



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

MARCELO BOECKER MUNOZ BRAZ

**O DANO ENDOTELIAL, TUBULAR E DE GLICOCÁLICE NA LESÃO RENAL
AGUDA DA LEPTOSPIROSE**

Fortaleza

2014

MARCELO BOECKER MUNOZ BRAZ

O DANO ENDOTELIAL, TUBULAR E DE GLICOCÁLICE NA LESÃO RENAL
AGUDA DA LEPTOSPIROSE

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Ciências Médicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elizabeth de Francesco Daher
Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Braga Libório

Fortaleza

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B839d Braz, Marcelo Boecker Munoz.

O Dano Endotelial, Tubular e de Glicocálice na Lesão Renal Aguda da Leptospirose /
Marcelo Boecker Munoz Braz. – 2014.

116 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2014.

Orientação: Profa. Dra. Elizabeth de Francesco Daher.

Coorientação: Prof. Dr. Alexandre Braga Libório.

1. Leptospirose. 2. Lesão Renal Aguda. 3. Molécula 1 de Adesão Intercelular.
4. Lipocalina-2. 5. Sindecana-1. I. Título.

CDD 610

MARCELO BOECKER MUNOZ BRAZ

O DANO ENDOTELIAL, TUBULAR E DE GLICOCÁLICE NA LESÃO RENAL
AGUDA DA LEPTOSPIROSE

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Ciências Médicas.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Elizabeth De Francesco Daher (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Alexandre Braga Libório
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof.^a Dr.^a Claudia Maria Costa de Oliveira
Centro Universitário Christus - UNICHRISTUS

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Elizabeth de Francesco Daher, pela sua orientação nesse projeto e pela sua importante contribuição na pesquisa da mais importante zoonose em todo o mundo. Obrigado pela oportunidade de compartilhar uma parcela de seus conhecimentos.

Ao Professor Doutor Alexandre Braga Libório por seus sábios direcionamentos, antes, durante e, desejo eu, após a conclusão do Mestrado.

Aos Professores e amigos Alice, Gdaylon e Fernanda pelo inestimável apoio nos ensaios laboratoriais realizados.

À Professora Iracema Patrício, do LACEN-CE, pelo apoio em todas as etapas desse projeto.

Ao amigo André Luiz de Oliveira Guimarães pelo trabalho e pelo apoio nos momentos de maior dificuldade.

À Direção e aos Infectologistas do Hospital São José de Doenças Infecciosas pela sua constante orientação.

À Equipe de Medicina Interna do Hospital Geral de Fortaleza (HGeF), pelas vidas salvas no seu esforço diário.

Ao meu querido filho Gabriel, minha amada esposa Clécia, meus pais, demais familiares e amigos, razões maiores da minha existência, tudo que faço é por e para vocês.

“É impossível um homem aprender aquilo que ele acha que sabe.” (Επίκτητος - Epíteto).

RESUMO

Introdução: A Leptospirose é uma doença frequente em países tropicais. O rim é um de seus principais órgãos alvo. Proteínas de membrana de *Leptospira* são capazes de causar dano endotelial *in vitro*, mas não há estudos em humanos que tenham avaliado a lesão do glicocálice endotelial e sua correlação com a lesão renal aguda (LRA). **Métodos:** Foi realizado um estudo de coorte em um surto de leptospirose entre militares. LRA foi definida de acordo com o padrão de classificação KDIGO. Foram dosados biomarcadores plasmáticos de lesão tubular renal (NGAL), lesão de glicocálice endotelial (Sindecano-1) e lesão de endotélio (ICAM-1), bem como outros parâmetros bioquímicos em todos os pacientes. Análise Linear Multivariada foi conduzida para verificar a existência de correlação entre a variação da creatinina sérica (Δ SCr) ou da NGAL com fatores independentes. **Resultados:** LRA foi diagnosticada em 14 (30,4%) pacientes. Destes, 13 apresentaram sua forma mais branda (KDIGO estágio 1). Leptospirose foi associada à níveis mais elevados de ICAM-1 (ICAM-1; $483,1 \pm 31,7$ versus $234,9 \pm 24,4$ mg/L, $P < 0,001$) e de sindecano-1 ($73,7 \pm 15,9$ versus $21,2 \pm 7,9$ ng/mL, $P < 0,001$), quando comparados a controles expostos. Pacientes com LRA associada à Leptospirose tinha níveis elevados de sindecano-1 ($112,1 \pm 45,4$ vs. $41,5 \pm 11,7$ ng/mL, $p=0,021$) e ICAM-1 ($576,9 \pm 70,4$ vs. $434,9 \pm 35,3$, $p=0,034$) do que nos casos de leptospirose sem LRA. Foi observada associação entre sindecano-1 e ICAM-1 com elevações dos níveis de creatinina sérica e NGAL. Esta associação persistiu mesmo após análise multivariada incluindo outras características associadas à LRA. **Conclusão:** Marcadores de lesão endotelial estão associados à lesão renal secundária à leptospirose.

Palavras-chave: Leptospirose. Lesão renal aguda. Disfunção endotelial.

ABSTRACT

Introduction: Leptospirosis is a common disease in tropical countries, and the kidney is one of the main target organs. Membrane proteins of *Leptospira* are capable of causing endothelial damage *in vitro*, but there have been no studies in humans evaluating endothelial glycocalyx damage in humans and its correlation with acute kidney injury (AKI). **Methods:** We performed a cohort study in an outbreak of leptospirosis among military personnel. AKI was defined in accordance to KDIGO standard. Biomarkers for tubular injury (NGAL), glycocalyx injury (Syndecan-1) and endothelial injury (ICAM-1) were measured in plasma, as well as other biochemical parameters in all patients. Multivaried linear analysis was conducted in the correlation of the difference between maximal and minimum serum creatinine (Δ SCr) or NGAL with independent factors. **Results:** AKI was diagnosed in 14 of 46 (30.4%) patients and 13 presented its mildest form (KDIGO stage 1). Leptospirosis was associated with higher levels of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; 483.1 ± 31.7 versus 234.9 ± 24.4 mg/L, $P < 0.001$) and syndecan-1 (73.7 ± 15.9 versus 21.2 ± 7.9 ng/mL, $P < 0.001$) compared with exposed controls. Patients with leptospirosis-associated AKI had increased level of syndecan-1 (112.1 ± 45.4 versus 41.5 ± 11.7 ng/mL, $P = 0.021$) and ICAM-1 (576.9 ± 70.4 versus 434.9 ± 35.3 , $P = 0.034$) compared with leptospirosis patients with no AKI. Association was verified between syndecan-1 and ICAM-1 with serum creatinine elevation and neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) levels. This association remained even after multivariate analysis including other AKI associated characteristics. **Conclusion:** Endothelial injury biomarkers are associated with leptospirosis-associated renal damage.

Keywords: Leptospirosis. Acute kidney injury. Endothelial dysfunction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fisiopatologia da lesão renal aguda na leptospirose.....	35
Figura 2 -	População do estudo.....	66
Gráfico 3 -	Dosagem de Sindecano-1 e ICAM-1 por grupos.....	73
Gráfico 4 -	Correlação Sindecano-1 e variação da Creatinina Sérica.....	74
Gráfico 5 -	Correlação Sindecano-1 e NGAL.....	74
Gráfico 6 -	Correlação entre ICAM-1 e variação da Creatinina Sérica.....	74
Gráfico 7 -	Correlação entre ICAM-1 e NGAL.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados clínicos, laboratoriais e lesão renal aguda.....	71
Tabela 2 -	Correlação entre marcadores de lesão renal e endotelial e outros parâmetros laboratoriais.....	72
Tabela 3 -	Análise Multivariada – Variáveis dependentes: Δ SCr e NGAL.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKI	Acute Kidney Injury
AKIN	Acute Kidney Injury Network
ANOVA	Analysis of Variance
AQP1	Aquaporina 1
AQP2	Aquaporina 2
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CK	Creatinoquinase
Cl	Cloro
Cr	Creatinina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ENaC	Canal Epitelial de Sódio
EUA	Estados Unidos da América
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
hs-PCR	Proteína C Reativa de Alta Sensibilidade
HUVEC	Células Endoteliais de Veias Umbilicais Humanas
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-17	Interleucina 17
ILS	Sociedade Internacional de Leptospirose
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase Induzível
JHR	Reação de Jarisch-Herxheimer
K	Potássio
LACEN	Laboratório Central do Estado
LDH	Desidrogenase Láctica
LipL32	Lipoproteína L32
LPS	Lipopolissacarídeo
LRA	Lesão Renal Aguda
MAT	Teste de Aglutinação Microscópica
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos-1

MEC	Matriz Extra Celular
Na	Sódio
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa Beta
NGAL	Lipocalina Associada à Gelatinase de Neutrófilos
NHE3	Transportador de Sódio/Hidrogênio
NIA	Nefrite Intersticial Aguda
NTA	Necrose Tubular Aguda
PCR	Proteína C Reativa
PME	Proteína de Membrana Externa
RANTES	Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Presumably Secreted
RIFLE	Risk, Injury, Failure, Loss, End-stage Renal Disease
SCr	Creatinina Sérica
TBARS	Ácido Tiobarbitúrico
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TFGe	Taxa de Filtração Glomerular Estimada
TLR	Receptor Toll-like
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Histórico.....	18
2.2	Etiologia.....	18
2.3	Epidemiologia.....	20
2.4	Patogenia.....	23
2.4.1	<i>Efeitos Diretos pela Leptospira.....</i>	24
2.4.2	<i>Proteínas de Membrana Externa (PME) e Adesinas.....</i>	24
2.4.3	<i>Produção de Toxinas.....</i>	25
2.4.4	<i>Resposta Imune.....</i>	26
2.5	Quadro Clínico.....	29
2.6	Nefropatia na Leptospirose.....	32
2.6.1	<i>Ação Nefrotóxica Direta da Leptospira.....</i>	34
2.6.2	<i>Alterações Hemodinâmicas na LRA da Leptospirose.....</i>	36
2.6.3	<i>Icterícia e a LRA da Leptospirose.....</i>	36
2.6.4	<i>Rabdomiólise e a LRA da Leptospirose.....</i>	37
2.7	Lesão Renal Aguda e Classificação KDIGO.....	37
2.8	Diagnóstico Laboratorial.....	39
2.9	Tratamento.....	42
2.9.1	<i>Terapia Antibiótica e Quimioprofilaxia</i>	42
2.9.2	<i>Corticosteróides e Diálise.....</i>	45
2.10	Biomarcador de Lesão Endotelial – ICAM-1.....	45
2.10.1	<i>ICAM-1 na Lesão Renal.....</i>	47
2.10.2	<i>ICAM-1 em Doenças Infecciosas.....</i>	48
2.11	Biomarcador de Lesão de Glicocálice – Sindecano-1	50
2.11.1	<i>Sindecano-1 na Lesão Renal.....</i>	52
2.11.2	<i>Sindecano-1 em Doenças Infecciosas.....</i>	52
2.12	Biomarcador de Lesão Tubular Renal – NGAL.....	53
2.12.1	<i>NGAL na Lesão Renal.....</i>	54
2.12.2	<i>NGAL em Doenças Infecciosas.....</i>	55
3	OBJETIVOS.....	58
4	METODOLOGIA.....	60
5	RESULTADOS.....	66
6	DISCUSSÃO.....	73
7	CONCLUSÕES.....	80
	REFERÊNCIAS.....	82
	ANEXO.....	112

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é causada por um microorganismo do gênero *Leptospira*, uma espiroqueta de ampla distribuição mundial e é considerada a zoonose de maior importância pela sua alta prevalência (LOMAR et al., 2002; BHARTI et al., 2003).

Diversos surtos foram descritos em militares profissão considerada de risco para o desenvolvimento da doença, devido à exposição ao terreno úmido no campo e pela imersão em água ou lama (AUBRY et al., 1975; CORWIN et al., 1990; BRYAN et al., 1996; KATZ et al., 1997; RUSSEL et al., 2003; HADAD et al., 2006; ILS, 2000).

Os mecanismos patogênicos incluem os efeitos diretos da *Leptospira* e os decorrentes da imunidade do hospedeiro. A leptospiremia persiste até a ativação da resposta imune do hospedeiro em até duas semanas da exposição. Ainda não foi descoberto se a evolução da doença para as formas graves depende dos efeitos diretos ou da imunidade do hospedeiro (BHARTI et al., 2003; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

A apresentação clínica da Leptospirose é bastante variável, desde uma doença subclínica até casos fatais. Sendo que 90% dos casos correspondem a uma doença febril autolimitada (LOMAR et al., 2002; LEVETT; HAAKE, 2009).

O envolvimento renal é frequente na leptospirose (44 a 67%) e esse é o diagnóstico diferencial na LRA. Pode apresentar desde anormalidades isoladas no sedimento urinário até mesmo à falência renal com necessidade de terapia substitutiva (SITPRIJA; LOSUWANRAK; KANJANABUCH, 2003).

O potencial da leptospirose em induzir inflamação vascular é conhecido há quase 40 anos, mas poucos estudos exploraram o papel do endotélio na fisiopatologia da doença (JAROONVESAMA; VIRANUVATTI; CHAROENLARP, 1975).

O biomarcador de endotélio vascular ICAM-1 tem seus níveis plasmáticos aumentados em resposta à lesão aguda do endotélio renal por diversos mecanismos, como isquemia-reperfusão (BONVENTRE; ZUK, 2004; GOLIGORSKY et al., 2010); cisplatina (KELLY et al., 1999) e mercúrio (GHIELLI et al., 2000).

Já o biomarcador Síndecano-1 é um dos principais componentes do glicocálice endotelial e a clivagem de seus domínios extracelulares libera sua forma solúvel no plasma (GÖTTE, 2003; SAVERY et al., 2013). Sua imunexpressão, liberação do glicocálice e níveis séricos aumentam em condições inflamatórias ou

que cursam com lesão do glicocálice endotelial (DAY et al., 1999; PALAIOLOGOU; DELLADETSIMA; TINIAKOS, 2013; PRINCIPI et al., 2006; ZHANG et al., 2013; BARTLETT; HAYASHIDA; PARK, 2007; VLAHU et al., 2012).

A lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) tem sua expressão induzida na defesa imune contra bactérias patogênicas e se liga a estruturas bacterianas chamadas sideróforos, impedindo a obtenção de ferro por bactérias (BORREGAARD; COWLAND, 2006; CHAN et al., 2009).

A NGAL é considerada um biomarcador de lesão tubular renal que se eleva no plasma até 48 horas antes da creatinina e se correlaciona ao seu aumento (DI GRANDE et al., 2009; MUSSAP et al., 2010).

A elevação de seus níveis plasmáticos já foi descrita nestas condições: lúpus eritematoso sistêmico, peritonites infecciosas, gravidez, doença renal crônica, anemias, neoplasias, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (MAKRIS et al., 2012; CRUZ et al., 2012, KALOUSEK; RÖSELOVÁ; OTEVRELOVÁ, 2006; LIPPI et al., 2013; RUBINSTEIN; PITASHNY; PUTTERMAN, 2008).

Poucos estudos foram realizados com estes biomarcadores de lesão renal em humanos com leptospirose. Proteínas recombinantes de leptospira ativaram células endoteliais de monocamadas de culturas de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) levando a um aumento dose dependente de ICAM-1 (VIEIRA et al., 2007; GÓMEZ et al., 2008). Um estudo comparou níveis séricos de ICAM-1 em leptospirose, tifo, dengue, febre tifóide e malária, encontrando títulos maiores na leptospirose (PARIS et al., 2008).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

A leptospirose foi descrita em 1886 por Adolf Weil, que a caracterizou como uma “doença infecciosa aguda com esplenomegalia, icterícia e nefrite” acompanhada de fenômenos hemorrágicos (LOMAR et al., 2002; LEVETT; HAAKE, 2009).

A primeira observação direta do agente etiológico foi em uma amostra renal *post mortem*, que a coloração por prata evidenciou grupos de espiroquetas nas células e lúmen dos túbulos renais. Foi denominada *Spirochaeta interrogans* por lembrar um “ponto de interrogação” (STIMSON, 1907; LEVETT; HAAKE, 2009).

Em 1915 pesquisadores japoneses e alemães estabeleceram a relação entre a espiroqueta e a doença que *Weil* descrevera a partir da demonstração simultânea de espiroquetas e anticorpos contra as mesmas (INADA; IDO, 1915; BAKER, 1948; LEVETT, 2001). O papel do rato como fonte de infecção humana foi caracterizado a seguir (IDO et al., 1917). Posteriormente, a doença foi descrita em canídeos e animais de produção (ALSTON; BROOM, 1958; LEVETT, 2001).

2.2 Etiologia

A leptospirose é causada por uma espiroqueta aeróbica obrigatória, do gênero *Leptospira*, de ampla distribuição mundial. O termo “*Leptospira*” vem do Grego *leptos* (fino) e do Latim *spira* (enrolado). Sua morfologia corresponde a um final espiral. As leptospiras medem apenas 0,1 µm em diâmetro e 6 a 20 µm no seu comprimento. As células tem extremidades em formato de pontas, das quais, no mínimo, uma é fletida em forma de “gancho”. Pelo seu reduzido diâmetro, as leptospiras são melhor visualizadas à microscopia de campo escuro (FAINE et al., 1999; LOMAR et al., 2002; LEVETT, 2007; LEVETT; HAAKE, 2009).

A sua motilidade resulta da rotação de dois filamentos axiais, localizados no espaço periplásmico (endoflagelos), que são respectivamente inseridos de forma subterminal em cada extremidade da célula estendendo-se em direção à região central. O formato assumido pelas extremidades, em espiral ou em gancho, é o que

vai determinar a direção de sua propulsão quando imersa em um meio de baixa viscosidade (SWAIN, 1957; GOLDSTEIN; CHARON, 1988).

Em meios de alta viscosidade, o movimento dos flagelos leva a leptospira a “rolar” sob a membrana externa, como um parafuso inserido em um objeto sólido, o que tem sido relacionado à sua alta capacidade de penetração tecidual (KAISER; DOETCH, 1975; TRUEBA; BOLIN; ZUERNER, 1992).

Historicamente, o gênero *Leptospira* foi classificado em duas espécies: *L. interrogans* e *L. biflexa* compostas, respectivamente, por cepas patogênicas e não patogênicas. Dentro de cada espécie, um grande número de diferentes sorovares foi identificado por anticorpos de aglutinação. A especificidade de cada sorovar é proveniente dos antígenos “O” dos lipopolissacarídeos da membrana externa (BULACH et al., 2000).

Estes sorovares ou sorotipos representam variantes da mesma espécie bacteriana que apresentam diferentes antígenos expostos na superfície, como antígenos de parede bacteriana, capsulares ou flagelares. Quando sorotipos diferentes exibem alguns antígenos em comum, são reunidos em sorogrupos (BARON et al., 1996).

O complexo *L. interrogans* é composto por mais de 250 sorovares. Pelo seu grande número, sorovares antigênicamente relacionados foram reunidos em 23 sorogrupos para simplificar a testagem sorológica (LEVETT; HAAKE, 2009; ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Atualmente, as espécies de *Leptospira* estão sendo reclassificadas em função de seu grau de similaridade genética, utilizando técnicas baseadas na identificação de DNA e no sequenciamento genético. Já existem 14 espécies nomeadas (e 4 não nomeadas), incluindo espécies patogênicas como *L. interrogans*, *L. santarosai*, *L. borgpetersenii*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. kirschneri*, *L. alexanderi*, *L. fainei*, *L. meyeri*, *Leptospira genomospecies 1*, saprófitas não-patogênicas como *L. biflexa*, *L. wolbachii*, e *Leptospira genomospecies 3, 4 e 5* e espécies de patogenicidade indeterminada como *L. inadai*, *L. broomii* e *L. licerasiae* (BRENNER et al., 1999; LEVETT; HAAKE, 2009).

2.3 Epidemiologia

A leptospirose é considerada a zoonose de maior importância global, pela sua incidência e distribuição, ocorrendo em áreas urbanas de países industrializados e em desenvolvimento e em áreas rurais de todo o mundo (LOMAR et al., 2002; BHARTI et al., 2003).

A incidência anual de leptospirose, provavelmente subestimada, é de 0,1 a 1 caso por 10^5 habitantes por ano em regiões de clima temperado e de 10-100 por 10^5 hab/ano em regiões tropicais úmidas, podendo, em surtos ou em caso de exposição de alto risco, atingir valores superiores a 100 por 10^5 hab/ano (OMS, 2003).

Os principais focos da doença são o Caribe, a América Latina, o subcontinente indiano, o sudeste asiático, a Oceania e o leste europeu. Os doze países com maior incidência são: Ilhas Seicheles, Trinidad e Tobago, Barbados, Jamaica, Costa Rica, Sri Lanka, Tailândia, El Salvador, Nova Zelândia, Uruguai, Cuba, Nicarágua. O Brasil ficou na 17ª posição, mas para alguns países endêmicos para leptospirose não existem dados para análise. Exemplos são a Índia e Indonésia, citadas na reunião da Sociedade Internacional de Leptospirose (*International Leptospirosis Society – ILS*), no ano 2000, por picos de incidência de leptospirose (ILS, 2000; PAPPAS et al., 2008).

A prevalência varia segundo os critérios utilizados: na cidade mexicana de Veracruz, com mais de 500.000 habitantes é de 4%, mas chega a 37% no pequeno município rural de Mapastepec, com 20.000 habitantes. Em Veracruz, entre as pessoas que convivem com cães, porcos, gado ou ratos, a soroprevalência sobe para 25%; e se considerarmos, apenas, o grupo etário de 25-44 anos chega a 35% (LEAL-CASTELLANOS et al., 2003; NAVARRETE-ESPINOSA et al., 2006).

Mesmo em países com baixa incidência de leptospirose, a doença é diagnosticada em turistas e atletas provenientes de regiões tropicais em temporadas chuvosas ou após atividades esportivas aquáticas (PASHKOW et al., 1981; MORTIMER, 2005; SIMON et al., 2012; VAN DE WERVE et al., 2013; YAITA et al., 2013).

Dados do Ministério da Saúde do Brasil mostram que entre 2007 e 2012 o total acumulado de casos confirmados de leptospirose foi de 22.233 com média anual de 3705 casos. É importante observar que nosso surto ocorreu em 2011, ano em que a incidência foi bem acima da média anual, chegando a 4.946 casos (BRASIL, 2014).

Um estudo de soroprevalência para Leptospirose foi realizado, no Mato Grosso do Sul, com um total de 439 amostras de sangue enviadas ao LACEN entre dezembro de 2000 e março de 2001 por suspeita de outras doenças febris agudas. Das amostras negativas para suspeita de dengue, 15% foram positivas para leptospirose, e dentre as negativas para suspeita de hepatites virais, 9% foram positivas para leptospirose (SOUZA; NOGUEIRA; PEREIRA, 2007).

A incidência de leptospirose aumenta em função dos índices pluviométricos com picos de incidência nas estações chuvosas de países tropicais. Em Trinidad e Tobago, 75% dos casos de leptospirose registrados entre 1996 e 2007 ocorreram na estação chuvosa e os homens foram 80% das vítimas (TREVEJO et al., 1998; LEVETT; HAAKE, 2009; MOHAN et al., 2009).

No Brasil, os maiores surtos desta doença se seguiram às chuvas torrenciais de verão e inundações em grandes cidades. Entre os casos registrados de leptospirose de 1998 a 2006, em São Paulo, 1.717 ocorreram no período “úmido” (semestre com maiores índices pluviométricos) contra, apenas, 773 casos no período “seco” destes anos (GONÇALVES et al., 1992; VEDOR DE PAULA, 2005; DAHER; SILVA JÚNIOR; LIBÓRIO, 2010; SOARES et al., 2010).

Sorologia positiva para leptospirose foi encontrada em 4% de 150 funcionários de abatedouros no Paraná, sugerindo seu papel como doença ocupacional em profissionais expostos ao contato direto com urina, sangue ou órgãos de animais contaminados (GONÇALVES et al., 2006).

Muitas atividades são associadas ao aumento do risco de adquirir leptospirose (ILS, 2000; COLAVITA; PAOLETTI, 2007; PAVLI; MALTEZOU, 2008), através do:

a) Contato com leite, sangue, urina, fuido amniótico, carcaças, fetos, placentas e órgãos de animais infectados ou mortos pela leptospirose (criadores, pastores, caçadores, funcionários de abatedouros e de lojas de animais de estimação, veterinários, açougueiros, inspetores de carne, trabalhadores da indústria de carne e profissionais das zoonoses);

- b) Contato próximo com animais domésticos infectados;
- c) Contato ou imersão em água doce ou lama contaminadas pela urina de animais infectados na agricultura, pesca, piscicultura, esgotos, mineração, forças armadas, lazer e atividades esportivas (caça, canoagem e triatlon);
- d) Crianças ao brincar em lama ou poças de água;
- e) Vítimas de acidentes automobilísticos ou de embarcações com imersão prolongada em água;
- f) Pessoas que preparam alimentos em condições precárias de higiene;
- g) Vilarejos inteiros podem ser expostos quando a água para consumo não é tratada.

A Leptospirose foi causa comum de doença febril aguda em militares norte-americanos no Vietnam. A doença foi caracterizada, em 150 casos, por febre, calafrios, cefaleia, mialgias e queixas gastrointestinais. Os achados mais comuns foram “dores musculares” e “conjuntivite”, presentes em 42% dos 150 indivíduos. Meningite asséptica ocorreu em nove pacientes. Oligúria e azotemia de origem renal em sete pacientes, mas nenhum necessitou de diálise. Apenas dois apresentaram icterícia, mas 40% tinham anormalidades em provas laboratoriais hepáticas. Não ocorreram mortes. O diagnóstico baseava-se em um paciente febril da área endêmica com mialgia, conjuntivite e gastroenterite. Cinquenta pacientes apresentavam apenas febre, e a infecção não seria diagnosticada sem a vigilância sorológica dos pacientes febris em áreas endêmicas (STEVEN et al., 1973).

Um surto de leptospirose acometeu militares americanos na ilha de Okinawa no Japão em 1987. Títulos de micro-aglutinação iguais ou superiores a 200 foram encontrados em jovens do sexo masculino com uma média de 22,5 anos de idade hospitalizados com sintomas compatíveis com a doença. Achados epidemiológicos revelaram dois grupos com exposição temporal e geograficamente distinta. As taxas de ataque dos contaminados por nado recreativo e treinamento para o combate foram, respectivamente, 46,7% (7 de 15) e 18,3% (15 de 82) (CORWIN et al., 1990).

Diversos surtos foram descritos em militares. Os surtos ocorreram em Israel, no Peru, no Paquistão, na Argélia, nos Estados Unidos da América e no Japão, confirmando o caráter global da zoonose (AUBRY et al., 1975; CORWIN et al., 1990; BRYAN et al., 1996; KATZ et al., 1997; ILS, 2000; RUSSEL et al., 2003; HADAD et al., 2006).

2.4 Patogenia

Leptospiras infectam o humano através de lesões na pele, membranas mucosas, conjuntivas íntegras ou pela inalação de aerossóis (LEVETT; HAAKE, 2009).

A ingestão de água contaminada foi o principal fator de risco identificado em um grande surto no triatlon de 1998 em Springfield, Illinois, EUA (MORGAN et al., 2002). Em um surto entre militares americanos ocorrido no Japão, o relato de ingestão de água foi capaz de distinguir os casos com confirmação laboratorial daqueles sem infecção. A simples imersão na água parece não ter resultado em infecção (CORWIN et al., 1990). A mucosa oral é provavelmente a porta de entrada mais significativa após a ingestão de água contaminada do que o restante do trato gastrointestinal (LEVETT; HAAKE, 2009).

