

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Graduação em Ciências Biológicas-Bacharelado



Trabalho de Conclusão de Curso

Caracterização da virulência da cepa 4Ede *Leptospira borgpetersenii* sorogrupo Ballum em hamster

Juliana Alcoforado Diniz

Pelotas, 2010

JULIANA ALCOFORADO DINIZ

CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA DA CEPA 4E DE *Leptospira borgpetersenii* SOROGRUPO BALLUM EM HAMSTER.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva
Co-Orientador: Prof. Dr. José A. Guimarães Aleixo

Pelotas, 2010

Dados de catalogação na fonte:

Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

D585c

Diniz, Juliana Alcoforado

Caracterização da virulência da Cepa \$E de *Leptospira borgpetersenii* sorogrupo Ballum em Hamster / Juliana Alcoforado Diniz. – 55f. – Monografia (Conclusão de curso). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2010. – Orientador Everton Fagonde da Silva; Co-orientador José Antônio Guimarães Aleixo.

1.Biologia. 2.Biotecnologia. 3.Leptospirose. 4.Hamster.
5.Doença negligenciada. 6.Modelo vacinal. I.Silva, Everton Fagonde da. II.Aleixo, José Antônio Guimarães. III.Título

CDD: 599.323

Banca examinadora:

Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

MSc. Flávia Aleixo Vasconcellos

Dr. Éverton Fagonde da Silva (Orientador)

A Deus

Aos meus pais Gilberto e Eliane
À minha irmã Tassiana

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida e pelo amor incondicional que me carrega nos braços quando penso não ter mais forças.

Aos meus pais, Gilberto e Eliane pela compreensão, carinho e amor que me dedicaram desde o meu nascimento, e principalmente pelo exemplo de pais e de professores universitários que me despertaram para vida acadêmica e para a pesquisa, me ensinando muito mais do que valores morais e éticos, mas sim como ser uma pessoa melhor.

À minha irmã Tassiana, pelos conselhos, conversas e pela paciência em escutar as minhas reclamações e as minhas intermináveis apresentações do CIC, mesmo não entendendo nada do assunto.

À Universidade Federal de Pelotas, e ao Instituto de Biologia pela oportunidade de realizar um curso de graduação de qualidade, e também ao Centro de biotecnologia pelo ótimo suporte para a pesquisa e ao Cnpq e FAPERGS pela concessão de bolsa de iniciação científica.

Ao professor Aleixo, por acreditar em mim desde o começo, e que com o seu jeito sincero me mostrou valores éticos, sendo um verdadeiro exemplo de mestre que eu pretendo seguir na minha vida, além de me fornecer o subsídio financeiro através de bolsas de iniciação científica durante toda a minha graduação.

Gostaria de agradecer a todos os pesquisadores do Laboratório 6, principalmente a Mariana com quem tive o prazer de trabalhar sendo mais do que orientadora uma amiga, além dos outros alunos de pós graduação, em especial a Flávia, Marcelo e Carla.

Ao meu orientador nesse trabalho de conclusão de curso, o professor Éverton que foi muito mais do que um orientador, que com um carinho paternal, me mostrou que eu tinha capacidade para querer sempre mais, e que juntamente com os seus outros “filhos”, Samuel, Michel, André e Amilton me proporcionaram uma convivência muito agradável.

Não poderia deixar de agradecer a minha grande amiga durante esse curso a colega Simone que sempre foi uma companheira e que juntamente com a Neida, Cristiele e Leonardo tornaram esse 5 anos de faculdade muito especiais para mim.

Muito Obrigada!!!

Resumo

Diniz, Juliana Alcoforado. **Caracterização da virulência de uma cepa de *Leptospira borgpetersenii* sorogrupo Ballum em hamster**. 2010. 55f. Monografia (Graduação) – Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose ocorre em todo o planeta em humanos e animais, sendo considerada uma das zoonoses mais importantes no mundo. Recentemente, o nosso grupo de pesquisa relatou o isolamento, a caracterização sorológica e molecular de quatro cepas de *L. borgpetersenii* sorogrupo Ballum, obtidas de camundongos (*Mus musculus*) capturados em uma residência localizada nas proximidades do campus da UFPel. Neste trabalho, utilizou-se uma dessas cepas (cepa 4E) para reproduzir a leptospirose experimental em hamsters sírios capa dourada (*Mesocricetus auratus*), um modelo animal suscetível a doença, avaliando-se as manifestações clínicas e os achados histopatológicos da doença, além de padronizar a dose letal 50% (LD50). Grupos de hamsters com nove semanas de idade foram pareados por sexo, sendo inoculados com diluições seriadas da bactéria (10^0 a 10^4), através da via intraperitoneal. A avaliação clínica diária foi realizada nos animais de todos os grupos, sendo que a coleta de rins, fígado e pulmões foi realizada nos óbitos e naqueles que sobreviveram até o final do experimento processando-os para a posterior análise histopatológica. As manifestações clínicas da doença foram caracterizadas pela presença de sinais clínicos entre os dias 4 e 10 após a inoculação, induzindo letalidade no modelo animal com um inóculo menor do que 10 leptospiras para ambos os sexos. As análises histopatológicas mostraram lesões tipicamente encontradas na leptospirose severa, caracterizadas pela presença de icterícia, hemorragia pulmonar e glomerulopatia. Conclui-se que a cepa 4E pode ser utilizada em estudos futuros, especialmente na avaliação da proteção cruzada induzida por vacinas recombinantes contra a leptospirose.

Palavras-chave: Leptospirose. Hamster. Doença negligenciada. Modelo vacinal.

Abstract

Diniz, Juliana Alcoforado. **Caracterização da virulência de uma cepa de *Leptospira borgpetersenii* sorogrupo Ballum em hamster**. 2010. 55f. Monografia (Graduação) – Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis occurs throughout the world in man and animals, it is considered one of the most important zoonosis of the planet. Recently, our group reported the isolation and characterization of four *L. borgpetersenii* serogroup Ballum strains, obtained from mice (*Mus musculus*) captured in the surroundings of the UFPel. In the present work, one of these strains (strain 4E) was used to reproduce experimental leptospirosis in golden syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), a susceptible animal model for the disease. Clinical parameters and pathological findings were evaluated and the lethal dose 50% (LD50) was calculated. Groups of nine week old hamsters were paired by gender and inoculated with serial dilutions of the bacteria (10^0 a 10^4) through the intraperitoneal route (IP). Daily clinical evaluations were performed in all animals. Organ tissue was harvested when animals died, or at the end of the experiment when all surviving animals were euthanized. Tissue samples were processed for histopathological analyses. Clinical manifestations of the disease occurred mainly from the fourth to the tenth day post infection (d.p.i.). Strain 4E induced lethality with less than 10 leptospire for male and females. Histopathological analyses revealed lesions typically found in severe leptospirosis. This strain is now fully characterized and can now be used in future studies.

Keywords: Leptospirosis. Mouse-derived strain. Neglected disease. Vaccine model.

Lista de Figuras

Figura 01	Estrutura helicoidal e com extremidade em forma de gancho da espiroqueta do gênero <i>Leptospira</i> sp.....	14
Figura 02	Ciclo de infecção da leptospirose e manifestações clínicas em humanos.....	16
Figura 03	Curvas de sobrevivência dos animais no experimento, de acordo com cada uma das diluições do antígeno e os dias de óbito.....	23
Figura 04	Achados macroscópicos representativos, em animais mortos e moribundos. (A) hemorragia pulmonar. (B) Icterícia leve e congestão de órgãos abdominais.	24
Figura 05	Análise histopatológica através da coloração de HE, de acordo com a diluição da bactéria.....	25

Lista de Tabelas

Tabela 01	Freqüência e dias de óbito dos hamsters de acordo com a diluição e o sexo.....	22
-----------	--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

°C	Graus Celsius
µm	Micrometro
CBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CDTec	Centro de desenvolvimento tecnológico
CEEA	Comissão de ética em experimentação animal
cm	Centímetro
DL50	Dose Letal 50%
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
d.p.i	Dias pós inoculação
EMJH	Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson e Harris
g	Grama
HE	Hematoxilina e Eosina
HP	Hemorragia Pulmonar
IgM	Imunoglobulina M
IP	Intraperitoneal
mL	Mililitros
mm	Milimetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> - Tampão fosfato salino
PM	Peso Molecular
SASP	Sem Alterações de Significado Patológico
SPHS	Síndrome Hemorrágica Pulmonar Severa
UFPEl	Universidade Federal de Pelotas

Sumário

1. Introdução.....	10
1.1. Objetivos.....	12
2. Revisão de literatura	
2.1. Leptospirose: uma zoonose de distribuição mundial.....	13
3. Metodologia.....	18
3.1. Cultivos de leptospiras.....	18
3.2. Hamsters.....	18
3.3. Experimentos de Dose Letal 50%.....	19
3.4. Amostras Teciduais.....	20
3.5. Coloração com Hematoxilina e Eosina.....	20
4. Resultados.....	21
5. Discussão.....	26
6. Conclusões.....	28
Referências Bibliográficas.....	29
Apêndice.....	34
Anexo.....	52

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose ocorre em todo o mundo em humanos e animais (WHO, 2003). Os seres humanos e os animais infectam-se, principalmente, através do contato direto ou indireto com a urina de animais doentes (FAINE, 1999). Esta importante zoonose é caracterizada por um amplo espectro de manifestações clínicas, desde infecção subclínica ou inaparente, até as formas mais graves da enfermidade como a Síndrome de Weil (BHARTI, 2003) e a Síndrome da hemorragia pulmonar severa (GOUVEIA, 2008).

Similar a doença em humanos (AREAN, 1962; BRITO, 1966), a leptospirose em hamsters é aguda, com lesões proeminentes nos rins, fígado e pulmões. Achados como a nefrite intersticial, que resulta em dano agudo e crônico nos rins, bem como a perda da função renal, além de hemorragia pulmonar severa, foram relatados em hamsters, incluindo também infecções com sorovares Icterohaemorrhagiae e Canicola (MILLER 1974; SILVA, 2008), Pomona (SANGER, 1961) e Hardjo (BADIOLA, 1983).

