg, J., Pereira, B. J., & Jaber, B. L. 2003. Antioxidant and oxidative stress indices in dialysis-dependent acute renal failure. *Blood Purif*, 21(3): 213-219.
- Bandeira, M., Santos, C. S., de Azevedo, E. C., Soares, L. M., Macedo, J. O., Marchi, S., da Silva, C. L., Chagas-Junior, A. D., McBride, A. J., McBride, F. W., Reis, M. G., & Athanazio, D. A. 2011. Attenuated nephritis in inducible nitric oxide synthase knockout C57BL/6 mice and pulmonary hemorrhage in CB17 SCID and recombination activating gene 1 knockout C57BL/6 mice infected with *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*, 79(7): 2936-2940.
- Becker, K., Tilley, L., Vennerstrom, J. L., Roberts, D., Rogerson, S., & Ginsburg, H. 2004. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol*, 34(2): 163-189.
- Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271(5 Pt 1): C1424-1437.
- Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., Levett, P. N., Gilman, R. H., Willig, M. R., Gotuzzo, E., & Vinetz, J. M. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*, 3(12): 757-771.
- Borrelli, E., Roux-Lombard, P., Grau, G. E., Girardin, E., Ricou, B., Dayer, J., & Suter, P. M. 1996. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit Care Med*, 24(3): 392-397.
- Brett-Major, D. M., & Coldren, R. 2012. Antibiotics for leptospirosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2: CD008264.
- Ceballos-Picot, I., Witko-Sarsat, V., Merad-Boudia, M., Nguyen, A. T., Thevenin, M., Jaudon, M. C., Zingraff, J., Verger, C., Jungers, P., & Descamps-Latscha, B. 1996. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med*, 21(6): 845-853.

- Cerqueira, T. B., Athanazio, D. A., Spichler, A. S., & Seguro, A. C. 2008. Renal involvement in leptospirosis--new insights into pathophysiology and treatment. *Braz J Infect Dis*, 12(3): 248-252.
- Chagas-Junior, A. D., McBride, A. J., Athanazio, D. A., Figueira, C. P., Medeiros, M. A., Reis, M. G., Ko, A. I., & McBride, F. W. 2009. An imprint method for detecting leptospires in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. *J Med Microbiol*, 58(Pt 12): 1632-1637.
- Chassin, C., Picardeau, M., Goujon, J. M., Bourhy, P., Quellard, N., Darche, S., Badell, E., d'Andon, M. F., Winter, N., Lacroix-Lamande, S., Buzoni-Gatel, D., Vandewalle, A., & Werts, C. 2009. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. *J Immunol*, 183(4): 2669-2677.
- Chuang, C. C., Shiesh, S. C., Chi, C. H., Tu, Y. F., Hor, L. I., Shieh, C. C., & Chen, M. F. 2006. Serum total antioxidant capacity reflects severity of illness in patients with severe sepsis. *Crit Care*, 10(1): R36.
- Cimen, M. Y. 2008. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta*, 390(1-2): 1-11.
- Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M. M., Patel, K. D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G. D., Keys, E. M., Allen-Vercoe, E., Devinney, R., Doig, C. J., Green, F. H., & Kubes, P. 2007. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*, 13(4): 463-469.
- Cohen, J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420(6917): 885-891.
- Cowley, H. C., Bacon, P. J., Goode, H. F., Webster, N. R., Jones, J. G., & Menon, D. K. 1996. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit Care Med*, 24(7): 1179-1183.
- Cross, C. E., Forte, T., Stocker, R., Louie, S., Yamamoto, Y., Ames, B. N., & Frei, B. 1990. Oxidative stress and abnormal cholesterol metabolism in patients with adult respiratory distress syndrome. *J Lab Clin Med*, 115(4): 396-404.
- Crow, J. P. 2000. Peroxynitrite scavenging by metalloporphyrins and thiolates. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(10): 1487-1494.
- Diament, D., Brunialti, M. K., Romero, E. C., Kallas, E. G., & Salomao, R. 2002. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. *Infect Immun*, 70(4): 1677-1683.
- Durak, I., Akyol, O., Basesme, E., Canbolat, O., & Kavutcu, M. 1994. Reduced erythrocyte defense mechanisms against free radical toxicity in patients with chronic renal failure. *Nephron*, 66(1): 76-80.
- Dursun, B., Bostan, F., Artac, M., Varan, H. I., & Suleymanlar, G. 2007. Severe pulmonary haemorrhage accompanying hepatorenal failure in fulminant leptospirosis. *Int J Clin Pract*, 61(1): 164-167.