A motilidade e a locomoção das leptospiras em meio viscoso são determinantes na fase inicial da infecção, que após entrar no hospedeiro disseminam-se por via hematogênica e penetram nas barreiras teciduais, incluindo o sistema nervoso central e o humor aquoso do olho (LEVETT; HAAKE, 2009).

A migração transendotelial das espiroquetas é facilitada por uma vasculite sistêmica, responsável por um amplo espectro de manifestações clínicas. Dano vascular intenso pode se seguir, levando a hemorragia pulmonar, isquemia do córtex renal, necrose do epitélio túbular renal e destruição da arquitetura hepática, resultando em icterícia e lesão hepatocelular com ou sem necrose (AREÁN, 1962).

Ainda se conhece pouco sobre a patogenia da leptospirose. Não se sabe se a evolução da doença é determinada pelos efeitos diretos da *Leptospira* ou pela resposta imune do hospedeiro. A variedade de manifestações clínicas sugere que diversos fatores contribuam para o processo infeccioso agudo e crônico (BHARTI et al., 2003).

Os mecanismos patogênicos da leptospira podem ser divididos na lesão direta causado pela *Leptospira* e nos decorrentes da resposta imune do hospedeiro. A leptospiremia se prolonga até que o hospedeiro ative a resposta imune, uma ou duas semanas após a exposição (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

Diversos fatores de virulência influenciam a patogênese da infecção e doença causadas pela *Leptospira*, incluindo toxinas como os lipopolissacarídeos (LPS), as toxinas hemolíticas, as proteínas da membrana externa (PME) e as moléculas de adesão (EVANGELISTA; COBURN, 2010).

2.4.1 Efeitos Diretos pela *Leptospira*

A membrana externa das leptospiplas contém diversos componentes antigênicos incluindo lipoproteínas (proteínas de membrana externa - PME), lipopolissacarídeos (LPS) e endotoxinas que podem ser responsáveis pela lesão renal, levando a disfunção tubular e inflamação.

Leptospiplas isoladas dos rins de animais infectados cronicamente mostram uma quantidade aumentada de LPS, sugerindo que sua expressão facilite a permanência da bactéria no tecido renal (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

2.4.2 Proteínas de Membrana Externa (PME) e Adesinas

A adesão às células hospedeiras e à matriz extra celular (MEC) é um requisito essencial para a penetração, disseminação e persistência das leptospiplas em tecidos mamíferos hospedeiros. As leptospiplas produzem proteínas de superfície (adesinas) que reconhecem componentes de adesão da MEC, facilitando a colonização do hospedeiro (PATTI et al., 1994; SCHWARZ-LINEK; HÖÖK; POTTS, 2004).

Leptospiplas patogênicas parecem se ligar às células do hospedeiro com maior eficiência. Foi demonstrado que *L. interrogans* liga-se a uma variedade de linhagens celulares, incluindo fibroblastos, monócitos, macrófagos, células endoteliais e epiteliais renais produzidas *in vitro* (BREINER et al., 2009).

A Proteína de Membrana Externa (PME) mais importante, expressa durante a infecção, é lipoproteína de superfície LipL32 de 32-kDa que é altamente conservada entre as espécies patogênicas, ausente nas não patogênicas e tem sua expressão aumentada durante a infecção humana. Esta PME se liga aos colágenos I, IV e V, além da laminina. LipL32 também exibe atividade ligadora de fibronectina dependente de cálcio. É, ainda, um dos principais alvos da resposta imune em humanos (GUERREIRO et al., 2001) e parece ter papel relevante na patogênese da

nefrite túbulo intersticial (BARNETT et al., 1999; HAAKE et al., 2000; MERIEN et al., 2000; YANG et al., 2002; HAUKE et al., 2008; HOKE et al., 2008; TUNG et al., 2010).

Diversas PMEs de espécies patogênicas foram identificadas e localizadas nos túbulos proximais e interstício renal de animais infectados, sugerindo seu envolvimento na LRA (BARNETT et al., 1999; HAAKE, 2000).

As PMEs caracterizadas até então se ligam à laminina (LenA, Lsa21, Lsa27, Lsa63, LipL32 e uma proteína de membrana de 36-kDa), a componentes diversos da MEC (LigA, LigB, LigC) ou tem função desconhecida (OmpL36, OmpL37, OmpL47, OmpL54 e Loa22) (MERIEN et al., 2000; PALANIAPPAN et al., 2002; MATSUNAGA et al., 2003; CHOY et al., 2007; STEVENSON et al., 2007; ATZINGEN et al., 2008; LIN et al., 2008; LIN; CHANG, 2007; 2008; LIN et al., 2009; PINNE ; HAAKE, 2009; EVANGELISTA ; COBURN, 2010; BARBOSA et al., 2006; LONGHI et al., 2009; VERMA et al., 2006; 2010; VIEIRA et al., 2010).

O aumento da expressão das PMEs responsáveis pela adesão à matriz extracelular e às proteínas séricas do hospedeiro, que ocorre em resposta à osmolaridade fisiológica, pode contribuir para o estabelecimento da infecção e para a colonização de órgãos-alvo (CHOY et al., 2007).

2.4.3 Produção de Toxinas

A produção de toxinas por leptospiros patogênicos *in vivo* foi sugerida por Areán (AREÁN, 1962; AREÁN; SARASIN; GREEN, 1964). Preparações de lipopolissacarídeos (LPS – fatores de virulência de bactérias Gram-negativas) de leptospiros exibem atividade em ensaios biológicos para endotoxinas, apesar da menor potência (NIE et al., 1984; ISOGAI et al., 1986; MASUZAWA et al., 1990; DE-SOUSA ; KOURY, 1992).

A habilidade das toxinas hemolíticas (hemolisinas) em lisar eritrócitos e outras membranas celulares faz delas potentes fatores de virulência, para vários patógenos bacterianos. Hemolisinas foram identificadas a partir do sequenciamento genômico de sorovares de *Leptospira* e podem agir como esfingomielinases, fosfolipases ou proteínas formadoras de poros (EVANGELISTA ; COBURN, 2010).

As hemolisinas dos sorovares *ballum*, *hardjo*, *pomona* e *tarassovi* são esfingomielinases. A Esfingomielinase C da *L. interrogans* sorovar *pomona* causa doença hemolítica em gado e ovelhas. Já o sorovar *ballum* produz hemólise em

hamsters (BERNHEIRMER; BEY, 1986; DEL REAL et al., 1989; SEGERS et al., 1992). A ausência de genes de esfingomielinases em leptospirosas saprofiticas (BULACH et al., 2000) sugere sua participação na virulência (ADLER; MOCTEZUMA, 2010) ou, talvez, na sobrevivência no ambiente hospedeiro mamífero, no qual certos nutrientes essenciais, como o ferro, são limitantes.

Atividade da fosfolipase C foi descrita no sorovar canicola (YANAGIHARA et al., 1982). *L. interrogans* sorovar *Lai* possui genes de hemolisina homólogos de *SPHA*: *SPHH*, que codifica uma proteína formadora de poros (LEE et al., 2000; LEE et al., 2002), e *SPH2*, cujo produto proteico lisa células endoteliais e eritrócitos (ARTIUSHIN et al., 2004). *SPHH* e *SPH2* tem sua expressão aumentada durante a infecção leptospirótica humana (CARVALHO et al., 2010).

2.4.4 Resposta Imune

O segundo estágio da leptospirose aguda é também chamado de fase imune, na qual o desaparecimento da leptospiremia coincide com o surgimento de anticorpos. A gravidade dos sintomas e da doença parecem desproporcionais aos achados histopatológicos dependentes da imunomediação. Níveis de complexos imunes circulantes foram correlacionados à gravidade dos sintomas e, nos sobreviventes, os níveis séricos caíram concomitantemente com a melhora clínica (GALLI et al., 1985; LEVETT, 2001; ABDULKADER et al., 2002).

O mecanismo imune de resistência à leptospirose é predominantemente humoral (ADLER; FAINE, 1977; LEVETT, 2001; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Resposta imune celular à leptospirose foi descrita (RATNAM et al., 1984), mas as evidências obtidas a partir da coinfeção leptospirose-AIDS sugerem uma menor importância do componente celular na resposta à leptospirose (DA SILVA et al., 1990, NEVES et al., 1994). Além disso, a imunidade passiva pode ser obtida exclusivamente com anticorpos (ADLER; FAINE, 1977, JOST et al., 1986, SCHOONE et al., 1989).

Anticorpos IgM e IgG são detectados sorologicamente em pacientes que se recuperaram de leptospirose grave até 6 anos após a infecção (CUMBERLAND et al., 2001).

Os anticorpos produzidos são, principalmente, contra os LPS da *Leptospira*. Os LPS são altamente imunogênicos e são os responsáveis pela

especificidade dos sorovares (CHAPMAN; ADLER; FAINE, 1988; DE LA PEÑA-MOCTEZUMA et al., 1999; PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007).

Anticorpos monoclonais contra LPS de camundongos infectados conferiram proteção passiva a porcos-da-índia recém-nascidos contra infecção experimental por leptospira (JOST et al., 1986). Porém, imunidade mediada por anticorpos anti-LPS é limitada a sorovares homólogos, diferente das preparações de proteínas leptospiróticas inteiras que demonstraram proteger contra infecções por sorovares de leptospira homólogos e heterólogos (PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007).

As PMEs OmpL1 e LipL41 da leptospira, altamente conservadas, induzem imunidade protetora quando utilizadas em combinação. O que é promissor no desenvolvimento de vacinas capazes de gerar imunidade cruzada ampla com menos efeitos adversos (SHANG; SUMMERS; HAAKE, 1996; HAAKE et al., 1999; 2000).

A imunização com regiões de LigB, seguidas da exposição experimental a *L. interrogans* sorovar *Pomona*, protegeu hamsters (YAN et al., 2009). A identificação de antígenos protetores contra leptospirose também facilitará a detecção precoce da Leptospira através de melhores métodos diagnósticos.

O Antígeno Leucocitário Humano (HLA) DQ6 foi identificado como um fator de risco independente para leptospirose. A localização estrutural dos polimorfismos do HLA-DQ6 associados com a doença sugerem que as leptospiras sejam capazes de produzir um superantígeno que causa ativação celular T inespecífica em indivíduos suscetíveis (LINGAPPA et al., 2004; LEVETT ; HAAKE, 2009).

A maioria das PMEs têm sua expressão reprimida à temperatura e osmolaridade fisiológicas, *in vivo* e *in vitro*, possivelmente como mecanismo para escapar à detecção pelo sistema imune do hospedeiro. As Leptospiras eliminadas na urina suprimem a expressão de proteínas envolvidas na resposta imune do hospedeiro (NICHOLSON; PRESCOTT, 1993; BARNETT et al., 1999; NALLY; TIMONEY; STEVENSON, 2001; MATSUNAGA et al., 2003; QIN et al., 2006; CHOY et al., 2007; LO et al., 2006; 2009; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

A presença simultânea de TLR2 e TLR4 em camundongos é necessária para uma defesa imune efetiva contra *Leptospira*. O TLR4 é essencial para a produção precoce de IgM por células B contra os LPS da leptospira (WERTS et al., 2001; NAHORI et al., 2005; VIRIYAKOSOL et al., 2006; CHASSIN et al., 2009).

Por outro lado, camundongos deficientes em TLR4 submetidos a injeção intraperitoneal por *L. interrogans* sorovar *Icterohaemorrhagiae* apresentaram leptospirose grave com icterícia, hemorragia pulmonar e acúmulo de leptospiras nos rins e pulmões (VIRIYAKOSOL et al., 2006).

Camundongos *duplos-knockout*, com ausência de TLR2 e TLR4, são altamente suscetíveis à infecção por *Leptospira* quando comparados aos *knockouts* de apenas um dos receptores (CHASSIN et al., 2009).

O reconhecimento da leptospira por células de roedores depende da presença conjunta de TLR2 e TLR4, enquanto em humanos, apenas o TLR2 é ativado. O TLR4 monocítico humano, capaz de responder a diminutas quantidades de endotoxinas de outros gram-negativos, não reconhece nem é ativado por LPS de leptospiras, provavelmente, pelo seu exclusivo resíduo fostato metilado no lipídeo A. Como consequência, não se ativa a cascata imune, o que justifica a suscetibilidade humana à leptospirose e sua ineficaz resposta imune (WERTS et al., 2001; LEE et al., 2002; QUE-GEWIRTH et al., 2004; NAHORI et al., 2005).

Macrófagos humanos fagocitam leptospiras *in vivo* (VINH; ADLER; FAINE, 1982) e *in vitro* (CINCO; BANFI; SORANZO, 1981), mas os microorganismos não são eliminados. Foi demonstrado que *L. interrogans* cepa *Lai* é fagocitada por macrófagos humanos e murinos com igual eficácia, mas o destino intracelular do patógeno fagocitado difere (LI et al., 2010). Em murinos, as leptospiras são degradadas por hidrolases no interior de lisossomos. Nos macrófagos humanos as leptospiras escapam dos fagossomos para o citosol, proliferam e causam apoptose ou necrose celular, por um mecanismo cálcio dependente (ZHAO et al., 2013).

Tanto a inabilidade do TLR4 para detectar leptospiras quanto a fuga fagossomal da *Leptospira* sugerem prováveis mecanismos para evitar sua destruição pelo sistema imune humano (EVANGELISTA; COBURN, 2010).

2.5 Quadro Clínico

O período de incubação varia de 5 a 14 dias, com média de 10 dias. A apresentação clínica varia de uma doença subclínica seguida de soroconversão até casos fatais. Até 90% dos indivíduos apresentam uma doença sistêmica febril aguda autolimitada. A leptospiremia é pronunciada nesta fase aguda septicêmica, que dura de 3 a 7 dias (DAHER et al., 1999; LOMAR et al., 2002; BHARTI et al., 2003; LEVETT; HAAKE, 2009).