Assim como ocorre com *L. interrogans*, a infecção experimental com *L. noguchii* e *L. kirschneri* geralmente acarreta num curso fatal (BARNETT, 1999; SILVA, 2008). Recentemente, um estudo visou a caracterização da virulência e a padronização da DL50 com isolados brasileiros, demonstrando que o hamster é um modelo experimental ideal para o estudo de vacinas contra a doença, devido à sua susceptibilidade a uma ampla gama de cepas patogênicas e pela reprodução das formas graves da leptospirose (SILVA, 2008). Apesar disso, estudos experimentais sobre o curso clínico da doença e sobre a análise histopatológica para o sorogrupo

Ballum em hamsters são escassos (FAINE, 1999), apesar do surgimento desse sorogrupo como uma causa importante de doença no mundo (SLACK, 2006).

A *L. borgpetersenii* sorogrupo Ballum cepa 4E foi recentemente isolada do ecossistema local, nas proximidades do campus Capão do Leão, da UFPel. Esta cepa foi isolada e caracterizada por técnicas sorológicas e moleculares pelo nosso grupo de pesquisa (SILVA, 2010).

Neste contexto, realizou-se o presente trabalho com o intuito de caracterizar a virulência e determinar a DL50 da cepa 4E de *L. borgpetersenii* sorogrupo Ballum em hamster. O desafio com esta cepa, agora padronizada, pode ser utilizada em desenvolvimento de novas vacinas heterólogas, estudos de virulência comparativa e diagnóstico.

1.1. Objetivos:

Geral

Utilizar a cepa 4E de *L. borgpetersenii* sorogrupo Ballum para reproduzir a leptospirose experimental em hamsters sírios capa dourada (*Mesocricetus auratus*), um modelo suscetível para a leptospirose.

Específicos

- Cultivar *in vitro* a cepa 4E de *L. borgpetersenii*
- Testar a virulência de uma cepa de *L. borgpetersenii* em hamsters;
- Realizar a avaliação clínica dos animais durante o período do experimento;
- Determinar a DL50 para hamsters com a cepa 4E de *L. borgpetersenii*;
- Avaliar, através da técnica de HE, as lesões encontradas nos rins, fígados e pulmões dos hamsters inoculados com cada uma das diluições;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leptospirose: uma zoonose de distribuição mundial

A leptospirose é a zoonose de maior disseminação em todo o mundo, estando presente em todos os continentes, exceto na Antártida (FAINE, 1999). Segundo a organização mundial da saúde, mais de 500.000 casos da forma grave da leptospirose são notificados em cada ano, com taxas de mortalidade superior a 10% (WHO, 1999; KO, 2009). Existem evidências de que praticamente todas as espécies de mamíferos são hospedeiros suscetíveis a essa doença, que tem como agente etiológico as bactérias do gênero *Leptospira* spp (ADLER, 2009).

As leptospirosas são espiroquetas que pertencem à família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales. Essas bactérias apresentam cerca de 0,1 µm de diâmetro por 6-20 µm de comprimento e podem ser distinguidas de outras espiroquetas, com base em suas extremidades únicas em forma de gancho ou ponto de interrogação, (LI, 2000) conforme ilustrado na fig 1. Nesse gênero, estão compreendidas espécies saprófitas e patogênicas, sendo as saprófitas, organismos de vida livre encontrado na água e no solo e, que ao contrário das patogênicas, não colonizam o hospedeiro (FAINE, 1999).

Yasuda e colaboradores em 1987 demonstraram pela hibridização genômica DNA-DNA que as várias cepas de *L. interrogans sensu lato* não constitui uma, mas pelo menos seis espécies diferentes e com base em experimentos de hibridização de DNA, um total de 20 espécies já foram descritas no gênero *Leptospira* (MATTHIAS, 2008). No entanto, a correlação entre os sistemas de classificação

sorológica e genotípica é pobre e um dado sorogrupo é frequentemente encontrada em várias espécies de *Leptospira* (BRENNER, 1999).

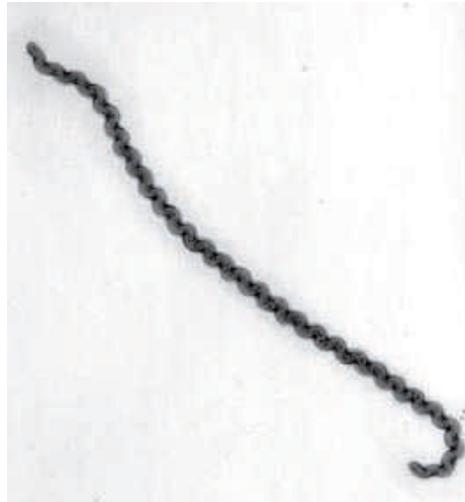


Figura 1: Estrutura helicoidal e com extremidade em forma de gancho da espiroqueta do gênero *Leptospira* sp.

Na década passada, a leptospirose era considerada, principalmente, uma doença ocupacional, associada a atividades como a mineração, cultivo de arroz, manutenção de esgoto e criação e abate de gado; tendo os veterinários, juntamente com os agricultores, os magarefes, os cuidadores e pesquisadores de animais e trabalhadores do sistema de esgoto como o principal grupo de risco. Contudo, tais riscos profissionais tem diminuído desde que medidas de proteção foram implementadas (CAMPAGNOLO, 2000).

Em países desenvolvidos, as atividades recreativas, tais como natação em lagos e rios, canoagem, trilhas, caça, e cada vez mais, viagens de aventura e competições de esportes náuticos, também estão associadas à transmissão da leptospirose (HAAKE, 2002). Além disso, a enfermidade também acomete as pessoas que durante as atividades diárias mantêm contato com cães ou outros animais domésticos em áreas com a presença de roedores (RUSSEL, 2003). Já em países em desenvolvimento, essa doença apresenta caráter endêmico, no qual muitos casos ocorrem em associação com condições de vida em favelas urbanas, as quais possuem precárias condições de saneamento básico e favorecem a

transmissão da bactéria através da urina dos roedores que residem nos espaços peridomiciliares, principalmente em períodos de enchentes (KO, 1999; REIS, 2008).

A incidência da infecção é maior em países com temperatura elevada do que em regiões temperadas, isso se deve tanto ao longo período de sobrevivência da bactéria em ambientes quentes e úmidos, quanto a maior oportunidade para a exposição humana e animal. Em regiões temperadas, a incidência de leptospirose é sazonal com picos no verão e no outono onde a temperatura é um fator limitante para a sobrevivência da bactéria; e já nas regiões quentes, ocorre durante as estações chuvosas, pois a rápida dissecação impediria a sobrevivência do micro-organismo no ambiente (LEVETT, 2001).

Os sinais clínicos da doença são bastante variáveis; na maioria dos casos são, provavelmente, inaparentes e associados com sorovares adaptados aos hospedeiros. Podemos citar como exemplo, Canicola em cães, Bratislava em eqüinos e suínos, Hardjo em bovinos e Pomona em suínos (ANDRE-FONTAINE, 2006). Outras espécies como camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus rattus*) servem como reservatórios para os sorovares Ballum e Icterohaemorrhagiae, e Copenhageni, respectivamente. Eles geralmente não apresentam sinais, mas alojam leptospiras em seus rins, tornando-se uma importante fonte de infecção para humanos ou outros animais (BHARTI, 2003).

A leptospirose é uma doença sistêmica de humanos e animais domésticos, sendo caracterizada por febre, insuficiência renal e hepática, manifestações pulmonares e distúrbios reprodutivos. Em cães, na forma típica pode se apresentar com febre, icterícia, vômitos, diarreia, coagulação intravascular disseminada, uremia causada por insuficiência renal, hemorragias e morte; além de quatro síndromes identificadas: ictericas, hemorrágicas (doença de Stuttgart) urêmicas e reprodutivas (aborto e filhotes prematuros ou fracos) (BOLIN, 1996). Em outros animais, tais como: bovinos e suínos, sinais da leptospirose incluem problemas reprodutivos, aborto, natimortos, mumificação fetal, leitões ou bezerros fracos e agalaxia. Uma manifestação crônica da leptospirose é comumente vista em equinos, como por exemplo a uveíte recorrente, que porém não é exclusiva desta espécie, podendo também ser visto ocasionalmente em humanos (ROHRBACH, 2005).

As leptospirosas penetram no corpo através da pele desgastada ou lesionada, ou ainda pela via conjuntiva. Essa doença varia de assintomática à fatal fulminante, podendo ser confundida com outras doenças febris comuns, tais como dengue, malária, hepatite e gripe. A forma leve da doença apresenta-se como auto-limitada, caracterizada por febre, mialgia, cefaléia, anorexia, náusea, vômitos e dor abdominal (ADLER, 2009). O segundo estágio da doença pode apresentar meningite e alterações oculares, sendo conhecida como leptospirose icterícia ou Síndrome de Weil, a qual é caracterizada por febre, icterícia e azotemia, raramente leva à insuficiência renal ou hepática, hemorragia ou até a morte. Porém, a terapia de suporte tem reduzido a mortalidade de 5 a 10% com esta forma da doença (LANGSTON, 2003). A Fig. 2 ilustra a cadeia epidemiológica da leptospirose, destacando as principais manifestações clínicas da enfermidade em humanos.

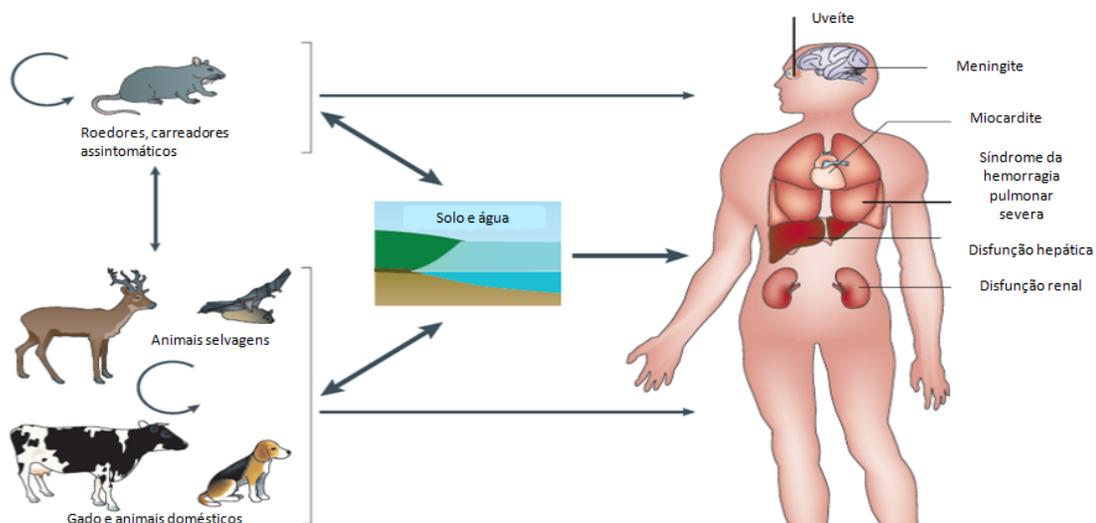


Figura 2: Ciclo de infecção da leptospirose e manifestações clínicas em humanos.
Fonte: KO, 2009

A fase crônica da infecção é caracterizada pela presença de anticorpos e de leptospiruria (WHO, 2003). Neste momento a infecção renal é observada, principalmente dentro dos túbulos contorcidos proximais, onde os micro-organismos podem sobreviver (BHARTI, 2003). Os sinais clínicos apresentados pelo hospedeiro infectado dependem da área afetada e da extensão das lesões causadas pela disseminação das leptospirosas (NALLY, 2006).