- Dutta, T. K., & Christopher, M. 2005. Leptospirosis--an overview. *J Assoc Physicians India*, 53: 545-551.
- Erdogan, H. M., Karapehlivan, M., Cital, M., Atakisi, O., Uzlu, E., & Unver, A. 2008. Serum sialic acid and oxidative stress parameters changes in cattle with leptospirosis. *Vet Res Commun*, 32(4): 333-339.
- Esen, S., Sunbul, M., Leblebicioglu, H., Eroglu, C., & Turan, D. 2004. Impact of clinical and laboratory findings on prognosis in leptospirosis. *Swiss Med Wkly*, 134(23-24): 347-352.
- Eshghi, A., Lourdault, K., Murray, G. L., Bartpho, T., Sermswan, R. W., Picardeau, M., Adler, B., Snarr, B., Zuerner, R. L., & Cameron, C. E. 2012. *Leptospira interrogans* catalase is required for resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and for virulence. *Infect Immun*, 80(11): 3892-3899.
- Estevez, A. G., Spear, N., Manuel, S. M., Radi, R., Henderson, C. E., Barbeito, L., & Beckman, J. S. 1998. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *J Neurosci*, 18(3): 923-931.
- Evangelista, K. V., & Coburn, J. 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol*, 5(9): 1413-1425.
- Faine. 1999. *Leptospira and leptospirosis* (2nd ed.). Melbourne: MediSci.
- Faine, S. 1994. *Leptospira and leptospirosis*: CRC Press.
- Feng, Y., Liu, Y., Wang, L., Cai, X., Wang, D., Wu, K., Chen, H., Li, J., & Lei, W. 2013. Sustained oxidative stress causes late acute renal failure via duplex regulation on p38 MAPK and Akt phosphorylation in severely burned rats. *PLoS One*, 8(1): e54593.
- Föller, M., Huber, S. M., & Lang, F. 2008. Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life*, 60(10): 661-668.
- Galley, H. F. 2011. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth*, 107(1): 57-64.
- Ganoza, C. A., Matthias, M. A., Collins-Richards, D., Brouwer, K. C., Cunningham, C. B., Segura, E. R., Gilman, R. H., Gotuzzo, E., & Vinetz, J. M. 2006. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Med*, 3(8): e308.
- Gil, L., Martinez, G., Gonzalez, I., Tarinas, A., Alvarez, A., Giuliani, A., Molina, R., Tapanes, R., Perez, J., & Leon, O. S. 2003. Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. *Pharmacol Res*, 47(3): 217-224.
- Gouveia, E. L., Metcalfe, J., de Carvalho, A. L., Aires, T. S., Villasboas-Bisneto, J. C., Queiroz, A., Santos, A. C., Salgado, K., Reis, M. G., & Ko, A. I. 2008. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 14(3): 505-508.
- Griffith, O. W. 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med*, 27(9-10): 922-935.

- Gunaratna, R. I., Handunnetti, S. M., Bulathsinghalage, M. R., Somaratne, P., Jayanaga, A., de Silva, H. J., & Rajapakse, S. 2012. Serum nitrite levels in Sri Lankan patients with leptospirosis. *Asian Pac J Trop Med*, 5(1): 75-78.
- Halliwell, B. 2006. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem Sci*, 31(9): 509-515.
- Halliwell, B. 2011. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci*, 32(3): 125-130.
- Halliwell, B. 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*, 70(5): 257-265.
- Halliwell, B., & Whiteman, M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*, 142(2): 231-255.
- Himmelfarb, J., McMonagle, E., Freedman, S., Klenzak, J., McMenamin, E., Le, P., Pupim, L. B., Ikizler, T. A., & The, P. G. 2004. Oxidative stress is increased in critically ill patients with acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 15(9): 2449-2456.
- Iborra, M., Moret, I., Rausell, F., Bastida, G., Aguas, M., Cerrillo, E., Nos, P., & Beltran, B. 2011. Role of oxidative stress and antioxidant enzymes in Crohn's disease. *Biochem Soc Trans*, 39(4): 1102-1106.
- Imada, I., Sato, E. F., Miyamoto, M., Ichimori, Y., Minamiyama, Y., Konaka, R., & Inoue, M. 1999. Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012. *Anal Biochem*, 271(1): 53-58.
- Jones, D. P. 2008. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295(4): C849-868.
- Kalugalage, T., Rodrigo, C., Vithanage, T., Somaratne, P., De Silva, H. J., Handunnetti, S., & Rajapakse, S. 2013. Low serum total nitrite and nitrate levels in severe leptospirosis. *BMC Infect Dis*, 13: 206.
- Katz, A. R., Ansdell, V. E., Effler, P. V., Middleton, C. R., & Sasaki, D. M. 2001. Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974-1998. *Clin Infect Dis*, 33(11): 1834-1841.
- Knowles, R. G., & Moncada, S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298 ( Pt 2): 249-258.
- Ko, A. I., Galvao Reis, M., Ribeiro Dourado, C. M., Johnson, W. D., Jr., & Riley, L. W. 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet*, 354(9181): 820-825.
- Ko, A. I., Goarant, C., & Picardeau, M. 2009. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*, 7(10): 736-747.