Esta fase tem início abrupto com febre alta, cefaléia, calafrios, mialgia, sufusão conjuntival, dor abdominal, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia, tosse e faringite. Apesar da sufusão conjuntival sem exsudato e da dor nas panturilhas serem achados físicos característicos, ocorrem em uma minoria dos casos. Outros achados incluem linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (LEVETT; HAAKE, 2009).

Estudo realizado na França com 34 pacientes com leptospirose foram encontradas as seguintes manifestações clínicas na admissão hospitalar: febre (100%), cefaléia (75%), mialgia (55%), artralgia (45%) e vômitos (39%). Os achados laboratoriais revelaram linfopenia (85%), plaquetopenia (75%), aumento de enzimas hepáticas (87%) e alterações renais: proteinúria (77%), hematúria (58%) e elevação da creatinina (53%) (JAURÉGUIBERRY et al., 2005).

Leptospiras podem ser encontradas no líquido, nesta fase, mas os sinais meníngeos não são proeminentes. Leptospiras também podem ser recuperadas na urina após a primeira semana. A urinálise revela piúria e proteinúria leves, com ou sem hematúria, e cilindros hialinos ou granulados (LEVETT; HAAKE, 2009).

Em até 20% dos casos, os sintomas progridem ou reaparecem após uma remissão de até 3 dias, iniciando a segunda fase da doença, que dura de 4 a 30 dias. Nessa fase, sintomas mais graves, como meningite e uveíte, podem ocorrer. (DAHER et al., 1999; BHARTI et al., 2003).

Em muitos casos graves não se observa uma distinção temporal clara com defervescência entre as fases. Outros apresentam apenas a segunda fase. Sendo a primeira fase, provavelmente, subclínica (LEVETT; HAAKE, 2009).

A forma clínica grave mais característica após a fase aguda, é a Doença de Weil com comprometimento da função renal e hepática. Os casos mais graves podem evoluir diretamente da fase aguda para uma doença fulminante com febre

acima de 40°C e a instalação rápida de pneumonite hemorrágica, falência renal, hepática, arritmia cardíaca ou colapso circulatório (LEVETT; HAAKE, 2009).

Esta segunda fase é considerada “imune” por estar diretamente relacionada à intensidade da resposta imunológica individual e, também, por marcar o desaparecimento da leptospiremia. O desaparecimento das leptospiplas do sangue periférico e LCR coincide com o surgimento dos Anticorpos IgM. Os microorganismos podem ser encontrados em quase todos os tecidos ou órgãos e na urina, por várias semanas, a depender da gravidade da doença (DAHER et al., 1999; LEVETT; HAAKE, 2009).

Além dos sintomas já descritos na fase aguda, o paciente pode apresentar quaisquer dos sintomas a seguir: icterícia, insuficiência renal, arritmias cardíacas, sintomas respiratórios, meningite asséptica, sufusão conjuntival com ou sem hemorragia, fotofobia, dor ocular, mialgias, adenopatia e esplenomegalia. Dor abdominal é comum e pode representar colecistite alitiásica ou pancreatite (LEVETT; HAAKE, 2009).

Em pacientes ictericos as alterações da função hepática são desproporcionais aos brandos achados anatomopatológicos. Níveis de bilirrubina sérica conjugada, chegam a 80 mg/dL, acompanhadas por modestas elevações das aminotransferases séricas, raramente acima de 200 U/L em contraste com as hepatites virais. A icterícia regride lentamente. A morte por insuficiência hepática é rara na ausência de falência renal concomitante (ZAKI; SPIEGEL 1998; LEVETT; HAAKE, 2009).

Meningite asséptica com ou sem sintomas está presente em até 80% dos casos na fase imune. Os sintomáticos experimentam uma cefaléia frontotemporal bilateral intensa com ou sem *delirium*. O estudo liquórico mostra pleocitose linfocítica, com celularidade total geralmente abaixo de 500/mm³, proteínas entre 50 e 100 mg/mL e glicose normal (LEVETT, 2001; SILVA et al., 2002).

Morte na fase aguda da doença é um evento raro. A mortalidade nos casos graves (fase imune) varia de 5 a 40%. Três diferentes estudos, encontraram mortalidades semelhantes: 14.4%, 15% e 17%. Os fatores de risco para óbito incluem: idade avançada, alteração do estado mental, insuficiência renal, oligúria, hipercalemia, insuficiência respiratória, hipotensão e arritmias. Alteração do nível de consciência foi considerado o maior preditor de mortalidade (KO et al., 1999; ESEN et al., 2004; LOPES et al., 2004).

Os casos fatais se devem a qualquer combinação entre insuficiência renal, insuficiência hepática ou pneumonite com diátese hemorrágica. A Síndrome Hemorrágica Pulmonar Grave pode se manifestar na leptospirose mesmo na ausência de insuficiência hepática ou renal (LEVETT; HAAKE, 2009).

Hemoptise pode ocorrer, ainda na fase aguda da doença, e está associada à necessidade de ventilação mecânica e à mortalidade. Em 75 casos de leptospirose, com mortalidade de 8% (6 pacientes), todos os óbitos tiveram hemorragia pulmonar difusa evidente à necrópsia (YERSIN et al., 2000; MÁRQUEZ-MARTÍN et al., 2006).

Estudos em hamsters com leptospirose, evidenciaram edema pulmonar não cardiogênico, por redução no *clearance* do fluido secundário à menor expressão de canais epiteliais de sódio na membrana luminal (EnaC) e maior do cotransportador de Na-K-Cl tipo 1 da membrana basolateral (SEGURO; ANDRADE; 2013).

Raramente a hemorragia se manifesta antes da intubação orotraqueal, e o quadro deve ser suspeitado a partir de qualquer sinal de desconforto respiratório, mesmo na ausência de hemoptise (IM, 1989).

A hemorragia pulmonar é multifatorial, envolvendo um processo difuso de ativação e dano endotelial. O papel dos fenômenos auto-imunes e ativação plaquetária não estão esclarecidos (MEDEIROS; SPICHLER; ATHANAZIO, 2010).

Histologicamente, a lesão do endotélio capilar causa congestão com hemorragia intersticial e intra-alveolar, destruição alveolar difusa e desorganização do espaço aéreo. Infiltrados inflamatórios são incomuns (NICODEMO et al., 1997).

São encontradas poucas *Leptospiras* no tecido pulmonar, sendo as alterações neste órgão decorrentes de toxinas liberadas em outros tecidos e levadas até os pulmões pela corrente sanguínea (BHARTI et al., 2003).

Alterações eletrocardiográficas são comuns na leptospirose, com prevalência de até 86,2%, e alterações ecocardiográficas de 41%. Em 239 eletrocardiogramas, foi identificado acometimento do sistema de condução atrial em (76,6%) ventricular em(61,9%) dos exames. Fibrilação atrial é a arritmia mais comum, principalmente, em idosos e em casos graves (PUPKEVICH-DIAMANT; GURFINKEL; NISNEVICH, 1990; SACRAMENTO et al., 2002; FERNANDO et al., 2013).

Na necrópsia de 44 casos fatais de leptospirose, foi evidenciada miocardite intersticial em 100% dos casos, com acometimento do epicárdio ou endocárdio em 39%, das valvas em 36%, das artérias coronarianas em 51% e da aorta em 56% (CHAKURKAR et al., 2008; CHAGAS JÚNIOR et al., 2010).

2.6 Nefropatia na Leptospirose

O envolvimento renal é frequente na leptospirose e deve ser sempre lembrado como diagnóstico diferencial nas LRAs. As manifestações clínicas quanto à gravidade variam de uma simples anormalidade no sedimento urinário à falência renal aguda (SITPRIJA; LOSUWANRAK; KANJANABUCH, 2003).

Lesão renal aguda é observada em 44 a 67% dos pacientes com a doença. No sedimento urinário, podemos encontrar pigmentos biliares, leucócitos, eritrócitos e cilindros granulosos. A hipotensão deve ser considerada um sinal de alerta na evolução para lesão renal aguda. Proteinúria, se houver, costuma ser inferior a 1.000mg no período de 24 horas (SITPRIJA; LOSUWANRAK; KANJANABUCH, 2003).

Em função da definição escolhida para LRA, da idade dos pacientes do estudo e da gravidade dos casos considerados, a incidência de LRA foi considerada menor (16%) em alguns trabalhos (LEVETT, 2001).

A forma mais comum de apresentação da LRA na leptospirose é a não oligúrica e, apesar das elevações rápidas de creatinina e uréia no plasma, é acompanhada por hipocalemia em 45% dos casos.. Oligúria é encontrada em apenas 11% dos casos, em especial, quando há maior gravidade e hiperbilirrubinemia (SEGURO; LOMAR; ROCHA, 1990; SITPRIJA; LOSUWANRAK; KANJANABUCH, 2003; SEGURO; ANDRADE; 2013).

Há comprometimento da reabsorção proximal de sódio, aumento do aporte de sódio distal e perda de potássio. Apesar da perda de função renal, os níveis séricos de potássio podem ser inferiores aos de controles saudáveis. Esta perda de potássio parece ser secundária à elevada concentração de sódio no túbulo distal, potencializada pelo elevado volume urinário e pelos aumentos dos níveis séricos de aldosterona e cortisol. A deficiência na capacidade de reabsorver sódio parece ser causada pela perda seletiva dos canais de sódio do epitélio tubular proximal (EnaC). Os níveis séricos de uréia e creatinina habitualmente não

ultrapassam 100mg/dl e 8 mg/dl, respectivamente, durante a fase aguda da doença. Existe correlação positiva entre a fração excretada de sódio e de potássio na leptospirose (ABDULKADER et al., 1996).

Em estudo com porcos-da-índia infectados com leptospira foi demonstrada resistência dos ductos coletores à ação da vasopressina resultando em aumento da fração excretada de potássio e baixa osmolaridade urinária. A poliúria é causada pela limitada capacidade de concentração urinária (MAGALDI et al., 1992).

As alterações funcionais tubulares predominam no túbulo proximal e precedem a queda da taxa de filtração glomerular. Em humanos e animais ocorre redução na expressão do transportador de sódio (NHE3) e do transportador de água Aquaporina 1 (AQP1) dos túbulos proximais com concomitante aumento da expressão renal do cotransportador de Na-K-Cl tipo 2. No modelo experimental, na fase inicial da doença, ocorre redução de expressão do transportador de água dos ductos coletores, a Aquaporina 2 (AQP2), que poderia explicar a predominância da LRA não oligúrica. Durante a fase de recuperação, a expressão de AQP2 aumenta como mecanismo compensatório. Essas alterações podem explicar o aumento da fração de excreção de sódio e potássio. A terapia antimicrobiana parece ser capaz de restaurar os transportadores a seu estado anterior (SEGURO; ANDRADE; 2013).

A menor expressão de NHE3 e AQP1 nas células do túbulo contorcido proximal já havia sido observada por imunohistoquímica em comparação de peças de necrópsia de pacientes com e sem leptospirose (ARAÚJO et al, 2010).

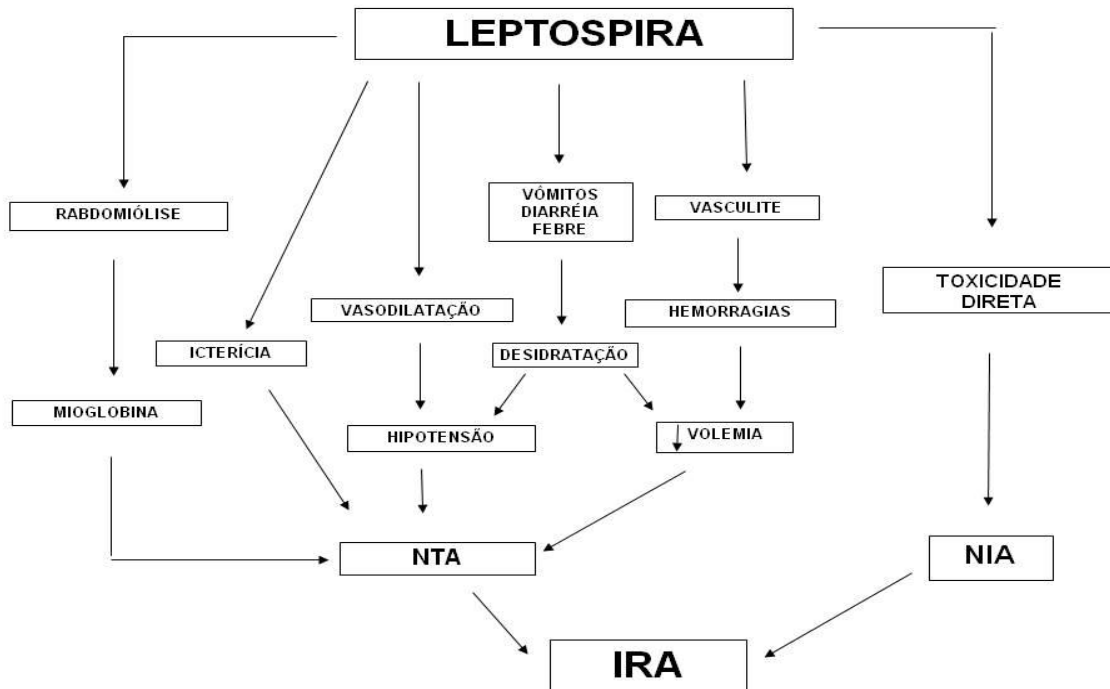
Um estudo clínico com 20 pacientes infectados por leptospirose, dos quais apenas nove (45%) tinham LRA objetivamente caracterizada, demonstrou disfunção tubular proximal em todos os pacientes (100%), hipermagnesiúria em 15 (75%) e redução da reabsorção de fosfato em 10 (50%). Dos nove com LRA, todos apresentaram hipomagnesemia e três (33,3%) deles hipofosfatemia (KHOSITSETH et al., 2008).