As vacinas inativadas e atenuadas têm sido relatadas por mais de 50 anos. Algumas vacinas inativadas ou atenuadas de leptospirose foram testados com sucesso em bovinos e cães. Apesar dos esforços de muitos grupos de pesquisa em todo o mundo, atualmente não há vacinas para uma eficiente prevenção de leptospirose em humanos (THONGBOONKERD, 2008).

As vacinas atualmente disponíveis são bacterinas (célula inteira morta) e direcionam a resposta imune principalmente contra o LPS. Estas bacterinas não fornecem proteção cruzada contra os diferentes sorovares de leptospiras patogênicas (BHARTI, 2003). Desta forma, o desenvolvimento de uma vacina eficiente contra leptospirose, com imunoproteção cruzada contra diferentes sorovares, permanece um desafio, e por isso, os esforços para o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra leptospirose (MATSUNAGA, 2002).

3 METODOLOGIA

3

3.1. Cultivo das leptospiiras

As leptospiiras foram cultivadas em meio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Difco-EUA) adicionado de 10% de suplemento comercial (Difco-EUA), à 30 °C. A concentração das leptospiiras para o experimento foi determinada através da contagem na câmara de Petroff-Hausser (Fisher Scientific) em microscopia de campo escuro (FAINE, 1999).

A cepa 4E de *L. borgpetersenii* sorogrupo Ballum foi isolada de um camundongo (*Mus musculus*) capturado em uma residência nas proximidades do campus da UFPel (SILVA, 2010). Esta cepa foi passada duas vezes em hamster e um lote de alíquotas foi estocado a -70 °C. Antes de usar, alíquotas foram descongeladas e passadas cinco vezes em meio líquido, através de repiques semanais. No momento do experimento, as diluições seriadas foram preparadas em meio líquido EMJH, partindo-se de 10^8 células.mL⁻¹, até a obtenção das diluições contendo 10^4 a 10^0 células.mL⁻¹, escolhidas para o experimento, de acordo com Silva e colaboradores em 2008 (SILVA, 2008)(Anexo 1).

3.2. Hamsters

Para a execução do experimento foram usados hamsters (*Mesocricetus auratus*) do Biotério Central/UFPel. Visando a manutenção da saúde e bem-estar dos animais, as situações de estresse foram minimizadas ao máximo. Para isso, os animais foram tratados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação

Animal, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA/SBCAL). Este trabalho faz parte de um projeto que foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPel, processo nº 23110.004657/2010-84, o qual visa a construção e a avaliação de vacinas contra a leptospirose. Além disso, o laboratório de Biologia Molecular (CDTec) possui Certificado de Qualidade em Biossegurança nº 0081/98.

Todos os animais foram mantidos em microisoladores com as dimensões de 49x34x16 cm, totalizando 1.666 cm² (277 cm²), acima do espaço recomendado no protocolo de Bem-Estar de hamster (COBEA). Os microisoladores com os animais foram alojados em estantes ventiladas com umidade e ventilação controladas. O programa de luz seguiu o recomendado, não sendo ofertado menos que oito horas de escuro por dia. O fornecimento do alimento foi na forma de ração peletizada na própria grade da gaiola, num total de 8-12 g/hamster. As trocas das caixas com as camas de maravalha foram realizadas durante três vezes por semana.

3.3. Experimentos de Dose letal 50% (DL50)

Quarenta hamsters com nove semanas de idade, pareados por sexo, foram inoculados através da via intraperitoneal com as concentrações de 10⁴ a 10⁰ bactérias. Os hamsters foram inoculados intraperitonealmente com 1 mL de cada uma das diluições. Durante o intervalo de tempo entre o aparecimento dos sintomas e o óbito, todos os animais foram monitorados para a avaliação clínica, pelo menos 2 vezes por dia depois do desafio. Animais apresentando baixa na atividade, evidência de hemorragia externa, desidratação, pêlo eriçado, perda de peso e isolamento foram eutanaziados e os rins foram removidos e cultivados a 29 °C em meio líquido EMJH. Animais que sobreviveram a infecção aguda foram eutanaziados no vigésimo quinto dia após o desafio para a coleta dos tecidos a fim de determinar infecções subletais. Depois disso, a DL50 foi calculada pela fórmula de Reed e Muench (1938).

3.4. Amostras Teciduais

Amostras de rins, pulmões e fígado de dois hamsters sadios (animais utilizados como controle) e dos 40 hamsters de cada uma das diluições (doentes e sobreviventes eutanasiados), foram removidas e colocadas em formol tamponado, para a conservação do material histológico imediatamente após a sua remoção, permanendo no formol por no máximo 24 horas. Em colaboração com o Departamento de Patologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, os fragmentos dos órgãos foram fixados em blocos de parafina. Posteriormente, os blocos foram cortados em secções de tecido de 3-4 μm e colocados em lâminas previamente silanizadas.

3.5. Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE)

A técnica de coloração histopatológica utilizando HE foi desenvolvida em parceria com o Departamento de Patologia da Faculdade de Veterinária da UFPel. As soluções utilizadas estão presentes no anexo 2. A técnica baseou-se num protocolo para realização da coloração, no qual o primeiro passo foi desparafinizar o material histológico com passagens em álcool e xilol, seguido por uma lavagem de 5 minutos em água corrente, após corou-se o tecido com hematoxilina por aproximadamente 2 minutos seguido por mais uma lavagem de 10 minutos, sendo depois corado com eosina por um minuto e após passar por água acética a 1% o corte histológico foi submetido a passagens em álcool absoluto e xilol, por fim a lâmina foi montada em bálsamo do Canadá, para a posterior visualização em microscópio.

4 RESULTADOS

Após a infecção, os animais foram observados diariamente nos períodos da manhã e da tarde para a análise dos sinais da doença, durante um período de 25 dias. Os animais mortos e os moribundos que foram eutanaziados dos grupos de infecção foram necropsiados, e os pulmões, rins e fígados foram retirados para análise microscópica.

Os primeiros sinais clínicos ocorreram 4 dias após a inoculação (d.p.i), evidenciando-se uma diminuição na ingestão de comida e água pelos animais inoculados com as diluições 10^4 e 10^3 . No dia 5, os animais das diluições 10^4 e 10^3 já apresentavam sinais de perda de peso e letargia, enquanto que os animais das diluições 10^2 e 10^1 apresentavam os mesmos sinais que caracterizaram o início da doença nos grupos de maior concentração da bactéria.

No dia 6 e no dia 7, observou-se que os animais do grupo 10^4 e 10^3 apresentavam sinais de desidratação acentuada, apatia, isolamento, vocalização e tremores. Além disso, alguns animais apresentavam-se com sinais de choque hipotérmico, evidenciando uma temperatura corporal baixa durante a palpação, quando comparados com animais do grupo controle.

Enquanto isso, com o passar dos dias, os animais das demais diluições (10^2 e 10^1), apresentavam uma evolução clínica semelhante com a descrita para as diluições 10^4 e 10^3 , porém mais lenta. Os animais do grupo 10^0 não apresentaram qualquer um dos sinais evidenciados pelos grupos anteriores durante os 25 dias de experimento.

Assim, os primeiros óbitos ocorreram no oitavo dia, sendo que as fêmeas morreram entre o dia 9 e 14 após a infecção, enquanto os machos morreram 8-18 d.p.i. Na Tab. 1, pode-se verificar a distribuição dos óbitos de acordo com a diluição e o sexo dos animais.

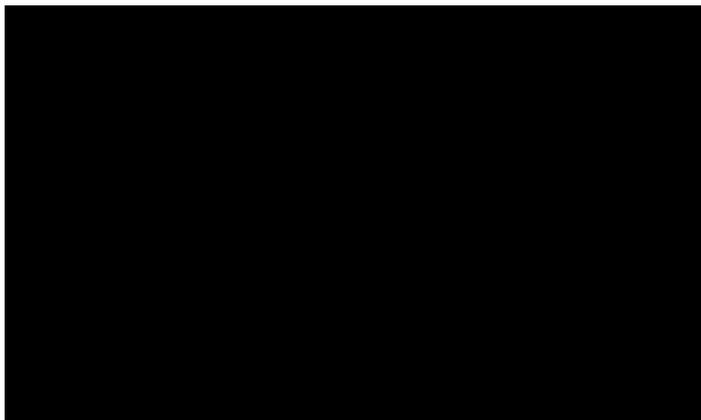
Tabela 1. Frequência e dias para óbito dos hamsters de acordo com a diluição e o sexo.

Concentração	Sexo	Dias para óbito	Letalidade(%)
10 ⁴	M	8,8,8,10	100
	F	9,9,10,11	100
10 ³	M	9,9,9,10	100
	F	9,9,9,12	100
10 ²	M	10,10,10,11	100
	F	10,11,12,13	100
10 ¹	M	11,12,14,18	100
	F	12,12,14	75
10 ⁰	M	-	0
	F	-	0

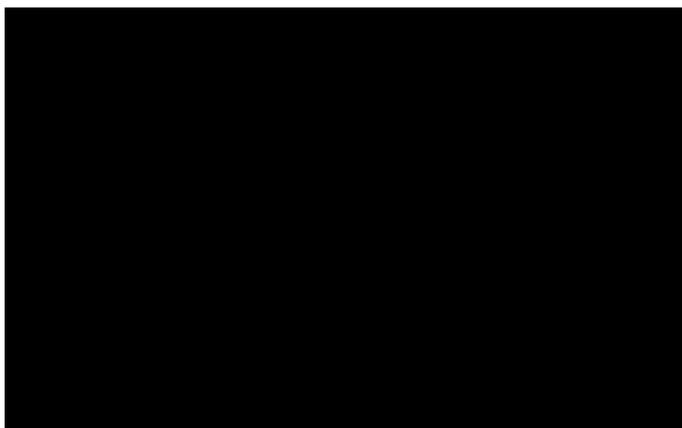
Nesse estudo, a cepa 4E de *L. borgpetersenii* produziu infecção letal em hamsters machos e fêmeas. Contudo, nove de 40 (22,5%) sobreviveram até o dia 25 pós-desafio. Assim, a DL50, que foi calculada utilizando-se a fórmula de Reed e Muench (1938), revelou uma dose de 6,81E+00, 4,22E+00 e 5,18E+00, para fêmeas, machos e geral, respectivamente, ou seja, inferior a 8 leptospiaras.