- Lang, F., Gulbins, E., Lerche, H., Huber, S. M., Kempe, D. S., & Foller, M. 2008. Eryptosis, a window to systemic disease. *Cell Physiol Biochem*, 22(5-6): 373-380.
- Lowes, D. A., Thottakam, B. M., Webster, N. R., Murphy, M. P., & Galley, H. F. 2008. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ protects against organ damage in a lipopolysaccharide-peptidoglycan model of sepsis. *Free Radic Biol Med*, 45(11): 1559-1565.
- Lowes, D. A., Webster, N. R., Murphy, M. P., & Galley, H. F. 2013. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *Br J Anaesth*, 110(3): 472-480.
- Lu, S. C. 2009. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*, 30(1-2): 42-59.
- Maciel, E. A., Athanazio, D. A., Reis, E. A., Cunha, F. Q., Queiroz, A., Almeida, D., McBride, A. J., Ko, A. I., & Reis, M. G. 2006. High serum nitric oxide levels in patients with severe leptospirosis. *Acta Trop*, 100(3): 256-260.
- Maor, I., Rainis, T., Lanir, A., & Lavy, A. 2008. Oxidative stress, inflammation and neutrophil superoxide release in patients with Crohn's disease: distinction between active and non-active disease. *Dig Dis Sci*, 53(8): 2208-2214.
- Marangoni, A., Accardo, S., Aldini, R., Guardigli, M., Cavrini, F., Sambri, V., Montagnani, M., Roda, A., & Cevenini, R. 2006. Production of reactive oxygen species and expression of inducible nitric oxide synthase in rat isolated Kupffer cells stimulated by *Leptospira interrogans* and *Borrelia burgdorferi*. *World J Gastroenterol*, 12(19): 3077-3081.
- Masaaki, K., Masatoshi, S., Koichi, H., & Keisuke, T. 1994. Relationship between erythrocyte deformability and glutathione under oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 107(1): 7-12.
- Mashimo, M., Nishikawa, M., Higuchi, K., Hirose, M., Wei, Q., Haque, A., Sasaki, E., Shiba, M., Tominaga, K., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Arakawa, T., & Inoue, M. 2006. Production of reactive oxygen species in peripheral blood is increased in individuals with *Helicobacter pylori* infection and decreased after its eradication. *Helicobacter*, 11(4): 266-271.
- McBride, A. J., Athanazio, D. A., Reis, M. G., & Ko, A. I. 2005. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*, 18(5): 376-386.
- Medeiros Fda, R., Spichler, A., & Athanazio, D. A. 2010. Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. *Acta Trop*, 115(1-2): 155-162.
- Meister, A., & Anderson, M. E. 1983. Glutathione. *Annu Rev Biochem*, 52: 711-760.
- Misko, T. P., Highkin, M. K., Veenhuizen, A. W., Manning, P. T., Stern, M. K., Currie, M. G., & Salvemini, D. 1998. Characterization of the cytoprotective action of peroxynitrite decomposition catalysts. *J Biol Chem*, 273(25): 15646-15653.
- Nemeth, I., & Boda, D. 2001. Xanthine oxidase activity and blood glutathione redox ratio in infants and children with septic shock syndrome. *Intensive Care Med*, 27(1): 216-221.