Observam-se ainda glicosúria, bicarbonatúria e excreção de ácido úrico e fosfato (DAHER; ZANETTA; ABDULKADER, 2004).

A recuperação da função renal é completa nos que sobrevivem à doença, com normalização de todos os parâmetros em até 6 meses. A exceção é do déficit de concentração urinária que pode persistir por período mais longo (DAHER; ZANETTA; ABDULKADER, 2004).

Os principais fatores envolvidos na patogênese da LRA na leptospirose são a ação nefrotóxica direta da leptospira, a ação das toxinas com indução da resposta imune, alterações hemodinâmicas, icterícia e rabdomiólise (Figura 1).

Figura 1 - Fisiopatologia da lesão renal aguda na leptospirose.



Fonte: adaptado de DAHER; SILVA JÚNIOR; LIBÓRIO, 2010.

2.6.1 Ação nefrotóxica direta da leptospira

Estudos experimentais em LRA na leptospirose demonstram que a espiroqueta, no tecido renal, desencadeia um processo de nefrite intersticial aguda (NIA), indicando ser o principal mecanismo indutor de LRA. Alguns estudos sugerem que a NIA ocorra tardiamente em relação ao dano tubular. Pacientes que foram a óbito nos primeiros 7 dias de doença exibiam necrose tubular aguda (NTA) e edema celular, enquanto aqueles que foram a óbito na segunda ou terceira semanas de doença apresentaram NTA e edema intersticial, já os que faleceram após 3 semanas apresentavam nefrite intersticial grave e difusa. Tanto a NTA quanto a NIA estão associadas à presença de antígenos da leptospira no tecido renal. Após a inoculação experimental de *L. icterohaemorrhagiae*, a bactéria pode ser encontrada no mesângio e interstício renal em 3 a 6 horas. A passagem da leptospira através do

capilar glomerular causa uma proliferação mesangial leve e transitória (CERQUEIRA et al., 2008).

Um estudo clássico mostrou que após a inoculação de leptospira em ratos, ela penetra o tecido renal a partir da luz capilar e sua presença no interstício causa edema e infiltração de células inflamatórias nos dias subsequentes. A leptospira pode ser identificada aderida à superfície epitelial dos túbulos renais após a primeira semana e no lúmen tubular na segunda semana (MARSHALL, 1976).

O exame histológico dos rins de animais infectados mostra nefrite intersticial, que pode ser resultado de dano direto causado pela presença de Leptospiras no tecido (BHARTI et al., 2003).

Em casos humanos fatais, os rins ficam aumentados em volume, amarelados e com vasos sanguíneos corticais proeminentes (ÁREAN, 1962).

Histologicamente observam-se focos de nefrite túbulointersticial com infiltrados mistos de linfócitos, plasmócitos, macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e eosinófilos (ZAKI; SPIEGEL, 1998; ARAÚJO et al., 2010). Áreas focais de necrose tubular aguda (NTA) e edema intersticial também podem ser observados. Antígenos da leptospira são encontrados nas células do túbulo proximal e na forma de grandes aglomerados extracelulares no interstício (MORRISON; WRIGHT, 1976, ZAKI; SPIEGEL, 1998).

Na ultrassonografia, os rins apresentam-se com tamanho aumentado e ecogenicidade parenquimatosa normal, aspecto compatível com a nefrite túbulointersticial evidenciada no exame histopatológico (YANG; WU; PAN, 2001). Os órgãos recuperam seu tamanho nos sobreviventes após a resolução da doença (YANG et al., 2005).

A LipL32 afeta diretamente as células tubulares proximais, aumentando consideravelmente a expressão de genes e proteínas pró-inflamatórias, como a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), a proteína quimiotática de monócitos-1 (CCL2/MCP-1), as células T (RANTES) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). A quimiocina CCL2/MCP-1 é um dos fatores mais importantes no início da infiltração de células monocíticas na nefrite intersticial, enquanto o TNF- α , uma citocina inflamatória, é uma mediadora de endotoxemia (YANG et al., 2006).

Para que ocorra a estimulação de iNOS e CCL2/MCP-1 pelas PMEs, com a LipL32 em particular, deve haver nas células dos túbulos proximais a presença de receptores "Toll-like" (TLR). Proteína específica que reconhece padrões moleculares

de patógenos atuando como a primeira linha de defesa da imunidade inata, gerando uma resposta inflamatória inicial, neste caso, mais especificamente o receptor TLR2 (YANG et al., 2006).

Em síntese, a PME se liga ao TLR2 nas células do túbulo proximal que levam à ativação do fator nuclear NF- κ B, que estimula a produção de CCL2/MCP-1 para recrutamento de células inflamatórias. O NF- κ B também está associado ao aumento da iNOS e do TNF- α nas células do túbulo proximal (BLASI et al., 2007).

2.6.2 Alterações hemodinâmicas na LRA da Leptospirose

A LRA na leptospirose pode ter um componente pré-renal e a redução da resistência vascular sistêmica pode ser secundária à hipovolemia. A desidratação é frequente e resulta da febre, dos vômitos e da diarreia. A hipotensão pode ser exacerbada pela deficiência na reabsorção de sódio no túbulo proximal, característica da leptospirose. Após reposição volêmica há melhora do quadro clínico (NICHOLSON et al., 1989; SEGURO; LOMAR; ROCHA, 1990; EDWARDS et al., 1990; SIRIWANIJ et al., 2005).

A vasodilatação sistêmica leva ao aumento dos níveis plasmáticos de aldosterona e do hormônio anti-diurético, com conseqüente vasoconstrição renal e redução da diurese (SIRIWANIJ et al., 2005).

2.6.3 Icterícia e a LRA da Leptospirose

Níveis elevados de bilirrubina são comuns na forma grave da doença e estão associados à presença e gravidade da LRA.

A ligação da bilirrubina à albumina previne sua toxicidade renal, e, apenas, a bilirrubina conjugada *livre* é filtrada no glomérulo, chegando às células tubulares renais e ao lúmen (FULOP; SANDSON, 1967; FULOP; KATZ; LAWRENCE, 1971).

A icterícia leve a moderada não compromete a função renal, mas a bilirrubina sérica a partir de 27 mg/dL, mesmo com albumina normal, reduz a capacidade de concentração urinária e a filtração glomerular (SITPRIJA et al., 1990).

Um estudo retrospectivo com 196 casos de leptospirose definiu o nível sérico de bilirrubinemia direta como um preditor independente de lesão renal

oligúrica, de mortalidade mais elevada ($p=0.04$). As evidências sugerem que icterícia grave por bilirrubina conjugada está associada à presença e gravidade da LRA, em especial oligúrica, na leptospirose (DAHER et al., 2009).

2.6.4 Rabdomiólise e a LRA da leptospirose

A rabdomiólise é caracterizada pela destruição de células musculares estriadas esqueléticas e a consequente liberação na circulação e no interstício de creatinofosfoquinase (CK), desidrogenase láctica (LDH) e mioglobina (LIMA et al., 2008).

A mioglobina se liga fracamente às proteínas do plasma, e uma pequena quantidade chega à urina. Porém, sua liberação maciça pode saturar a capacidade de ligação do plasma resultando em maior aporte de mioglobina aos túbulos renais. Sua capacidade de causar lesão tubular está bem estabelecida (VANHOLDER et al., 2000; LIMA et al., 2008).

A intensidade da síndrome varia desde a elevação subclínica de CK ao edema celular muscular e de interstício, com contração do volume intravascular e lesão renal aguda induzida por pigmentos (VANHOLDER et al., 2000).

A lesão renal aguda ocorre em 33% a 50% dos casos de rabdomiólise e seus principais mecanismos fisiopatológicos são: toxicidade direta, precipitação, obstrução tubular por mioglobina, hipovolemia, produção de radicais livres e isquemia renal secundária a vasoconstritores musculares (LIMA et al., 2008).

Na leptospirose, a mialgia, quase universal, está presente em 93% dos casos. Mas rabdomiólise, considerando apenas elevações da CK a partir de cinco vezes o limite superior da normalidade ocorre em uma proporção bem menor de casos. Porém, os níveis mais elevados de CK são encontrados nos pacientes com LRA grave, sugerindo seu papel na gravidade da LRA (COVIC et al., 2003; DAHER et al., 1999; DAHER; ZANETTA; ABDULKADER, 2004; COURSIN; UPDIKE; MAKI, 2000; LIBÓRIO, 2005).

2.7 Lesão Renal Aguda e Classificação KDIGO

O termo “Lesão Renal Aguda” (LRA, ou AKI – Acute Kidney Injury) é a nomenclatura recomendada para a complexa síndrome clínica antes denominada

“Insuficiência Renal Aguda” (IRA). Essa mudança enfatiza tratar-se de um espectro de apresentações clínicas de variável intensidade, das menores elevações na creatinina sérica à falência renal anúrica dependente de terapia substitutiva renal (KELLUM; BELLOMO; RONCO, 2008; RICCI; CRUZ; RONCO, 2011).

A creatinina sérica é provavelmente a medida indireta da taxa de filtração glomerular (TFG) mais amplamente utilizada em razão do seu baixo custo e conveniência de sua dosagem (SCHRIER et al., 2004).

A LRA é reconhecida como um fator independente para o aumento da morbidade e mortalidade de pacientes em vários processos patológicos (GOLDSTEIN, 2011).

Conceitualmente não havia uma definição objetiva da LRA, ela era considerada como o rápido declínio da função renal. A partir disso, reconheceu-se a necessidade de uma definição que permitisse universalizar a linguagem no ambiente clínico e científico. Uma definição consensual foi publicada pela entidade *Acute Dialysis Quality Initiative* (ADQI), denominada RIFLE, acrônimo que representa “*Risk*”, “*Injury*”, “*Failure*”, “*Loss*”, “*End-stage renal disease*” (BELLOMO et al., 2004).

Estes critérios levam em consideração a elevação da creatinina sérica, a redução da taxa de filtração glomerular e o volume do débito urinário relacionado ao peso do paciente e ao tempo transcorrido (KELLUM; BELLOMO; RONCO, 2008).

Em um estudo com 147 pacientes com LRA na Unidade de Terapia Intensiva de um hospital especializado em doenças infecciosas, dos quais 11,6% tinham leptospirose, a classificação RIFLE demonstrou uma associação estatisticamente significativa com a mortalidade (DAHER et al., 2008).

Os critérios RIFLE foram testados em outras doenças infecciosas, como aids e leishmaniose visceral, mantendo associação com a mortalidade (OLIVEIRA et al., 2010; SILVA JÚNIOR et al., 2010).

Em 2007, a Sociedade Internacional para o estudo da LRA, “*Acute Kidney Injury Network*” (AKIN) propôs a classificação AKIN, derivada da RIFLE, que classifica a lesão renal aguda em estágios 1, 2 e 3, substituindo respectivamente *Risk*, *Injury* e *Failure*, eliminando as categorias RIFLE: *Loss* e *End Stage Renal Disease*. Estudos comparativos das classificações não conseguiram demonstrar superioridade de uma sobre a outra (BAGSHAW, 2010).

Estudos demonstraram a associação entre o estágio AKIN e a mortalidade (OSTERMANN; CHANG, 2008), mas nenhum foi conduzido em leptospirose.

Mais recentemente o *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) *Acute Kidney Injury Work Group*, propôs um novo protocolo para diagnóstico e classificação de LRA baseado em alterações na combinação dos critérios AKIN e RIFLE. O KDIGO mantém o critério de débito urinário inalterado. Entretanto, seu estágio I valoriza aumentos a partir de 0.3 mg/dL da creatinina sérica (SCr) no intervalo de 48 horas ou equivalentes a 150% da SCr basal, desde que tenha ocorrido nos últimos 7 dias. Se o aumento da SCr chegar 200% do valor basal, configura o estágio II. Caracteriza-se o estágio III como elevações da SCr a partir de 300% da basal, menores de 18 anos com taxa de filtração glomerular estimada abaixo de 35ml/min/1.73m² e todos os indivíduos com creatinina sérica absoluta >4,0mg/dL ou submetidos à terapia dialítica. O uso combinado de pequenos aumentos absolutos e relativos da creatinina sérica pode potencialmente tornar o critério KDIGO mais sensível do que o RIFLE (KDIGO, 2012; LEVI et al., 2013).

2.8 Diagnóstico Laboratorial

O custo benefício de iniciar a terapia para leptospirose empiricamente foi comparado ao iniciar a terapia posteriormente à confirmação diagnóstica. Em função da baixa sensibilidade dos testes diagnósticos, recomenda-se o início empírico da terapia a partir da suspeita clínica e epidemiológica (SUPUTTAMONGKOL et al., 2010). Ainda assim deve-se buscar a confirmação da etiologia com exames complementares laboratoriais.

A visualização direta das leptospiros no sangue e urina por microscopia de campo escuro pode ser utilizada para o diagnóstico, mas a sensibilidade do método varia de 4% a 82% nos trabalhos disponíveis. A especificidade (61%) pode ser comprometida pelo reconhecimento de artefatos como leptospiros (CHANDRASEKARAN; KRISHNAVENI; CHANDRASEKARAN, 1998; RAO; SHASHIBHUSHAN; SHIVANANDA, 1998; MANOCHA et al., 2004; SHARMA; KALAWAT, 2008). Um trabalho encontrou valores preditivo positivo e negativo,

respectivamente, de 55.2% e 46.6% (VIJAYACHARI et al., 2001); e sensibilidade de 80% (ARUMUGAM et al., 2011).

Alguns métodos têm sido utilizados nessa detecção direta, incluindo imunofluorescência, imunoperoxidase e a prata. Mas as baixas sensibilidade e disponibilidade comercial restringem seu uso (BROWN et al., 1995; MÉRIEN; BARANTON; PÉROLAT, 1995; SLACK et al. 2007).