As doses de 10⁴ a 10¹ foram uniformemente letais, exceto uma única fêmea que recebeu a dose de 10¹ leptospiaras sobreviveu até o final do experimento. Todos os animais do grupo 10⁰ sobreviveram depois de 25 d.p.i. e não apresentaram alterações clínicas. Dessa forma, a variação entre dias para óbito e doses pode ser evidenciada nas curvas de sobrevivência para fêmeas, machos e geral (Fig. 3).

(A)



(B)



(C)

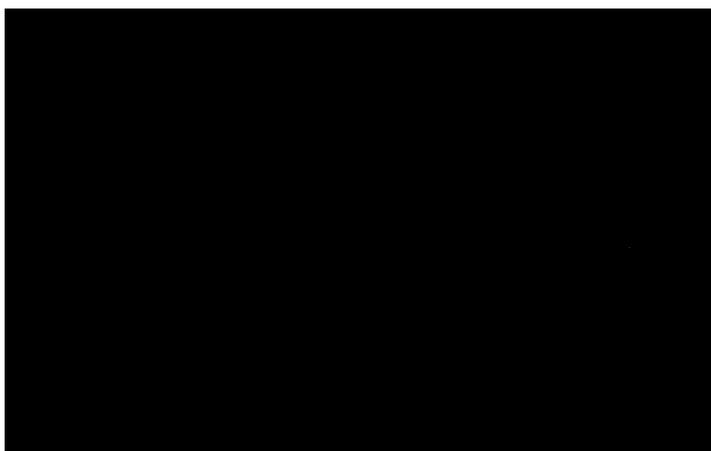


Figura 3. Curvas de sobrevivência dos animais no experimento, de acordo com cada uma das diluições do antígeno e os dias de óbito. (A) Geral; (B) fêmeas; e (C) machos.

Durante a necropsia evidenciou-se lesões macroscópicas em graus variáveis entre os animais infectados com diferentes doses, tais como icterícia, hemorragia pulmonar e congestão de órgãos como rins e intestinos (Fig. 4).

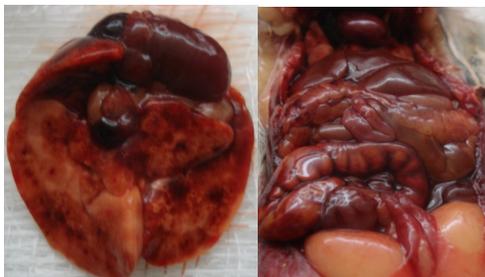


Figura 4. Achados macroscópicos representativos, em animais mortos e moribundos, com hemorragia pulmonar e icterícia leve e congestão de órgãos abdominais.

Com a utilização da técnica de coloração com HE, pode-se evidenciar que os animais inoculados com diferentes diluições do antígeno durante o experimento, apresentaram lesões em graus que variaram de discretas a severas nos órgãos analisados.

As lesões histopatológicas detectadas nos hamsters inoculados também foram dependentes do inóculo. Na Fig. 5, é possível observar a descrição de algumas dessas principais lesões presentes nos tecidos dos órgãos-alvo (rins, fígado e pulmão) de acordo com a diluição da bactéria e o sexo do animal. Já no Apêndice 1, pode-se verificar a análise histopatológica realizada em todos animais do experimento.

Como principais achados, os rins apresentaram graus em níveis moderados a grave de congestão e hemorragias; glomerulopatia com atrofia e deposição de células, incluindo eosinófilos e hemácias. Além disso, evidenciou-se degeneração tubular moderada a grave, além de necrose, presença de cilindros hialinos e vasculização. Os fígados também apresentaram congestão e com hemorragia. Em alguns animais, houve uma perda do arranjo estrutural dos cordões de hepatócitos, e mostrou uma leucocitose, principalmente neutrófilos e linfócitos, além de algumas células mononucleares e neutrófilos nas áreas do portal. Todos os grupos tiveram hemorragia microscópica nos pulmões, variando de grau leve a grave, com um aumento do número de neutrófilos nos capilares.

Análise Histopatológica	10 ⁰		10 ¹		10 ²		10 ³		10 ⁴	
Sexo	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Óbitos	0/4	0/4	4/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
Rim										
Sem alterações de significado patológico	1/4	3/4								
Congestão e hemorragia										
Discreta (+)										
Moderada (++)	3/4		3/4	4/4	3/4	4/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Severa (+++)			1/4		1/4		3/4	3/4	3/4	2/4
Moderado Infiltrado de células mononucleadas	3/4		3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4
Lesão praticamente difusa em todo o corte histológico	3/4		3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4
Vacuolização das células epiteliais de alguns túbulos renais	3/4		3/4	3/4	3/4	3/4	1/4		1/4	1/4
Degeneração e necrose tubular										
Discreta (+)										
Moderada (++)			1/4	3/4	3/4	3/4		1/4	1/4	1/4
Severa (+++)			2/4		1/4	1/4	4/4	3/4	3/4	2/4
Cilindros hialinos acometendo túbulos			3/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	3/4
Glomérulos com presença de conteúdo eosinofílico e hemácias			2/4	1/4						
Glomérulos atróficos			1/4	1/4	4/4	3/4	4/4	3/4	3/4	3/4
Fígado										
Congestão e hemorragia										
Discreta (+)	3/4	3/4	3/4	2/4	2/4	1/4			4/4	2/4
Moderada (++)	1/4		1/4	1/4	2/4	3/4	4/4	4/4		2/4
Severa (+++)				1/4						
Degeneração difusamente	4/4	3/4		1/4						
Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho	3/4	3/4	4/4	3/4	3/4	4/4	4/4	1/4	1/4	2/4
Área focal de hiperplasia linfóide	1/4			2/4	2/4					
Degeneração e necrose de hepatócitos			4/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
Infiltrado misto de macrófagos			4/4	3/4	4/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4
Linfócitos e neutrófilos (perivascular)			4/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4
Hepatócitos fora do padrão de cordões					1/4					
Folículo linfóide hiperplásico no espaço porta									1/4	
Pulmões										
Edema, Congestão e hemorragia										
Discreta (+)	0/4	1/4	1/4	2/4	1/4		1/4		2/4	3/4
Moderada (++)	3/4	0/4	2/4	2/4	2/4	2/4	1/4	3/4	1/4	
Severa (+++)	0/4	0/4	1/4	0/4	1/4	2/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Sem alterações de significado patológico	1/4	2/4	0/4	0/4						
Lesão vascular com proliferação de fibroblastos ao redor do vaso					3/4	3/4			1/4	1/4
Severa hemorragia e infiltrado (vasos)					1/4	1/4	1/4		1/4	1/4
Lesão vascular com presença de fibrina no interior de alvéolos							1/4			
Material autolizado	0/4	1/4	0/4	0/4			1/4			

Figura 5: Análise histopatológica através da coloração de HE, de acordo com a diluição da bactéria.

5 DISCUSSÃO

Ensaio de caracterização de virulência e determinação da DL50 são de grande importância para estudos sobre a patogênese da leptospirose, e especialmente para os ensaios de vacinas. Há um grande anseio da comunidade científica em desenvolver vacinas contra a leptospirose com proteção cruzada, que podem aposentar as bacterinas (BRANGER, 2005; SONRIER, 2000; SEIXAS, 2007). Para avaliar a proteção cruzada, cepas com testes desafios padronizados, de diferentes espécies e sorotipos de *Leptospira* são necessárias, e poucas estão disponíveis (SUEPAUL, 2010; FAISAL, 2008; CHANG, 2007; PALANIAPPAN, 2006). Este trabalho tenta preencher essa lacuna descrevendo a patogenia e a DL50 de um novo isolado de *L. borgpetersenii* sorogrupo Ballum. Além disso, descrevendo novas constatações para a dinâmica da patogênese da doença em diferentes inóculos.

A reprodução experimental da leptospirose foi realizada com sucesso em modelo animal usando a cepa 4E. Além disso, foi descrita uma padronização de teste desafio com dose letal (DL) para esta cepa. Em 2007, Silva e colaboradores desenvolveram um estudo semelhante, usando diferentes cepas, o que permitiu a realização de vários estudos, principalmente para avaliação de novas vacinas (SILVA, 2007; SEIXAS, 2007; FÉLIX, 2009). Este trabalho permite o desenvolvimento de estudos relacionados a testes de vacina com proteção homóloga e heteróloga bem como estudos comparados da patogênese e virulência de *Leptospira*.

No presente trabalho, obteve-se uma DL50 de 5,18 leptospiros para *L. borgpetersenii* sorogrupo Ballum. A virulência desta cepa, por apresentar uma baixa dose letal se assemelha à de *L. interrogans* sorovar canicola cepa Kito (2,7 leptospiros) e *L. noguchi* sorovar Autumnalis cepa Bonito (3 leptospiros) (SILVA, 2008). A DL50

para *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130 (amplamente utilizada em estudos de biologia molecular e testes de vacinas) é de aproximadamente 80 leptospiras (SEIXAS, SILVA, 2007). Cepas altamente virulentas e com baixas doses letais são desejáveis para a utilização em testes de vacinas.

A cepa 4E produziu a maioria dos sinais clínicos clássicos e patológicos da leptospirose, incluindo hemorragia pulmonar, icterícia e rins congestos escuros. Microscopicamente, foi observado nos rins, congestão, hemorragia, degeneração tubular e necrose, além de atrofia glomerular; no fígado, congestão, hemorragia, degeneração dos hepatócitos e necrose. Nos pulmões observou-se congestão e hemorragia como descrito anteriormente (KO, 2009; ADLER & MONTEZUMA, 2010). Além disso, a cepa 4E produziu hemorragia pulmonar, associada à síndrome de leptospirose pulmonar aguda, a forma mais grave da leptospirose (TREVEJO, 1998; NALLY, 2005).