- Nicodemo, A. C., Duarte, M. I., Alves, V. A., Takakura, C. F., Santos, R. T., & Nicodemo, E. L. 1997. Lung lesions in human leptospirosis: microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia. *Am J Trop Med Hyg*, 56(2): 181-187.
- Noronha-Dutra, A. A., Epperlein, M. M., & Woolf, N. 1993. Reaction of nitric oxide with hydrogen peroxide to produce potentially cytotoxic singlet oxygen as a model for nitric oxide-mediated killing. *FEBS Lett*, 321(1): 59-62.
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, 87(1): 315-424.
- Salvemini, D., Riley, D. P., Lennon, P. J., Wang, Z. Q., Currie, M. G., Macarthur, H., & Misko, T. P. 1999. Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage. *Br J Pharmacol*, 127(3): 685-692.
- Salvemini, D., Wang, Z. Q., Stern, M. K., Currie, M. G., & Misko, T. P. 1998. Peroxynitrite decomposition catalysts: therapeutics for peroxynitrite-mediated pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(5): 2659-2663.
- Seet, R. C., Lee, C. Y., Lim, E. C., Quek, A. M., Yeo, L. L., Huang, S. H., & Halliwell, B. 2009. Oxidative damage in dengue fever. *Free Radic Biol Med*, 47(4): 375-380.
- Seija, M., Baccino, C., Nin, N., Sanchez-Rodriguez, C., Granados, R., Ferruelo, A., Martinez-Caro, L., Ruiz-Cabello, J., de Paula, M., Noboa, O., Esteban, A., & Lorente, J. A. 2012. Role of peroxynitrite in sepsis-induced acute kidney injury in an experimental model of sepsis in rats. *Shock*, 38(4): 403-410.
- Semple, J. W., & Freedman, J. 2010. Platelets and innate immunity. *Cell Mol Life Sci*, 67(4): 499-511.
- Shenoy, V. V., Nagar, V. S., Chowdhury, A. A., Bhalgat, P. S., & Juvale, N. I. 2006. Pulmonary leptospirosis: an excellent response to bolus methylprednisolone. *Postgrad Med J*, 82(971): 602-606.
- Spichler, A., Ko, A. I., Silva, E. F., De Brito, T., Silva, A. M., Athanazio, D., Silva, C., & Seguro, A. 2007. Reversal of renal tubule transporter downregulation during severe leptospirosis with antimicrobial therapy. *Am J Trop Med Hyg*, 77(6): 1111-1119.
- Spichler, A. S., Vilaca, P. J., Athanazio, D. A., Albuquerque, J. O., Buzzar, M., Castro, B., Seguro, A., & Vinetz, J. M. 2008. Predictors of lethality in severe leptospirosis in urban Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 79(6): 911-914.
- Sun, S., Zhang, H., Xue, B., Wu, Y., Wang, J., Yin, Z., & Luo, L. 2006. Protective effect of glutathione against lipopolysaccharide-induced inflammation and mortality in rats. *Inflamm Res*, 55(11): 504-510.
- Szabo, C., Day, B. J., & Salzman, A. L. 1996. Evaluation of the relative contribution of nitric oxide and peroxynitrite to the suppression of mitochondrial respiration in immunostimulated macrophages using a manganese mesoporphyrin superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger. *FEBS Lett*, 381(1-2): 82-86.