Leptospiras podem ser isoladas do sangue e do líquido; e dialisado peritoneal nos dez primeiros dias de doença. O soro é o ideal, e a amostra deve ser coletada antes da terapia antibiótica, durante o pico febril e inoculada no meio de cultura à beira do leito. A urina na doença grave, geralmente, é muito concentrada e tem significativa atividade inibitória. Diagnóstico histológico é tradicionalmente baseado na impregnação por prata, mas a imunohistoquímica oferece sensibilidade e especificidade melhores (ALVES et al., 1987; PALMER; ZOCHOWSKI, 2000; GUARNER et al., 2001).

A urina deve ser coletada para cultura a partir da segunda semana de doença, assepticamente e sem preservativos. Deve ser processada imediatamente por centrifugação e tamponada para neutralizar o pH, visto que leptospiras não sobrevivem em ambientes ácidos (TURNER, 1970; BAL et al., 1994).

A maioria dos casos de leptospirose é diagnosticada por métodos sorológicos. O ensaio mais utilizado e considerado como padrão de referência é o Teste de Aglutinação Microscópica (MAT), no qual antígenos vivos de diferentes sorogrupos de leptospiras são adicionados a amostras de soro e examinados em microscopia de campo escuro para a ocorrência de aglutinação. O MAT requer duas amostras de soro, com duas semanas de intervalo entre as coletas (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2007).

Um caso confirmado é definido pelo aumento de quatro vezes no título do MAT para um ou mais sorogrupos entre o soro da fase aguda e aquele da convalescença, processados em paralelo. Um título de 1:800 com sintomatologia compatível é considerado evidência forte de infecção recente ou atual. Evidência sugestiva de infecção recente ou atual é um título de 1:200 em soro obtido após o início dos sintomas (FAINE, WHO, 1982; CDC, 1997).

A aplicação do MAT é limitada pela sua baixa sensibilidade nas amostras de soro de fase aguda. Trata-se de um teste de realização, interpretação e manutenção complexos, sendo restrito a laboratórios de referência (LEVETT, 2001;

2007). Sua eficácia foi investigada pela Sociedade Internacional de Leptospirose, tendo taxa de resultados falso-negativo de 13% (BHARTI et al., 2003). O MAT é um exame sorogrupo específico, e não deve ser utilizado para inferir a identidade do serovar infectante (LEVETT, 2003).

Anticorpos do tipo IgM podem ser detectados após, aproximadamente, cinco dias de doença. Os testes de detecção de IgM estão disponíveis em vários formatos. Porém, a soroconversão tardia é um evento comum, e em até 10% dos pacientes podem não soroconverter nos primeiros 30 dias (SMITS et al., 1999; 2000; LEVETT, 2001; LEVETT; BRANCH, 2002; BAJANI et al. 2003).

O uso desses ensaios como testes de triagem pode aumentar a capacidade diagnóstica dos laboratórios, em especial nos países em desenvolvimento, onde ocorrem a maioria dos casos de leptospirose (LEVETT, 2007).

São necessários métodos eficazes de baixo custo para o diagnóstico de leptospirose em países em desenvolvimento. O kit produzido para os laboratórios públicos brasileiros, o EIE-IgM-Leptospirose, demonstrou sensibilidade de 76% na fase aguda e 100% na fase de convalescença e uma especificidade de 93% e 100%, respectivamente (MC BRIDE et al., 2007).

Testes rápidos foram desenvolvidos para o diagnóstico de leptospirose onde não há suporte laboratorial. Podem utilizar soro ou outras amostras biológicas. Cartões de aglutinação apresentam sensibilidade de 72,3% a 88,2% e especificidade de 89,8 a 93,9%, dependendo do momento em que é coletada a amostra biológica. Nas fitas teste para detecção de IgM por ELISA, a sensibilidade chega a 98,96% e a especificidade a 93,93% (SMITS et al., 2001; TANSUPHASIRI et al., 2005).

O DNA leptospirótico pode ser amplificado a partir de urina, soro, humor aquoso e de tecidos obtidos por necrópsia. Já foram desenvolvidos ensaios de Reação de Polimerase em Cadeia para detecção de leptospiras, mas poucos foram avaliados em estudos clínicos multicêntricos. A principal vantagem da Reação de Polimerase em Cadeia é a perspectiva de confirmar o diagnóstico durante a fase leptospirêmica ou aguda precoce da doença, antes do surgimento de títulos detectáveis de anticorpos tipo imunoglobulina M. Portanto, em casos fulminantes, onde o óbito ocorre antes da soroconversão, a Reação de Polimerase em Cadeia

pode ser de elevado valor diagnóstico (MÉRIEN; BARANTON; PÉROLAT, 1995; BROWN et al., 1995; 2003; SLACK et al. 2007).

2.9 Tratamento

O diagnóstico e a terapia precoce são pilares fundamentais no tratamento da leptospirose, mas não existe ainda consenso quanto ao uso de antibióticos (DAHER; NOGUEIRA, 2000; BRETT-MAJOR; COLDREN, 2012).

2.9.1 Terapia Antibiótica, Reação de Jarisch-Herxheimer e Quimioprofilaxia

Um estudo randomizado e controlado avaliou a terapia com penicilina cristalina por 5 dias na leptospirose humana icterica em 38 pacientes, com um grupo controle de 41 indivíduos. Não foram observadas diferenças na defervescência ou na normalização de exames bioquímicos. A mortalidade foi maior no grupo controle (3 pacientes; 7,3%) do que no grupo tratamento (1 paciente; 2,6%), mas sem significância estatística (EDWARDS et al., 1988).

Outro estudo randomizado, duplo-cego, placebo controlado examinou o efeito do tratamento com penicilina na dose de 6 milhões de unidades por dia em leptospirose grave em 42 pacientes. Todos os aspectos mensuráveis da doença foram favoravelmente influenciados no grupo penicilina. A duração da febre no grupo placebo foi de 12 dias enquanto no grupo penicilina ($p < 0,005$) durou menos de 5 dias. A creatinina sérica normalizou após 8 dias no grupo placebo e em menos de 3 dias no grupo penicilina ($p < 0,01$). A penicilina encurtou o período de permanência hospitalar e evitou leptospirúria (WATT et al., 1988).

Um trabalho avaliou a recuperação da função renal após a insuficiência renal aguda da leptospirose e mostrou, apenas, a proteinúria diferindo com significância estatística entre os grupos. Mas foram apenas 34 pacientes e a opção por administrar penicilina foi do médico assistente (DAHER; NOGUEIRA, 2000).

Um estudo randomizado foi conduzido em 253 pacientes especificamente para comparar o início “tardio” de penicilina com a não introdução de antibioticoterapia após quatro dias do início dos sintomas de leptospirose. A mortalidade foi maior no grupo penicilina (12%) do que no grupo controle (6,3%),

mas não houve significância estatística ($p = 0,112$). Os autores recomendam o início precoce da terapia antimicrobiana (COSTA et al., 2003).

Estudos comparando penicilina cristalina com ceftriaxona, cefotaxima e doxiciclina no tratamento da leptospirose demonstraram equivalência na eficácia terapêutica (PANAPHUT et al., 2003; SUPUTTAMONGKOL et al., 2004).

Em 22 pacientes com leptospirose grave tardia tratados com Ceftriaxona, ocorreu apenas 1 óbito (RAPTIS, PAPPAS, AKRITIDIS, 2006).

Comparação entre doxiciclina e azitromicina também demonstrou equivalência terapêutica. Entretanto, houve mais reações adversas no grupo da doxiciclina (27,6% contra 10,6% com azitromicina, $p = 0,02$) (PHIMDA et al., 2007).

A última revisão sistemática da iniciativa Cochrane em 2012 foi inconclusiva para os benefícios do uso de antibióticos no tratamento da leptospirose. Foram revisados sete estudos randomizados, totalizando uma amostra de 403 pacientes. Entre os sobreviventes, a antibioticoterapia pode ter reduzido o período de internação em dois a quatro dias (4,7-5,6 dias com antibióticos e 7,7-11,6 sem terapia antimicrobiana), mas sem significância estatística. A opção terapêutica entre penicilina, cefalosporina e doxiciclina não parece ter impacto sobre a mortalidade ou a duração da febre. O benefício no uso da terapia antimicrobiana permanece obscuro, em especial na doença grave (BRETT-MAJOR; COLDREN, 2012).

A Reação de Jarisch-Herxheimer (JHR) é uma síndrome clínica que pode ocorrer no início da terapia antibiótica de doenças infecciosas como doença de Lyme, Sífilis, Febre recorrente e Leptospirose (WATT et al., 1990; FRIEDLAND; WARRELL, 1991; NEGUSSIE et al., 1992).

É caracterizada por febre súbita, tremores, calafrios, exantema, taquipneia, taquicardia e vasoconstrição seguidas de vasodilatação e hipotensão. A mortalidade chega a 5% (VAUGHAN et al., 1994; FEKADE et al., 1996). Deve-se à liberação de endotoxinas das espiroquetas, acompanhada do aumento de citocinas endógenas. Não há relação entre a JHR e a droga escolhida ou a taxa de eliminação das espiroquetas (POUND; MAY, 2005).

Em estudo prospectivo de infecção por *Borrelia recurrentis* tratada com penicilina ocorreram elevações das concentrações séricas de TNF (7 vezes), IL-6 (6 vezes) e IL-8 (4 vezes), transitórias e concomitantes com a JHR. As citocinas não se elevaram nos pacientes que não apresentaram a reação (NEGUSSIE et al., 1992).

A única estratégia que demonstrou benefício na prevenção da JHR foi a administração de anticorpos anti-fator de necrose tumoral previamente ao início da antibioticoterapia, mas o estudo foi conduzido em Febre Recorrente e não na Leptospirose (FEKADE et al., 1996; POUND; MAY, 2005).

Após uma enchente, a profilaxia pós-exposição com dose única de 200mg de doxiciclina não obteve significância estatística apesar do aparente efeito protetor, talvez pelo pequeno número de pacientes estudados (GONSALEZ et al., 1998).

Na profilaxia pré-exposição, 782 pessoas foram randomizadas em dois grupos, um com 200 mg semanais de doxiciclina por doze semanas e o outro com placebo. Não houve diferença estatisticamente significativa nas taxas de infecção. Porém, a diferença entre as taxas de doença clínica entre os grupos foi significativa: grupo intervenção (3,11%) e grupo controle (6,82%). Ocorreram três mortes nos 396 pacientes do grupo placebo, e nenhuma entre os 386 que receberam a doxiciclina. Não houve significância estatística (talvez pelo óbito ter sido um evento raro). Os resultados sugerem que a quimioprofilaxia não evite a infecção por leptospirosas, mas reduza a morbimortalidade em surtos (SEHGAL et al., 2000).

Um estudo duplo-cego randomizado foi conduzido entre 940 militares voluntários que receberam placebo ou 200mg de doxiciclina semanalmente (4 doses) durante treinamento em área endêmica. Vinte casos ocorreram no grupo placebo (taxa de ataque de 4,2%) enquanto, apenas, houve um caso no grupo doxiciclina (taxa de ataque de 0,2%; $p < 0,001$), resultando em 95% de eficácia (TAKAFUJI et al., 1984).

A revisão sistemática com meta-análise dos estudos citados acima foi divulgado pela Biblioteca Cochrane em 2009. Após a análise dos dados, os autores concluíram que o uso oral de doxiciclina na dose de 200mg/semana aumenta o risco de náuseas e vômitos. Entretanto, o benefício na redução de soroconversão ou prevenção da doença não está estabelecido (BRETT-MAJOR; LIPNICK; 2009).

2.9.2 Corticosteroides e Diálise

Em 30 pacientes de leptospirose grave, dos quais 13 não haviam recebido corticosteróides e os 17 restantes receberam um grama de metilprednisolona por três dias, seguidos de prednisolona por mais sete dias, a mortalidade caiu de 62% para 18% ($p < 0,02$). Dos oito pacientes com lesão pulmonar que receberam corticóides, cinco sobreviveram (mortalidade de 37%), enquanto dentre os nove com lesão pulmonar sem corticóides, apenas, um sobreviveu (mortalidade de 89%). Os corticosteroides só influenciaram o desfecho quando iniciados nas primeiras 12 horas após o acometimento pulmonar (SHENOY et al., 2006).

Um grupo do Sri Lanka trata desde 2008 seus pacientes com leptospirose grave com metilprednisolona parenteral por três dias consecutivos, seguida de corticoterapia oral por mais cinco dias. A mortalidade caiu de 21,8% para 10,7% ($p = 0,025$) (KULARATNE et al., 2011).

Falência de múltiplos órgãos, insuficiência respiratória aguda e insuficiência renal são as principais causas de mortalidade (ITTYACHEN et al., 2007). A insuficiência renal é a disfunção orgânica mais comum e sua intensidade é desproporcional às outras manifestações de sepse grave (VICKERY et al., 2006).

Em 33 pacientes com leptospirose em terapia intensiva foi observada redução da mortalidade no grupo que recebeu diálise diária à admissão (16,7%) em comparação ao grupo que recebeu diálise em dias alternados de início tardio (66,7%). A modalidade lenta e prolongada de hemodiálise mostrou-se tão eficaz quanto a hemodiálise intermitente em pacientes graves com instabilidade hemodinâmica (ANDRADE; CLETO; SEGURO, 2007). Não há consenso quanto à modalidade dialítica de escolha na leptospirose (ABDULKADER; SILVA, 2008).

2.10 Biomarcador de Lesão Endotelial (ICAM-1)

As Moléculas Intercelulares de Adesão (*Intercellular Adhesion Molecules* – ICAMs) são glicoproteínas transmembrana estruturalmente relacionadas entre si, pertencentes à superfamília das imunoglobulinas e que funcionam como sítios de ligação para as moléculas integrinas Beta-2 de leucócitos (ALMENAR-QUERALT et al., 1995; HUBBARD; ROTHLEIN, 2000).