Esses achados patológicos revelam novas perspectivas para a patogênese da doença quando comparadas doses altas e baixas no desafio. Os animais que foram a óbito ao final do experimento desenvolveram menos icterícia e apresentaram maior quantidade de hemorragia pulmonar macroscópica do que os animais que morreram logo após o desafio (8-9 d.p.i.). Isso pode indicar que os pulmões são colonizados mais tardiamente do que rins e fígado. Como altas doses no desafio matam antes que a colonização do pulmão seja concretizada, esses resultados fortalecem as teorias de que altas doses de leptospiras tornam o modelo experimental pobre (KO, 2009). Outros resultados dadas as peculiaridades desta cepa, foram semelhantes aos descritos por Silva e colaboradores (2007).

Este trabalho descreveu com sucesso a DL50 e patogênese de *Leptospira borgpetersenii* sorogrupo Ballum cepa 4E. O experimento de desafio aqui padronizado pode ser usado em estudos futuros, especialmente em ensaios de vacinas de proteção cruzada.

6 CONCLUSÕES

Concluimos que a cepa 4E de *L. borgpetersenii* sorogrupo Ballum reproduz em hamsters, a leptospirose grave e fatal.

As lesões encontradas nos hamsters revelam que a cepa reproduz experimentalmente a doença, com graus variáveis de manifestações clínicas e patológicas de acordo com o inóculo, assim como é encontrado na leptospirose em humanos e animais.

O resultado da padronização da DL50 desta cepa em hamster permite que ela possa ser utilizada em ensaios que visam o testar vacinas contra a leptospirose.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 4, p. 287-296, 2009.
- AREAN, V.M. Studies on the pathogenesis of leptospirosis. II. A clinicopathologic evaluation of hepatic and renal function in experimental leptospiral infections. **Laboratory Investigation**. n.11. p.:273-288, 1962.
- BADIOLA, J.; THIERMANN, A.B.; CHEVILLE, N.F.; Pathologic features of leptospirosis in hamsters caused by *Leptospira interrogans* serovars hardjo and szwajizak. **American Journal Veterinary Research**. n. 44. p. 91-99, 1983.
- BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; BOLIN, C. A.; SUMMERS, T. A.; WAGAR, E. A.; CHEVILLE, N. F.; HARTSKEERL, R. A.; HAAKE, D. A. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. **Infection and Immunity**. n. 67. p.853-861, 1999.
- BHARTI, A.R.; NALLY, J.E.; RICALDI, J.N.; MATTHIAS, M.A.; DIAZ, M.M.; LOVETT, M.A.; LEVETT, P.N.; VINETZ, J.M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757 – 771, 2003.
- BOLIN, C. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animals)**, v. 11, p. 166–171, 1996.
- BRANGER, C.; CHATRENET, B.; GAUVRIT, A.; AVIAT, F.; AUBERT, A.; BACH, J. M.; ANDRÉ-FONTAINE, G. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infection and Immunity**, v.73, n.7, p. 4062-4069, 2005.
- BRENNER, D.J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K.R.; STEIGERWALT, A.G.; ROGERS, F.C.; R.S. WEYANT. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 839–858, 1999.

BRITO, T; FREYMÜLLER, E; HOSHINO, S; PENNA, D.O. Pathology of the kidney and liver in the experimental leptospirosis of the guinea-pig. A light and electron microscopy study. **Virchows Archives Pathology Anatomy Physiology Clinical Medicine**. n.341. p. 64-78, 1966.

CAMPAGNOLO, E.R.; WARWICK, M.C.; MARX, H.L.; COWART, R.P.; DONNELL, H.D.; BAJANI, M.D.; BRAGG, S.L.; ESTEBAN, J.E.; ALT, D.P.; TAPPERO, J.W.; BOLIN, C.A.; ASHFORD, D.A. Analysis of the 1998 outbreak of leptospirosis in humans exposed to infected swine. **Public Veterinary Medicine: Public Health**, v. 216, n. 5, p. 676-682, 2000.

CHANG, Y. F.; CHEN, C. S.; PALANIAPPAN, R. U.; HE, H.; MCDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; YAN, W.; FAISAL, S. M.; PAN, M. J.; CHANG, C. F. Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. **Vaccine**, v. 25, n.48, p. 8190-8197, 2007.

CHAPMAN, A.J.; FAINE, S.; ADLER, B. Antigens recognized by the human immune response to vaccination with a bivalent hardjo/pomona leptospiral vaccine. **FEMS Microbiology and Immunology**, v. 2, p. 111-118, 1990.

FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. Leptospira and Leptospirosis. **MediSci: Melbourne**, Australia, p. 272., 1999.

FAISAL, S.M.; YAN, W.; CHEN, C.; PALANIAPPAN, R.U.M.; MCDONOUGH, S.P.; CHANG, Y. Evaluation of protective immunity of Leptospira immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine**, v. 26, p. 277-287, 2008.

FELIX, S.R.; SILVA, É.F.; JOUGLARD, S.D.D.; HARTMANN, D.M.; GRASSMANN, A.A.; DELLAGOSTIN, O.A. Leptospirosis Vaccine: Search for Subunit Candidates. **Procedia in Vaccinology**, v. 1, p. 110-114, 2009.

GENEVIÈVE ANDRÉ- FONTAINE, Canine leptospirosis-Do we have a problem? **Veterinary Microbiology**, v. 117, p.19-24, 2006.

GOUVEIA, E.L.; METCALFE, J.; CARVALHO, A.L.; AIRES, T.S.; VILLASBOAS-BISNETO, J.C.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A.C.; SALGADO, K.; REIS, M.G.; KO, A.I.. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infection Disease**. n.14, p.505-508, 2008.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the Leptospiral Outer Membrane and Description of Three Novel Leptospiral Membrane Proteins. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4936-4945, 2002.

KLAASEN, H.L.B.M.; MOLKENBOER, M.J.C.H.; VRIJENHOEK, M.P.; KAASHOEK, M.J. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. **Veterinary Microbiology**, v. 95, p. 121-132, 2003.

KO, A. I.; GALVÃO, R. M.; RIBEIRO DOURADO, C. M.; JOHNSON JR, W. D.; RILEY, L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, v. 354, p. 820—825, 1999.

KO, A.I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Review Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736-747, 2009.

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

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiological Review**, v. 14, p. 296-326, 2001.

LI, C.; MOTALEB, M. A.; SAL, M.; GOLDSTEIN, S.F.;CHARON, N. Gyration, rotations, periplasmic flagella: the biology of spirochete motility. **Jornal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 2, p. 345–354, 2000.

MATSUNAGA, J.; YOUNG, T. A.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; BOLIN, C. A.; HAAKE, D. A. Novel 45-Kilodalton Leptospiral Protein That Is Processed to a 31-Kilodalton Growth-Phase-Regulated Peripheral Membrane Protein. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 323-334, 2002.

MATTHIAS, M. A.; RICALDI, J.N.; CESPEDES, M.; DIAZ, M.M.; GALLOWAY, R.L.; SAITO, M.; STEIGERWALT, A.G.; PATRA, K.P.; ORE, C.V.; GOTUZZO, E.; GILMAN, R.H.; LEVETT, P.N.; VINETZ, J.M. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique Leptospira associated with a Rattus species reservoir in the peruvian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, p. 213, 2008.

MILLER, N.G.; ALLEN, J.E.; WILSON, R.B. The pathogenesis of hemorrhage in the lung of the hamster during acute leptospirosis. **Medical Microbiology and Immunology**. v, 160, p. 269-278, 1974.

NALLY, J. E.; WHITELEGGE, J. P.; BASSILIAN, S.; BLANCO, D. R.; LOVETT, M. A. Characterization of the outer membrane proteome of Leptospira interrogans expressed during acute lethal infection. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 2, p. 766-773, 2005.

NALLY, J. E.; WHITELEGGE, J. P.; BASSILIAN, S.; BLANCO, D. R.; LOVETT, M. A. Characterization of the outer membrane proteome of Leptospira interrogans expressed during acute lethal infection. **Infection and Immunity**, v. 75, n.2, p. 766-773, 2007.

PALANIAPPAN, R. U.; MCDONOUGH, S. P.; DIVERS, T. J.; CHEN, C. S.; PAN, M. J.; MATSUMOTO, M.; CHANG, Y. F. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against Leptospira interrogans serovar Pomona infection. **Infection and Immunity**, v. 74, n.3, p. 1745-1750, 2006.

REED, L.J.; MUENCH, H.A. Simple method of determining fifty percent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v. 27, p.494–497, 1938.

REIS, R.B.; RIBEIRO, G.S.; FELZEMBURGH, R.D.M.; SANTANA, F.S.; MOHR, S.; MELENDEZ, A.X.T.O.; QUEIROZ, A., SANTOS, A.C., RAVINES, R.R., TASSINARI, W.S.; CARVALHO, M.S.; REIS, M.G., KO, A.I. Impact of Environment and Social radiant on *Leptospira* Infection in Urban Slums. **PLoS Neglected. Tropical Diseases**, v. 2, p. 1-10, 2008.

ROHRBACH, B.; WARD, D.; HENDRIX, D.; CAWRSE-FOSS, M.; MOYERS, T.. Effect of vaccination against leptospirosis on the frequency, days to recurrence and progression of disease in horses with equine recurrent uveitis. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, 2005.

RUSSELL, K.L.; GONZALEZ, M.A., WATTS, D.M.; LAGOS-FIGUEROA, R.C; MARIANELA, G.C.; GONZALEZ, J.E; MORON, C.; TESH, R.B.; VINETZ, J.M. An outbreak of leptospirosis among peruvian military recruits. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n.1, p. 53–57, 2003.

SANGER, V.L.; HAMDY, A.H.; FIZETTE, W.B.; BOHL, E.H.; FERGUSON, L.C. *Leptospira pomona* infection in hamsters. **Cornell Veterinary**. n. 51. p. 489-498, 1961.

SEIJO, A.; COTO, H.; SAN JUAN, J.; VIDELA, J.; DEODATO, B.; CERNIGOI, B.; MESSINA, O.G.; COLLIA, O.; BASSADONI, D.; SCHRIBU, R.; OLENCHUK, A.; MAZZONELLI, G.D.; PARMA, A. Lethal Leptospiral. Pulmonary Hemorrhage: An Emerging Disease in Buenos Aires, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 104-105, 2002.