- Thaipadungpanit, J., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Smythe, L. D., Petkanchanapong, W., Limpiboon, R., Apiwatanaporn, A., Slack, A. T., Suputtamongkol, Y., White, N. J., Feil, E. J., Day, N. P., & Peacock, S. J. 2007. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis*, 1(1): e56.
- Tonin, A. A., Thomé, G. R., Calgaroto, N., Baldissarelli, J., Azevedo, M. A., Escobar, T. P., Santos, L. G., Silva, A. S., Badke, M. R. T., Schetinger, M. R., Mazzanti, C. M., & Lopes, S. T. A. 2011. Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes Activity of Wistar Rats Experimentally Infected with *Leptospira interrogans*. *Acta Scientiae Veterinariae*, 39(2).
- UN-habitat. 2003. *The challenge of slums : global report on human settlements, 2003 / United Nations Human Settlements Programme*. London ; Sterling, VA: UN-Habitat [and] Earthscan Publications.
- Victor, V. M., Espulgues, J. V., Hernandez-Mijares, A., & Rocha, M. 2009. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants. *Infect Disord Drug Targets*, 9(4): 376-389.
- Vinetz, J. M. 2001. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*, 14(5): 527-538.
- Vinetz, J. M. 2003. A mountain out of a molehill: do we treat acute leptospirosis, and if so, with what? *Clin Infect Dis*, 36(12): 1514-1515.
- Vinetz, J. M., Glass, G. E., Flexner, C. E., Mueller, P., & Kaslow, D. C. 1996. Sporadic urban leptospirosis. *Ann Intern Med*, 125(10): 794-798.
- Wagenaar, J. F., Gasem, M. H., Goris, M. G., Leeftang, M., Hartskeerl, R. A., van der Poll, T., van 't Veer, C., & van Gorp, E. C. 2009a. Soluble ST2 levels are associated with bleeding in patients with severe Leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(6): e453.
- Wagenaar, J. F., Goris, M. G., Gasem, M. H., Isbandrio, B., Moalli, F., Mantovani, A., Boer, K. R., Hartskeerl, R. A., Garlanda, C., & van Gorp, E. C. 2009b. Long pentraxin PTX3 is associated with mortality and disease severity in severe Leptospirosis. *J Infect*, 58(6): 425-432.
- Wang, B., Sullivan, J. A., Sullivan, G. W., & Mandell, G. L. 1984. Role of specific antibody in interaction of leptospirae with human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect Immun*, 46(3): 809-813.
- Watt, G., Padre, L. P., Tuazon, M. L., Calubaquib, C., Santiago, E., Ranoa, C. P., & Laughlin, L. W. 1988. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. *Lancet*, 1(8583): 433-435.
- Werts, C., Tapping, R. I., Mathison, J. C., Chuang, T. H., Kravchenko, V., Saint Girons, I., Haake, D. A., Godowski, P. J., Hayashi, F., Ozinsky, A., Underhill, D. M., Kirschning, C. J., Wagner, H., Aderem, A., Tobias, P. S., & Ulevitch, R. J. 2001. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol*, 2(4): 346-352.
- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*, 134(3): 489-492.

- Yang, C. W., Hung, C. C., Wu, M. S., Tian, Y. C., Chang, C. T., Pan, M. J., & Vandewalle, A. 2006a. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. *Kidney Int*, 69(5): 815-822.
- Yang, C. W., Wu, M. S., Pan, M. J., Hong, J. J., Yu, C. C., Vandewalle, A., & Huang, C. C. 2000. Leptospira outer membrane protein activates NF-kappaB and downstream genes expressed in medullary thick ascending limb cells. *J Am Soc Nephrol*, 11(11): 2017-2026.
- Yang, C. W., Wu, M. S., Pan, M. J., Hsieh, W. J., Vandewalle, A., & Huang, C. C. 2002. The Leptospira outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol*, 13(8): 2037-2045.
- Yang, H. L., Jiang, X. C., Zhang, X. Y., Li, W. J., Hu, B. Y., Zhao, G. P., & Guo, X. K. 2006b. Thrombocytopenia in the experimental leptospirosis of guinea pig is not related to disseminated intravascular coagulation. *BMC Infect Dis*, 6: 19.
- Younes-Ibrahim, M., Burth, P., Faria, M. V., Buffin-Meyer, B., Marsy, S., Barlet-Bas, C., Cheval, L., & Doucet, A. 1995. Inhibition of Na,K-ATPase by an endotoxin extracted from *Leptospira interrogans*: a possible mechanism for the physiopathology of leptospirosis. *C R Acad Sci III*, 318(5): 619-625.
- Zhang, G., Han, J., Welch, E. J., Ye, R. D., Voyno-Yasenetskaya, T. A., Malik, A. B., Du, X., & Li, Z. 2009. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol*, 182(12): 7997-8004.

**FONTES DE FINANCIAMENTO:**

Este trabalho foi financiado pelo CNPq grant # 558714/2008-0; Pronex1 # 020/2009 e NIH (U01 AI088752, R01 AI052473, R01 TW009504 and D43 TW00919). **Alan Moreira Araujo – bolsista da Fiocruz-Bahia.**