Das cinco ICAMs identificadas, ICAM-1 é a mais bem estudada (KONING; SCHIFFELERS; STORM, 2002; MURO; MUZYKANTOV, 2005). ICAM-1 tem importante participação na migração de células inflamatórias, nas funções efetoras de leucócitos, na adesão de células apresentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cells* – APCs) aos linfócitos T, na patogênese microbiana, e nas vias de sinalização, atuando na transdução do sinal do exterior para o interior celular (ALMENAR-QUERALT et al., 1995; HUBBARD; ROTHLEIN, 2000; MURO; MUZYKANTOV, 2005).

ICAM-1 é amplamente distribuída em tecidos humanos e expressa de forma constitutiva em leucócitos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais vasculares. Apesar de estar presente em diversos tipos celulares, em ordem de magnitude, os seus níveis de expressão são maiores nas células endoteliais vasculares (ALMENAR-QUERALT et al., 1995; SCHOLZ et al., 1996; MOJCIK; SHEVACH, 1997; HUBBARD; ROTHLEIN, 2000; KONING; SCHIFFELERS; STORM, 2002; MURO et al., 2003, 2005; MURO; MUZYKANTOV, 2005).

Essa molécula de adesão está localizada tanto na superfície apical quanto na superfície basolateral de células endoteliais e, portanto, idealmente posicionada para facilitar a migração transendotelial de leucócitos. (ALMENAR-QUERALT et al., 1995). De fato, ICAM-1 é considerada uma das mais importantes moléculas de adesão para o recrutamento de leucócitos a tecidos inflamados (KONING; SCHIFFELERS; STORM, 2002).

Apesar da ICAM-1 ser firmemente ancorada à membranas celulares de células endoteliais, ela pode ser liberada na circulação na forma de uma molécula solúvel (sICAM-1), como resultado de clivagem por proteases de neutrófilos (elastase leucocitária e catepsina G) em um processo independente da sua densidade de expressão superficial (MURO; MUZYKANTOV, 2005).

A molécula solúvel sICAM-1 é facilmente mensurável no plasma e já foi estudada como marcador de doença renal, cardiovascular e cerebrovascular em diabéticos (FASCHING et al., 1996; KAWAMURA et al., 1998; GASIC et al., 1999; KADO; NAGATA, 1999; LIM et al., 1999; CLAUSEN et al., 2000; BECKER et al., 2002; GÜLER et al., 2002; WU; DEATH; YUE, 2004).

Esse marcador tem sua expressão induzida por uma série de condições: hiperglicemia (PARK et al., 2000), AGEs (BASTA et al., 2002), estresse oxidativo

(ONOZATO et al., 2004), hiperlipidemia (HATTORI et al., 1999) e hiperinsulinemia (OKOUCHI et al., 2002).

Embora seja expressa de forma estável na superfície endotelial, por estar funcionalmente envolvida, em condições inflamatórias têm sua expressão aumentada (ALMENAR-QUERALT et al., 1995; SCHOLZ et al., 1996; MOJCIK and SHEVACH, 1997; HUBBARD; ROTHLEIN, 2000; KONING; SCHIFFELERS; STORM, 2002; MURO et al., 2003, 2005; MURO ; MUZYKANTOV, 2005).

Nessas condições inflamatórias supracitadas ocorre estimulação de diversos tipos celulares por citocinas como Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-17 (IL-17), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e Interferon- γ (IFN- γ) levando a um importante aumento da expressão de ICAM-1 dentro das primeiras 24h (ALMENAR-QUERALT et al., 1995; SCHOLZ et al., 1996; FOSSIEZ et al., 1998; HUBBARD; ROTHLEIN, 2000; MURO et al., 2003, 2005; MURO; MUZYKANTOV, 2005). ICAM-1, uma vez induzida sua expressão, permanece exposta na superfície celular por 48h ou mais (KONING; SCHIFFELERS; STORM, 2002).

2.10.1 ICAM-1 na Lesão Renal

A resposta do endotélio renal às várias formas de lesão renal aguda é caracterizada por um padrão inflamatório. Portanto, lesão por isquemia-reperfusão resulta em uma indução da expressão de diferentes moléculas de adesão promovendo interações leucócito-endotélio. Essas moléculas de adesão incluem integrinas, selectinas e membros da superfamília das Imunoglobulinas, incluindo ICAM-1 (BONVENTRE; ZUK, 2004; GOLIGORSKY et al., 2010).

O aumento da expressão de ICAM-1 está relacionado à indução de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β (KELLY et al., 1994; 1996).

A superexpressão de ICAM-1 pelo endotélio vascular do rim isquêmico exerce um papel no desenvolvimento da disfunção renal, e a interrupção da produção de ICAM-1, seja através da administração de anticorpos neutralizantes anti-ICAM-1 ou através de manipulação genética para criar camundongos “*knockout*” para ICAM-1, resulta em proteção parcial do camundongo contra a lesão renal aguda isquêmica (KELLY et al., 1994; 1996).

O modelo animal mais utilizado para o estudo do Diabetes tipo 2, o camundongo *db/db*, apresenta uma doença renal progressiva muito parecida com a

observada em humanos diabéticos. Um estudo experimental com camundongos *db/db “knockout”* para o gene ICAM-1 resultou em redução da infiltração leucocitária renal glomerular e intersticial, redução da albuminúria em até 85% do esperado em animais de mesma idade, menor grau de lesão tubular e glomerular e redução da progressão para fibrose renal. Concluíram que camundongos deficientes em ICAM-1, com limitação na capacidade dos macrófagos em chegar ao tecido renal, apresentam redução no dano renal (CHOW et al., 2005).

Aumentos na expressão de ICAM-1 foram, também, observados na lesão renal aguda induzida por cisplatina e mercúrio. Anticorpos anti-ICAM-1 foram capazes de oferecer alguma proteção contra o dano renal causado pela cisplatina, embora o mesmo resultado não tenha sido demonstrado na lesão por mercúrio (KELLY et al., 1999; GHIELLI et al., 2000; DE GREEF et al., 2003).

A ativação de ICAM-1 representa um evento relativamente precoce na fisiopatologia da lesão, o que pode ser evidenciado pela grande atenuação do dano renal quando há administração precoce de anticorpos anti-ICAM-1, enquanto a administração tardia não demonstrou efeito protetor (KELLY et al., 1994; RABB et al., 1995; TAKADA et al., 1997).

2.10.2 ICAM-1 em Doenças Infecciosas

Concentrações séricas de sICAM-1 são mais elevadas em neonatos com sepse do que nos neonatos hospitalizados não-sépticos. O nível sérico diagnóstico para sepse neonatal foi de 228 ng/mL, resultando em sensibilidade de 76.7% e especificidade de 75.6% (ZAKI MEL-S; EL-SAYED, 2009; EDGAR et al., 2010).

Em crianças sépticas, os níveis de sICAM-1 também são superiores do que em outras crianças enfermas sem sepse ou em controles saudáveis, sendo preditores de mortalidade (WHALEN et al., 2000; PAIZE et al., 2012).

Na maioria dos estudos em adultos, os níveis de sICAM-1 no momento do diagnóstico da sepse são maiores do que os níveis correspondentes em pacientes críticos não sépticos ou em controles saudáveis (NEWMAN et al., 1993; SESSLER et al., 1995; CUMMINGS et al., 1997; KAYAL et al., 1998; KNAPP et al., 1998; STIEF et al., 2007).

Porém, em uma coorte prospectiva com 161 pacientes chegando a emergência com hipotensão não se encontrou nos 69 pacientes com sepse níveis

de sICAM-1 significativamente mais elevados em comparação aos que apresentavam hipotensão por outras etiologias (SCHUETZ et al., 2011).

Em dois estudos que envolveram pacientes críticos sépticos e pacientes com meningite, o nível sérico de ICAM-1 no momento do diagnóstico de sepse foi um preditor independente de mortalidade (KAYAL et al., 1998; MÉGARBANE et al., 2004).

Os níveis séricos considerados ideais como ponto de corte preditor de mortalidade ficam entre 715 e 800 ng/mL com sensibilidade variando de 71,4 a 90% e especificidade de 71,4 a 80% (WEIGAND et al., 1999; MÉGARBANE et al., 2004).

Alguns estudos contestam estes resultados. Em um deles com 92 pacientes com Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica, de causa infecciosa ou não, sICAM-1 não foi associado à mortalidade na análise multivariada. Em outro, com 147 indivíduos hospitalizados, as concentrações de sICAM-1 embora tenham sido maiores nos 101 com sepse grave, não se correlacionou com mortalidade (HOFER et al., 2009; DE PABLO et al., 2013).

Pacientes com malária grave por *P. falciparum* tem concentrações séricas maiores de sICAM-1 do que pacientes com malária leve (JAKOBSEN et al., 1994; TURNER et al., 1998).

Na Indonésia pacientes com malária não complicada por *P. vivax* tinham concentrações de sICAM-1 maiores do que aqueles com malária não complicada por *P. Falciparum*, ainda que os primeiros tivessem menor carga parasitária (JAKOBSEN et al., 1994).

Em crianças da Malásia, sICAM-1 foi capaz de se diferenciar entre malária cerebral e malária não complicada, mas não conseguiu diferenciar malária cerebral de outras doenças febris não maláricas que resultaram em alteração do estado de consciência (CONROY et al., 2010).

Em um estudo com 212 crianças com malária em Camarões, os níveis plasmáticos de sICAM-1 foram significativamente maiores entre os não-sobreviventes do que nos sobreviventes (TCHINDA et al., 2007). Em crianças de Uganda o resultado se repetiu e sICAM-1 foi o melhor preditor de desfecho para malária grave em crianças dentre os doze marcadores de ativação endotelial ou de inflamação testados. O ponto de corte foi estabelecido em 645.3 ng/mL, resultando em sensibilidade de 87% e especificidade de 75% para a predição de mortalidade em crianças com malária grave (ERDMAN et al., 2011).

Já foi descrita a ativação de endotélio vascular, por proteínas de membrana externa das espiroquetas *Borrelia sp.* e *Treponema sp.*, com resultante aumento da expressão endotelial de moléculas de adesão. Porém, os primeiros relatos de uma proteína leptospirótica capaz de aumentar a expressão de ICAM-1 foram através da clonagem de genes de lipoproteína de leptospira com função desconhecida e sua expressão proteica em cepas de *Escherichia coli* (VIEIRA et al., 2007; GÓMEZ et al., 2008).

As proteínas recombinantes codificadas rLIC10365, rLIC10507, rLIC10508 e rLIC10509 ativaram células endoteliais de culturas celulares de veias umbilicais humanas (HUVECs), levando a um aumento de expressão de ICAM-1 dose-dependente. Durante infecção experimental por *Leptospira interrogans* em modelo animal, as proteínas foram localizadas *in vivo* nos túbulos renais. Acredita-se que essas lipoproteínas sejam proteínas de membrana externa da *Leptospira* (VIEIRA et al., 2007; GÓMEZ et al., 2008).

Em um estudo conduzido na Tailândia e no Laos, os maiores níveis séricos de ICAM-1 solúvel foram encontrados na leptospirose, quando comparados a pacientes com tifo, dengue, febre tifóide e malária *falciparum* não complicada (PARIS et al., 2008).

2.11 Biomarcador de Lesão de Glicocálice (Sindecano-1)

Os sindecanos são uma família ancestral de proteínas transmembrana do tipo I modificadas por longas cadeias lineares de polímeros de carboidrato, chamados glicosaminoglicanos, resultando em proteoglicanos. Estão presentes em todos os animais multicelulares, nos mamíferos existem quatro diferentes tipos (CAREY, 1997; MULTHAUPT et al., 2009).

Estruturalmente, todos os sindecanos são compostos por um domínio extracelular, uma região transmembrana e um domínio citoplasmático (LAMBAERTS; WILCOX-ADELMAN; ZIMMERMANN, 2009).

O domínio extracelular é sempre substituído por cadeias de sulfato de heparano, embora alguns tenham adicionalmente galactosaminoglicanos, sulfato de condroitina ou sulfato de dermatan (DEEPA et al., 2004).

O sulfato de heparano é um carboidrato vital por ser essencial para o funcionamento tecidual em animais. As características estruturais das cadeias de

sulfato de heparano são responsáveis por interações com diversos fatores solúveis, moléculas e componentes da matriz celular. O que contribui para a capacidade da célula interagir com o seu microambiente ligando-se a fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas, moléculas da matriz extracelular, morfógenos, fatores de coagulação, inibidores de protease e algumas enzimas do metabolismo lipídico (HINKES; GALLO, 1993; BERNFIELD; ESKO; SELLECK, 2002; LAMBAERTS; WILCOX-ADELMAN; ZIMMERMANN, 2009).

Geralmente os sindecanos não funcionam como receptores primários, mas cooperam com outros receptores, em especial as integrinas, logo, são frequentemente chamados de co-receptores (LAMBAERTS WILCOX-ADELMAN; ZIMMERMANN, 2009; XIAN; GOPAL; COUCHMAN, 2010).

A clivagem mediada por proteases, dos domínios extracelulares intactos dos sindecanos (“*shedding*”) transforma as moléculas de superfície celular em agentes solúveis com efeitos na regulação do processo inflamatório (GÖTTE, 2003).

O Sindecano-1 é o membro mais bem estudado da família dos sindecanos, sendo identificado na literatura científica como: SDC1, CD 138, SDS, SYND1, Syndecan-1 ou Sindecano-1. Em tecidos adultos humanos é encontrado principalmente em células epiteliais e plasmócitos (INKI; JALKANEN, 1996; PALAIOLOGOU; DELLADETSIMA; TINIAKOS, 2013).