SEIXAS, F. K.; DA SILVA, E. F.; HARTWIG, D. D.; CERQUEIRA, G. M.; AMARAL, M.; FAGUNDES, M. Q.; DOSSA, R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **Vaccine**, v. 26, n.1, p. 88-95, 2007.

SILVA, É.F.; MEDEIROS, M.A.; MCBRIDE, A.J.A.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G.S.; RAMOS, J.G.R.; SANTOS, C.S.; KO, A.I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v.25, n.33, p. 6277-6286, 2007.

SILVA, É.F.; SANTOS, C.S.; ATHANAZIO, D.A.; SEYFFERT, N.; SEIXAS, F.K.; CERQUEIRA, G.M.; FAGUNDES, M.Q.; BROD, C.S.; REIS, M.G.; DELLAGOSTIN, O.A.; KO, A.I. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. **Vaccine**, v.26, n.31, p. 3892-3896. 2008.

SILVA, E.F.; FELIX, S.R.; CERQUEIRA, G.M.; FAGUNDES, M.Q.; NETO, A.C.P.S.; GRASSMANN, A.A.; AMARAL, M.G.; GALLINA, T.; DELLAGOSTIN, O.A. Preliminary Characterization of *Mus musculus*-Derived Pathogenic Strains of *Leptospira borgpetersenii* Serogroup Ballum in a Hamster Model. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. n. 83. p. 336-7, 2010.

SLACK, A.T.; SYMONDS, M.L.; DOHNT, M.F.; SMYTHE, L.D. The epidemiology of leptospirosis and the emergence of *Leptospira borgpetersenii* serovar Arborea in in

Queensland, Australia, 1998–2004. **Epidemiology Infection**, v. 134, p. 1217-1225, 2006.

SONRIER, C.; BRANGER, C.; MICHEL, V.; RUVOEN-CLOUET, N.; GANIERE, J. P.; ANDRE-FONTAINE, G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. **Vaccine**, v. 19. p. 86-94, 2000.

SUEPAUL, S.M.; CARRINGTON, C.V.; CAMPBELL, M.; BORDE, G.; ADESIYUN, A.A. Study on the efficacy of *Leptospira* vaccines developed from serovars isolated from Trinidad and comparison with commercial vaccines using a hamster model. **Vaccine**, v. 28, p. 5421-5426, 2010.

TREVEJO, R.T.; RIGAU-PÉREZ, J.G.; ASHFORD, D.A.; MCCLURE, E.M.; JARQUÍN-GONZÁLEZ, C.; AMADOR, J.J.; DE LOS REYES, J.O.; GONZALEZ, A.; ZAKI, S.R.; SHIEH, W.J.; MCLEAN, R.G.; NASCI, R.S.; WEYANT, R.S.; BOLIN, C.A.; BRAGG, S.L.; PERKINS, B.A.; SPIEGEL, R.A. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua 1995. **Jornal of Infection Disease**, v. 178, p.1457-1463, 1998.

WANG, Z.; JIN, L.; WEGRZYN, A. Leptospirosis vaccines. **Microbial Cell Factories**, v. 6, p. 39, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leptospirosis worldwide, 1999. **Weekly Epidemiology Records**, n. 74, p. 237–242, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2003.

YASUDA, P.H.; STEIGERWALT, A.G.; SULZER, K.R.; KAUFMANN, A.F.; ROGERS, F.; BRENNER, D.J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new leptospira species. **International Journal of Systematic Bacteriology** v. 37, p. 407-415, 1987.

THONGBOONKERD, V. Proteomics in leptospirosis research: towards molecular diagnostics and vaccine development. **Expert Review of Molecular Diagnostic**. v. 8, p. 53-61, 2008.

Apêndice

Dados brutos sobre os achados macro e microscópicos do órgãos dos animais inoculados com diferentes concentrações do antígeno.

ANIMAL	ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS
105F08AE1	<p>Macroscópicas Pulmões: Sem hemorragia pulmonar (HP) Fígado: Icterícia ++ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões</u>: pequena área focal de edema e congestão com discreto infiltrado de células polimorfonucleadas. <u>Fígado</u>: congestão e hemorragia difusa, degeneração (vacuolização dos hepatócitos) e necrose de vários cordões de hepatócitos. <u>Rins</u>: degeneração e necrose tubular moderada a severa, congestão e hemorragia, moderado infiltrado de células mononucleadas.</p>
105F08BE1	<p>Macroscópicas Pulmões: HP +++ Fígado: Icterícia +++ Rins: Escuros, muito desidratados</p> <p><u>Pulmões</u>: pequena área focal de edema e congestão com discreto infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado</u>: congestão e hemorragia difusa, degeneração (vacuolização dos hepatócitos) e necrose de vários cordões de hepatócitos, infiltrado misto de macrófagos e linfócitos. <u>Rins</u>: degeneração e necrose tubular moderada a severa, congestão e hemorragia severa, moderado infiltrado de células mononucleadas.</p>
105F08CE1	<p>Macroscópicas Pulmões: Sem HP Fígado: Icterícia +++ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões</u>: área focalmente extensiva com edema e congestão com moderado infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado</u>: congestão e hemorragia difusa, degeneração (vacuolização dos hepatócitos) e necrose de vários cordões de hepatócitos, infiltrado misto de macrófagos e linfócitos. Também se observou um folículo linfóide hiperplásico no espaço porta. <u>Rins</u>: degeneração e necrose tubular bem severa, congestão e hemorragia severa, moderado infiltrado de células mononucleadas; lesão praticamente difusa em todo o corte histológico.</p>
105M08AE1	Macroscópicas

	<p>Pulmões HP++, Fígado: Icterícia ++ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> área focalmente extensiva a difusa de edema e congestão com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado:</u> congestão e hemorragia discreta, degeneração (vacuolização dos hepatócitos + discreta) e necrose de alguns de hepatócitos, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. <u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular bem severa, congestão e hemorragia severa, moderado infiltrado de células mononucleadas; lesão praticamente difusa em todo o corte histológico.</p>
104M08AE1	<p>Macroscópicas Pulmões HP+++, Fígado: Icterícia +++ Rins: Escuros, muito desidratados</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> área focalmente extensiva de edema e congestão com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado:</u> congestão e hemorragia discreta, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de alguns de hepatócitos, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. <u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular bem severa, congestão e hemorragia severa, moderado infiltrado de células</p>
104M08BE1	<p>Macroscópicas Pulmões Sem HP Fígado: Icterícia ++ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> edema e congestão difuso com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado:</u> congestão e hemorragia discreta, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de alguns de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. <u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular bem severa, congestão e hemorragia severa, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; presença de cilindros hialinos, lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; alguns glomérulos atroficos.</p>
104M08CE1	<p>Macroscópicas Pulmões HP++,</p>

	<p>Fígado: Icterícia +++ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> área focalmente extensiva com edema e congestão e hemorragia com moderado infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado:</u> congestão e hemorragia difusa discreta, degeneração (vacuolização do citoplasma dos hepatócitos, alguns com núcleo bastante aumentado) e necrose de vários cordões de hepatócitos, infiltrado misto de macrófagos e linfócitos. Também se observou um folículo linfóide hiperplásico no espaço porta. <u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular bem severa, congestão e hemorragia severa, moderado infiltrado de células mononucleadas; lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; presença de cilindros hialinos.</p>
104F09AE1	<p>Macroscópicas Pulmões: Sem HP Fígado: Icterícia +++ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> edema e congestão difuso com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado:</u> congestão e hemorragia moderada, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de alguns de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos discreto principalmente perivascular. <u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular bem severa, congestão e hemorragia severa, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; presença de cilindros hialinos, lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; alguns glomérulos atroficos.</p>
104F09BE1	<p>Macroscópicas Pulmões: Sem HP Fígado: Icterícia +++ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> edema e congestão difuso discreto, com infiltrado discreto de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado:</u> congestão e hemorragia discreta a moderada, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de alguns de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos discreto principalmente perivascular. <u>Rins:</u> não tem material</p>
103F09AE1	Macroscópicas

	<p>Pulmões: Sem HP Fígado: Icterícia +++ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> edema e congestão moderado difuso com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado:</u> congestão e hemorragia moderada, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de alguns de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. <u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular bem severa, congestão e hemorragia severa, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; presença de cilindros hialinos, lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; alguns glomérulos atroficos.</p>
103F09BE1	<p>Macroscópicas Pulmões: Sem HP Fígado: Icterícia +++ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> edema e congestão moderado focalmente difuso com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado:</u> congestão e hemorragia moderada, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de alguns de hepatócitos aleatórios no parênquima, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. <u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular bem severa, congestão e hemorragia severa, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; presença de cilindros hialinos, lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; alguns glomérulos atroficos.</p>
103F09CE1	<p>Macroscópicas Pulmões: Sem HP Fígado: Icterícia +++ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> edema, congestão e hemorragia severa focalmente extensiva com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado:</u> congestão e hemorragia moderada, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de alguns de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. <u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular bem severa, congestão e hemorragia severa, moderado infiltrado de células mononucleadas</p>

	<p>lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; presença de cilindros hialinos, lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; alguns glomérulos atroficos.</p>
103M09AE1	<p>Macroscópicas Pulmões: HP+ Fígado: Icterícia + Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões</u>: edema, congestão e hemorragia moderada multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado</u>: congestão moderada, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de alguns de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho <u>Rins</u>: degeneração e necrose tubular bem severa, congestão e hemorragia severa, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; presença de cilindros hialinos acometendo grande número de túbulos; alguns glomérulos atroficos.</p>
103M09BE1	<p>Macroscópicas Pulmões: Sem HP Fígado: Icterícia + Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões</u>: edema, congestão e hemorragia discreta a moderada multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado</u>: congestão e hemorragia moderada, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho (lesão hepática mais grave que o animal anterior) <u>Rins</u>: degeneração e necrose tubular bem severa, congestão e hemorragia severa, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; presença de cilindros hialinos acometendo grande número de túbulos; alguns glomérulos atroficos.</p>
103M09CE1	<p>Macroscópicas Pulmões: HP+++ Fígado: Icterícia ++ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões</u>: edema, congestão e hemorragia severa multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e</p>

	<p>mononucleadas principalmente no interstício; lesão vascular com presença de fibrina no interior de alvéolos. Severa hemorragia e infiltrado ao redor de vasos.</p> <p><u>Fígado:</u> congestão e hemorragia moderada, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho.</p> <p><u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular bem severa, congestão e hemorragia severa, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; presença de cilindros hialinos acometendo grande número de túbulos; alguns glomérulos atroficos.</p>
105M10BE1	<p>Macroscópicas Pulmões: HP++ Fígado: Sem icterícia Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> edema, congestão e hemorragia severa multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício; lesão vascular com proliferação de fibroblastos ao redor dando aspecto edematoso ao redor do vaso. Severa hemorragia e infiltrado ao redor de vasos.</p> <p><u>Fígado:</u> congestão e hemorragia discreta, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho.</p> <p><u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular moderada a severa, congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização das células epiteliais dos túbulos renais, presença de cilindros hialinos acometendo alguns túbulos; alguns glomérulos atroficos.</p>
104M10DE1	<p>Macroscópicas Pulmões: HP++ Fígado: Icterícia + Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> edema, congestão e hemorragia severa multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício; lesão vascular com proliferação de fibroblastos ao redor dando aspecto edematoso ao redor do vaso. Severa hemorragia e infiltrado ao redor de vasos.</p> <p><u>Fígado:</u> congestão e hemorragia discreta, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular.</p>

	<p>Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho.</p> <p><u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular moderada a severa, congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização das células epiteliais dos túbulos renais, presença de cilindros hialinos acometendo alguns túbulos; alguns glomérulos atroficos.</p>
104F10CE1	<p>Macroscópicas</p> <p>Pulmões: HP+++</p> <p>Fígado: Icterícia ++</p> <p>Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos)</p> <p><u>Pulmões:</u> edema, congestão e hemorragia severa multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas (Neutrófilos) predominantemente, e mononucleadas principalmente no interstício; lesão vascular com proliferação de fibroblastos ao redor dando aspecto edematoso ao redor do vaso. Severa hemorragia e infiltrado ao redor de vasos.</p> <p><u>Fígado:</u> congestão e hemorragia discreta a moderada, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho.</p> <p><u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular moderada a severa, congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização das células epiteliais dos túbulos renais, presença de cilindros hialinos acometendo túbulos; alguns glomérulos atroficos, caracterizando uma necrose severa.</p>
103M10DE1	<p>Macroscópicas</p> <p>Pulmões: HP++</p> <p>Fígado: Icterícia ++</p> <p>Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos)</p> <p><u>Pulmões:</u> Não tinha material.</p> <p><u>Fígado:</u> congestão e hemorragia moderada, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho.</p> <p><u>Rins:</u> degeneração (vacuolização) e necrose tubular moderada a severa, congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização das células epiteliais dos túbulos renais, presença de cilindros hialinos acometendo túbulos; alguns glomérulos atroficos.</p>
102M10AE1	<p>Macroscópicas</p> <p>Pulmões: HP++</p>

	<p>Fígado: Icterícia + Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> edema, congestão e hemorragia discreta a moderada multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício; lesão vascular com proliferação de fibroblastos ao redor dando aspecto edematoso ao redor do vaso.</p> <p><u>Fígado:</u> congestão e hemorragia moderada, degeneração (vacuolização dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. Também chama atenção os hepatócitos estarem bem desorganizados, perdendo o padrão de cordões.</p> <p><u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular moderada a severa, congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização das células epiteliais dos túbulos renais, presença de cilindros hialinos acometendo túbulos; alguns glomérulos atroficos, caracterizando uma necrose severa.</p>
102M10BE1	<p>Macroscópicas Pulmões: HP++ Fígado: Icterícia ++ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> edema, congestão e hemorragia moderada multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício; lesão vascular com proliferação de fibroblastos ao redor dando aspecto edematoso ao redor do vaso.</p> <p><u>Fígado:</u> congestão e hemorragia discreta a moderada, degeneração (vacuolização dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Foco de hiperplasia linfóide. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho.</p> <p><u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular moderada a severa, congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização das células epiteliais dos túbulos renais, presença de cilindros hialinos acometendo túbulos; alguns glomérulos atroficos, caracterizando uma necrose severa.</p>
102M10CE1	<p>Macroscópicas Pulmões: HP++ Fígado: Icterícia + Rins: Escuros</p>

	<p>HE (Microscópicos)</p> <p><u>Pulmões:</u> congestão e hemorragia moderada multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício; lesão vascular com proliferação de fibroblastos ao redor dando aspecto edematoso ao redor do vaso.</p> <p><u>Fígado:</u> congestão e hemorragia discreta a moderada, degeneração (vacuolização dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. Áreas focais de hiperplasia linfóide.</p> <p><u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular moderada a severa, congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização das células epiteliais dos túbulos renais, presença de cilindros hialinos acometendo túbulos; alguns glomérulos atroficos, caracterizando uma necrose severa.</p>
102F10AE1	<p>Macroscópicas</p> <p>Pulmões: HP+++</p> <p>Fígado: Sem icterícia</p> <p>Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos)</p> <p><u>Pulmões:</u> edema, congestão e hemorragia severa multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício; lesão vascular com proliferação de fibroblastos ao redor dando aspecto edematoso ao redor do vaso.</p> <p><u>Fígado:</u> congestão e hemorragia moderada, degeneração (vacuolização dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado principalmente de linfócitos a nível perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho.</p> <p><u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular moderada a severa, congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização das células epiteliais dos túbulos renais, presença de cilindros hialinos acometendo túbulos; alguns glomérulos atroficos, caracterizando uma necrose severa.</p>
105M11CE1	<p>Macroscópicas</p> <p>Pulmões: HP++</p> <p>Fígado: Icterícia++</p> <p>Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos)</p> <p><u>Pulmões:</u> edema, congestão e hemorragia severa multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício; Severa hemorragia, com formação de trombos hemorrágicos.</p>

	<p><u>Fígado</u>: congestão e hemorragia severa, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, marcado infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho.</p> <p><u>Rins</u>: degeneração e necrose tubular moderada, congestão e hemorragia discreta a moderada, intenso infiltrado principalmente de células polimormonucleadas principalmente na pélvis renal (pielonefrite supurativa grave) e presença de alguns cilindros hialinos dispersos pelo parênquima.</p>
104F11DE1	<p>Macroscópicas Pulmões: HP++ Fígado: Icterícia+ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões</u>: edema, congestão e hemorragia discreta a moderada multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado</u>: congestão e hemorragia moderada a severa, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins</u>: degeneração e necrose tubular bem severa, congestão e hemorragia severa, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; presença de cilindros hialinos acometendo grande número de túbulos; alguns glomérulos atroficos.</p>
102M11DE1	<p>Macroscópicas Pulmões: HP+++ Fígado: Icterícia++ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões</u>: edema, congestão e hemorragia severa multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. Severa hemorragia ao redor de vasos. <u>Fígado</u>: congestão e hemorragia moderada, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins</u>: degeneração e necrose tubular bem severa, congestão e hemorragia severa, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; presença de cilindros hialinos acometendo grande número de túbulos; alguns glomérulos atroficos.</p>
102F11BE1	Macroscópicas

	<p>Pulmões: HP+++ Fígado: Icterícia+ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> edema, congestão e hemorragia moderada multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado:</u> congestão e hemorragia moderada, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular bem moderada a severa, congestão e hemorragia moderada a severa, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; presença de cilindros hialinos acometendo grande número de túbulos; alguns glomérulos atróficos.</p>
101M11AE1	<p>Macroscópicas Pulmões: HP+++ Fígado: Icterícia+ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> edema, congestão e hemorragia severa multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício; lesão vascular com presença de fibrina no interior de alvéolos. Severa hemorragia e infiltrado ao redor de vasos. <u>Fígado:</u> congestão e hemorragia moderada, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular bem severa, congestão e hemorragia severa, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; presença de alguns cilindros hialinos; vacuolização do epitélio tubular; alguns glomérulos contendo no interior acúmulo de conteúdo eosinofílico e com presença de hemácias.</p>
103F12DE1	<p>Macroscópicas Pulmões: HP+++ Fígado: Icterícia++ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> edema discreto, congestão e hemorragia moderada multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado:</u> congestão e hemorragia moderada, degeneração</p>

	<p>(vacuolização fina dos hepatócitos) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular ou isolados, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho.</p> <p><u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular moderada a severa, congestão e hemorragia moderada a severa, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; presença de cilindros hialinos acometendo alguns número de túbulos.</p>
102F12CE1	<p>Macroscópicas Pulmões: HP++ Fígado: Icterícia+ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> edema, congestão e hemorragia severa multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício; lesão vascular com proliferação de fibroblastos ao redor dando aspecto edematoso ao redor do vaso. Severa hemorragia e infiltrado ao redor de vasos. <u>Fígado:</u> congestão e hemorragia moderada, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular moderada a severa, congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização das células epiteliais dos túbulos renais, presença de cilindros hialinos acometendo grande numero de túbulos.</p>
101M12BE1	<p>Macroscópicas Pulmões: HP+ Fígado: Icterícia+ Rins: Com manchas pretas</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> edema, congestão e hemorragia discreta a moderada multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado:</u> congestão e hemorragia discreta, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins:</u> degeneração e necrose tubular severa, congestão e hemorragia moderada a severa, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização das células epiteliais dos túbulos renais, presença de cilindros hialinos acometendo grande numero de</p>

	túbulos; alguns glomérulos atroficos.
101F12AE1	<p>Macroscópicas Pulmões: HP++ Fígado: Icterícia+ Rins: Normais</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões</u>: edema, congestão discreta a moderada multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado</u>: congestão e hemorragia severa, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos evidentes principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins</u>: degeneração e necrose tubular moderada a severa, congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização das células epiteliais dos túbulos renais, presença de cilindros hialinos acometendo alguns túbulos.</p>
101F12BE1	<p>Macroscópicas Pulmões: HP++ Fígado: Icterícia++ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões</u>: discreto edema e congestão multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício. <u>Fígado</u>: congestão e hemorragia discreta, degeneração (vacuolização fina dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular discreto. Hiperplasia linfática no espaço porta. <u>Rins</u>: degeneração e necrose tubular moderada a severa, congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização das células epiteliais dos túbulos renais, presença de cilindros hialinos acometendo alguns túbulos; alguns glomérulos atroficos.</p>
102F13DE1	<p>Macroscópicas Pulmões: Sem HP Fígado: Icterícia+++ Rins: Escuros</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões</u>: congestão e hemorragia moderada multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício; lesão vascular com</p>

	<p>proliferação de fibroblastos ao redor dando aspecto edematoso ao redor do vaso.</p> <p><u>Fígado</u>: congestão e hemorragia discreta a moderada, degeneração (vacuolização dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho.</p> <p><u>Rins</u>: degeneração e necrose tubular severa, congestão e hemorragia moderada a severa, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização das células epiteliais dos túbulos renais, presença de cilindros hialinos acometendo túbulos; alguns glomérulos atróficos, caracterizando uma necrose severa.</p>
101M14CE1	<p>Macroscópicas</p> <p>Pulmões: HP+++</p> <p>Fígado: Icterícia+++</p> <p>Rins: Normais</p> <p>HE (Microscópicos)</p> <p><u>Pulmões</u>: congestão e hemorragia moderada multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas (neutrófilos principalmente) e mononucleadas difusamente no parênquima.</p> <p><u>Fígado</u>: congestão e hemorragia discreta a moderada, degeneração (vacuolização dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho.</p> <p><u>Rins</u>: degeneração e necrose tubular moderada a severa, congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; presença de cilindros hialinos acometendo túbulos; glomérulos com presença de conteúdo eosinofílico também no interior da capsula e em alguns apresentando também grande acúmulo de hemácias no interior.</p>
101F14CE1	<p>Macroscópicas</p> <p>Pulmões: HP+++</p> <p>Fígado: Icterícia++</p> <p>Rins: Normais</p> <p>HE (Microscópicos)</p> <p><u>Pulmões</u>: congestão e hemorragia moderada multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas e mononucleadas principalmente no interstício.</p> <p><u>Fígado</u>: congestão e hemorragia discreta a moderada, degeneração (vacuolização dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. Áreas focais de hiperplasia linfóide principalmente no espaço porta.</p> <p><u>Rins</u>: degeneração e necrose tubular moderada a severa, congestão</p>

	<p>e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; presença de cilindros hialinos acometendo túbulos; glomérulos com presença de conteúdo eosinofílico também no interior da capsula e em alguns apresentando também grande acúmulo de hemácias no interior.</p>
101M18DE1	<p>Macroscópicas Pulmões: HP+ Fígado: Icterícia+ Rins: Normais</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> congestão e hemorragia moderada multifocal a coalescente com infiltrado de células polimorfonucleadas (neutrófilos principalmente) e mononucleadas distribuídos difusamente por todo o parênquima (Pneumonia). <u>Fígado:</u> parece material estar em autólise, mas pode observar ainda congestão e hemorragia discreta a moderada, degeneração (vacuolização dos hepatócitos + discreta) e necrose de hepatócitos principalmente centrolobular, infiltrado misto de macrófagos, linfócitos e neutrófilos principalmente perivascular. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins:</u> em autólise, mas observa-se ainda congestão e hemorragia moderada; vacuolização das células epiteliais dos túbulos renais.</p>
105M25DE1	<p>Macroscópicas Pulmões: Sem HP Fígado: Sem Icterícia Rins: Inchados</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> congestão moderada multifocal a coalescente nos septos alveolares com infiltrado de células mononucleadas (macrófagos) principalmente no interstício. <u>Fígado:</u> congestão moderada, degeneração (vacuolização do citoplasma dos hepatócitos difuso) difusamente. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins:</u> congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização discreta das células epiteliais de alguns túbulos renais.</p>
105F25DE1	<p>Macroscópicas Pulmões: HP+ Fígado: Sem Icterícia Rins: Inchados</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> congestão moderada multifocal a coalescente nos septos alveolares com infiltrado de células mononucleadas (macrófagos) principalmente no interstício.</p>

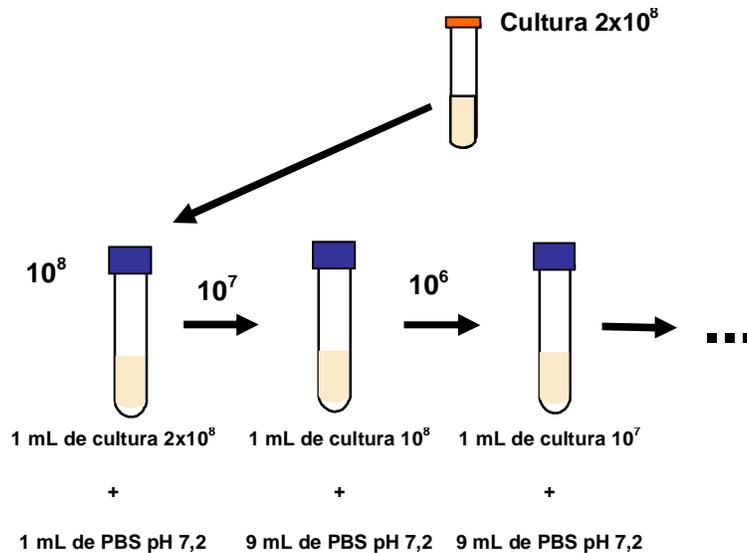
	<p><u>Fígado:</u> congestão moderada, degeneração (vacuolização do citoplasma dos hepatócitos difuso) difusamente. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho.</p> <p><u>Rins:</u> congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização discreta das células epiteliais de alguns túbulos renais.</p>
101F25DE1	<p>Macroscópicas Pulmões: Sem HP Fígado: Sem Icterícia Rins: Normais</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> congestão moderada multifocal a coalescente nos septos alveolares com infiltrado de células mononucleadas (macrófagos) principalmente no interstício. <u>Fígado:</u> congestão moderada, degeneração (vacuolização do citoplasma dos hepatócitos difuso) difusamente. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins:</u> congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização discreta das células epiteliais de alguns túbulos renais.</p>
100M25AE1	<p>Macroscópicas Pulmões: Sem HP Fígado: Sem Icterícia Rins: Normais</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> congestão moderada multifocal a coalescente nos septos alveolares com infiltrado de células mononucleadas (macrófagos) principalmente no interstício. <u>Fígado:</u> congestão moderada, degeneração (vacuolização do citoplasma dos hepatócitos difuso) difusamente. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins:</u> congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização discreta das células epiteliais de alguns túbulos renais.</p>
100M25BE1	<p>Macroscópicas Pulmões: Sem HP Fígado: Sem Icterícia Rins: Normais</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> congestão moderada multifocal a coalescente nos septos alveolares com infiltrado de células mononucleadas (macrófagos) principalmente no interstício. <u>Fígado:</u> congestão discreta a moderada, degeneração (vacuolização fina do citoplasma dos hepatócitos difuso) difusamente. Área focal de</p>

	<p>hiperplasia linfóide. <u>Rins:</u> congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização discreta das células epiteliais de alguns túbulos renais.</p>
100M25CE1	<p>Macroscópicas Pulmões: Sem HP Fígado: Sem Icterícia Rins: Normais</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> congestão moderada multifocal a coalescente nos septos alveolares com infiltrado de células mononucleadas (macrófagos) principalmente no interstício. <u>Fígado:</u> congestão discreta a moderada, degeneração (vacuolização fina do citoplasma dos hepatócitos difuso) difusamente. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins:</u> congestão e hemorragia moderada, moderado infiltrado de células mononucleadas lesão praticamente difusa em todo o corte histológico; vacuolização discreta das células epiteliais de alguns túbulos renais.</p>
100M25DE1	<p>Macroscópicas Pulmões: Sem HP Fígado: Sem Icterícia Rins: Normais</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> sem alterações de significado patológico (SASP). <u>Fígado:</u> congestão discreta a moderada, degeneração (vacuolização fina do citoplasma dos hepatócitos difuso) difusamente. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins:</u> SASP.</p>
100F25AE1	<p>Macroscópicas Pulmões: Sem HP Fígado: Sem Icterícia Rins: Normais</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões:</u> congestão e edema discreto a moderado. <u>Fígado:</u> congestão discreta a moderada, degeneração (vacuolização fina do citoplasma dos hepatócitos difuso) difusamente. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins:</u> SASP.</p>
100F25BE1	<p><u>Pulmões:</u> sem alterações de significado patológico (SASP). <u>Fígado:</u> congestão discreta a moderada, degeneração (vacuolização fina do citoplasma dos hepatócitos difuso) difusamente. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins:</u> SASP.</p>
100F25CE1	<p>Macroscópicas Pulmões: Sem HP</p>

	<p>Fígado: Sem Icterícia Rins: Normais</p> <p>HE (Microscópicos) <u>Pulmões</u>: sem alterações de significado patológico (SASP). <u>Fígado</u>: congestão discreta a moderada, degeneração (vacuolização fina do citoplasma dos hepatócitos difuso) difusamente. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins</u>: SASP.</p>
100F25DE1	Óbito provavelmente por “briga” no início do experimento
CNM 20/10:	<p>Controle negativo macho sadio HE (Microscópico) <u>Pulmões</u>: sem alterações de significado patológico (SASP). <u>Fígado</u>: congestão discreta a moderada, degeneração (vacuolização fina do citoplasma dos hepatócitos difuso) difusamente. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins</u>: SASP.</p>
CNF 20/10:	<p>Controle negativo fêmea sadia HE (Microscópico) <u>Pulmões</u>: sem alterações de significado patológico (SASP). <u>Fígado</u>: congestão discreta a moderada, degeneração (vacuolização fina do citoplasma dos hepatócitos difuso) difusamente. Alguns hepatócitos com núcleos aumentados de tamanho. <u>Rins</u>: SASP.</p>

Anexos

Anexo 1: Esquema para as diluições seriadas que serão utilizadas nos experimentos de DL₅₀.



Fonte: Silva, É. F.(2005)

Anexo 2: Soluções para a coloração de hematoxilina e eosina (H.E.)

- Hematoxilina de harris

Hematoxilina	5g
Sulfato de alumínio e potássio (alumen de potássio)	100g
Óxido amarelo de mercúrio	2,5g
Água destilada	1000ml
Álcool absoluto	50ml

- Preparo da hematoxilina

Dissolver a hematoxilina no álcool. Dissolver o alumen na água morna. Juntam-se as duas soluções adicionando-se o óxido amarelo de mercúrio; e deixar ferver em um balão volumétrico durante 5 minutos. Resfriar à temperatura ambiente e, em seguida, filtrar com papel de filtro.

- Eosina a 1%

Eosina	1g
Água destilada	100ml

- Água acética a 1%

Ácido acético glacial	1ml
Água destilada	100ml