A sua imunoexpressão é modulada em uma grande variedade de afecções inflamatórias, infecciosas e fibróticas, incluindo a doença de Chron e o diabetes (DAY et al., 1999; PRINCIPI et al., 2006; PALAIOLOGOU; DELLADETSIMA; TINIAKOS, 2013; ZHANG et al., 2013).

Além disto, está envolvido em vias moleculares que estão desreguladas na carcinogênese como proliferação celular, apoptose, angiogênese, invasão tumoral e metástase (PALAIOLOGOU; DELLADETSIMA; TINIAKOS, 2013).

Age como um regulador multifuncional no microambiente tumoral. A forma solúvel também parece ter funções regulatórias nessas neoplasias (DHODAPKAR; SANDERSON, 1999).

Na transformação maligna de vários epitélios, sua expressão se reduz o que está de acordo com suas associações com a manutenção da morfologia epitelial, com o crescimento ancoragem-dependente e na inibição de invasividade in vitro (INKI; JALKANEN, 1996).

Ele é expresso em diversas neoplasias malignas do sistema hematopoético e tem importância diagnóstica na identificação de células com diferenciação plasmocítica (KOPPER; SEBESTYÉN, 2000).

Sindecano-1 se manifesta em um percentual significativo de cânceres de mama em alto nível e está relacionado a um fenótipo mais agressivo e com pior resposta clínica (BARBARESCHI et al., 2003).

Além disso, ele é um dos principais componentes do glicocálice endotelial, uma estrutura de relevância hidrodinâmica evidenciada in vivo em capilares, vênulas e arteríolas (SAVERY et al., 2013).

2.11.1 Sindecano-1 na Lesão Renal

A liberação de sindecano do glicocálice é estimulada in vitro por fatores pró-inflamatórios e ativada in vivo sob condições inflamatórias (BARTLETT; HAYASHIDA; PARK, 2007).

Pacientes em terapia dialítica apresentam maior penetração de eritrócitos no glicocálice, indicando uma redução de suas propriedades de “barreira”. Estes pacientes, também, apresentam níveis séricos aumentados de constituintes do glicocálice, inclusive sindecano-1, sugerindo a perda desses componentes (VLAHU et al., 2012).

No diabetes mellitus tipo 1, o aumento dos níveis séricos do Sindecano-1 está associado ao desenvolvimento precoce de nefropatia (SVENNEVIG; KOLSET; BANGSTAD, 2006). Entretanto, existem evidências que sua expressão possa prevenir a formação de cálculos de oxalato por integrar uma barreira com carga elétrica (CHIKAMA et al., 2002).

2.11.2 Sindecano-1 em Doenças Infecciosas

Sindecano-1 é o mais importante receptor para adesão do vírus da hepatite C à superfície dos hepatócitos e seus níveis séricos podem ser utilizados como preditores de fibrose hepática em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C (ZVIBEL et al., 2009; SHI; JIANG; LUO, 2013).

O sindecano-1 é capaz de modular a fusão de membrana induzida por Herpes Simplex Vírus tipo-1 (HSV-1) no seu processo de disseminação celular (KARASNEH; ALI; SHUKLA, 2011).

Um estudo avaliou a capacidade de adesão de partículas semelhantes a vírus (Vírus Like Particles - VLP) do Vírus do Papiloma Humano (HPV) a uma linhagem celular (K562) pobre em proteoglicanos de sulfato de heparana e clones desta capazes de expressar Glipicano-1, Sindecano-1 ou Sindecano-4. As VLP do HPV 16 aderiram muito mal a linhagem K562, mas a adesão foi aumentada nas outras linhagens, em especial na que expressa Sindecano-1, que também foi a que apresentou maior quantidade de proteoglicanos de sulfato de heparana (SHAFTI-KERAMAT et al., 2003).

O mesmo estudo comparou a infecção pelo *vírião* autêntico HPV 11 na linhagem K562 que exigiu um grande inóculo para atingir infectividade. Enquanto nas células com expressão ectópica de Sindecano-1, o inóculo necessário foi oito vezes menor, sugerindo seu papel como proteína receptora primária na história natural da infecção de queratinócitos pelo vírus do HPV 11 (SHAFTI-KERAMAT et al., 2003).

Em pacientes infectados pelo HIV, o Sindecano-1 está implicado no aumento da translocação bacteriana através da barreira epitelial intestinal, contribuindo para a ativação crônica do sistema imune. A expressão de Sindecano-1 e a translocação microbiana estão inversamente correlacionados à contagem de células T CD4 (SMITH et al., 2010).

2.12 Biomarcador de Lesão Tubular Renal

Em 1993 um grupo de pesquisadores identificou uma proteína de apenas 25-kDa, obtida a partir da purificação da gelatinase armazenada em grânulos específicos de neutrófilos. Essa nova proteína não correspondia a nenhuma proteína humana previamente identificada, mas tinha grande similaridade com as proteínas alfa2-microglobulina do rato e a proteína 24p3 (Uterocalina) do camundongo. Foi batizada de Lipocalina Associada à Gelatinase de Neutrófilos (*Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin* – NGAL) e classificada como uma nova integrante da superfamília das lipocalinas (KJELDSEN et al., 1993).

A NGAL, também chamada lipocalina 2 (lcn2) ou siderocalina (scn) é constitutivamente expressa em mielócitos e neutrófilos. Ela tem expressão aumentada nas células epiteliais em condições inflamatórias. Além das células epiteliais pulmonares, brônquicas e colônicas, a lipocalina também é expressada e secretada pelos hepatócitos e células tubulares renais. As condições patológicas que induzem sua expressão incluem: neoplasias, Lúpus Eritematoso Sistêmico, anemia, gravidez, doença renal crônica e, também, doenças cerebrovasculares e cardiovasculares (BORREGAARD; COWLAND, 2006; KALOUSEK; RÖSELOVÁ; OTEVRELOVÁ, 2006; RUBINSTEIN; PITASHNY; PUTTERMAN, 2008; CRUZ et al., 2012; MAKRIS et al., 2012).

O papel do NGAL nas neoplasias ainda é contraditório. Há evidências de que sua ação seria pró-tumoral, como observado nas neoplasias malignas de mama, estômago, esôfago e cérebro em humanos. A explicação estaria em suas funções como carreador intracelular de ferro e como inibidor da proteólise pela Metaloproteinase de Matriz 9 (MMP9). Em carcinomas da tireóide, o NGAL é induzido de forma potente por NF- κ B, que por sua vez está envolvido no crescimento tumoral e na ligação entre inflamação crônica e desenvolvimento de neoplasias. Por outro lado, alguns estudos demonstraram a capacidade do NGAL em inibir o fator pró-neoplásico HIF-1 alfa, a fosforilação da FA-Quinase e a síntese de VEGF, sugerindo que em algumas condições o mesmo possa ter efeito antitumoral e antimetastático em neoplasias de cólon, ovário e pâncreas (BOLIGNANO et al., 2010).

2.12.1 NGAL na Lesão Renal

NGAL é rápida e massivamente induzida no néfron em resposta à lesão do epitélio tubular renal, o que acarreta em desenvolvimento de ensaios laboratoriais para detectar dano renal em humanos (SCHMIDT-OTT et al., 2006).

NGAL passa livremente pela filtração da membrana glomerular e é reabsorvida por endocitose no tubulo proximal. Portanto, a NGAL quando detectada na urina é em sua maior parte produzida no néfron distal (HELÁNOVÁ et al., 2012).

Quando NGAL forma complexos triméricos com sideróforos e ferro, induz a transição mesênquima-epitelial (ou formação do néfron) no rim embrionário *in vitro* e protege o rim adulto da lesão por isquemia/reperfusão *in vivo*. Esses complexos

podem compreender um mecanismo fisiopatológico renoprotetor. Apesar da estrutura NGAL-sideróforo-ferro só ter sido elucidada até então para sideróforos sintetizados por bactérias, novas evidências sugerem a presença de moléculas mamíferas com estrutura similar a dos sideróforos (SCHMIDT-OTT et al., 2006).

O papel protetor estaria relacionado à regulação da apoptose por um mecanismo ferro dependente (RUBINSTEIN; PITASHNY; PUTTERMAN, 2008).

A NGAL sobe no plasma e urina antes (de 2 a 48 horas) da creatinina e mostra forte correlação com o seu aumento (DI GRANDE et al, 2009; MUSSAP et al., 2010).

A baixa especificidade pela sua expressão em diferentes condições mórbidas, as diversas formas moleculares e a falta de padronização dos imunoenaios disponíveis para sua quantificação no plasma e urina limitam a interpretação dos seus resultados (MAKRIS et al., 2012; GAGNEUX-BRUNON et al., 2012).

Apesar disso, tem emergido como um promissor biomarcador da lesão renal aguda devido cirurgia cardíaca, nefropatia por contraste, transplante renal, síndrome hemolítico-urêmica e sepse (DI GRANDE et al, 2009; ABASSI et al., 2011).

Alguns autores encontraram níveis ótimos para ponto de corte de NGAL plasmático entre 150 e 229 ng/mL (HAASE et al., 2009; PRABHU et al., 2010).

2.12.2 NGAL em Doenças Infeciosas

A análise da estrutura cristalina da NGAL expressa a partir de cepas de *E. coli* mostrou que NGAL tem habilidade de ligar-se a moléculas orgânicas chamadas sideróforos, que funcionam como quelantes com alta afinidade para ferro e, portanto, capazes de evitar a aquisição do ferro por bactérias que dependem dele para sua sobrevivência (BORREGAARD; COWLAND, 2006).

É a primeira proteína de mamíferos conhecida que se liga especificamente aos sideróforos (SCHMIDT-OTT et al., 2006).

Camundongos “*knockout*” para 24p3 (ortólogo do NGAL) tem suscetibilidade aumentada à infecção após injeção intraperitoneal da bactéria *E. Coli*. Este defeito pode ser mimetizado através da oferta de ferro ligado a sideróforos a camundongos do tipo selvagem, que por sua vez não pode ser sequestrado por

NGAL, demonstrando o papel específico da siderocalina como proteína da imunidade inata quelante de sideróforos (BORREGAARD; COWLAND, 2006).

A produção de NGAL é induzida de forma rápida e robusta na infecção por *Klebsiella pneumoniae* em camundongos, por uma via TLR4 dependente. A lipocalina 2 parece ser um componente crucial na defesa imune de mucosas contra bactérias patogênicas (CHAN et al., 2009).

A lipocalina, quando dosada no soro, é mais específica e sensível na distinção entre infecções bacterianas e virais do que a Proteína C Reativa (PCR). Com ponto de corte de 155 ng/mL, os valores preditivos positivo e negativo para o diagnóstico de infecções bacterianas chegam a 92 e 96%, respectivamente, superiores aos valores preditivos ótimos para PCR (XU; PAUKSEN; VENGE, 1995; XU; VENGE, 2000).

Em 2012 foi feita uma comparação por ensaio imunoenzimático entre as concentrações plasmáticas de NGAL em crianças com infecções bacterianas graves, crianças sem infecção bacteriana confirmada e controles saudáveis. As médias foram 287, 128 e 62 ng/ml respectivamente ($p < 0.05$). Também comparou-se as médias das concentrações plasmáticas em não-sobreviventes (306ng/ml) e sobreviventes (211ng/ml), com significância estatística ($p = 0,02$) (IRWIN et al., 2012).

Dentre uma análise de 88 líquidos céfalo-raquidianos de pacientes com suspeita de meningite bacteriana, 58 foram considerados positivos. Houve correlação estatisticamente significativa entre a concentração de NGAL e as contagens de polimorfonucleares e proteínas. Para o ponto de corte de 13 ng/mL, a dosagem de NGAL no líquido foi capaz de diagnosticar meningites bacterianas com sensibilidade e especificidade de 74,1 e 100% respectivamente (LIPPI et al., 2014).

Outro estudo, com pacientes em diálise peritoneal contínua (CAPD), demonstrou aumento dos níveis de NGAL no dialisado peritoneal nos três primeiros dias de peritonite e correlação com o aumento da contagem de neutrófilos. As dosagens foram ainda maiores nos pacientes com culturas positivas para bactérias gram-positivas ou gram-negativas (LEUNG et al., 2009).

Um estudo avaliou a capacidade da dosagem de NGAL no fluido peritoneal em diagnosticar peritonites agudas não-malignas, isoladamente ou associada à dosagem da desidrogenase láctica (LDH). Foram avaliados 111 fluidos peritoneais, dos quais 25 tinham contagem de leucócitos superior a 250/ μ L, critério

laboratorial compatível com peritonite bacteriana. Neles, os níveis de NGAL foram 3,7 vezes superiores aos dos controles e a sensibilidade e especificidade isoladas da NGAL foram, respectivamente, 96 e 75% com um valor de corte de 120 ng/mL. Quando associado à dosagem da LDH no fluido, com valor de corte de 227 U/L, a sensibilidade caiu para 77%, mas com aumento da especificidade para 95% (LIPPI et al., 2013).

Em outro estudo, através de análise imunohistoquímica foi evidenciado que na presença da bactéria *H. pylorii* há um aumento da expressão de NGAL nas bases e colo das criptas da mucosa do estômago, de forma independente da presença ou não de gastrite ($p=0,04$) (ALPÍZAR-ALPÍZAR et al., 2009).

A partir do exposto, surgiu a seguinte pergunta de partida: Quais os mecanismos envolvidos na Lesão Renal Aguda da Leptospirose?

Como hipóteses do estudo, tem-se: 1. A Lesão Renal Aguda (LRA) é uma complicação frequente na Leptospirose. 2. O dano endotelial renal contribui para a LRA na Leptospirose. 3. O dano do glicocálice contribui para a LRA na Leptospirose. 4. O dano tubular contribui para a LRA na Leptospirose.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Verificar a presença de lesão renal em um grupo de pacientes com leptospirose; e estabelecer sua relação com a ocorrência de lesão endotelial, do glicocálice endotelial e tubular.

Objetivos Específicos

Determinar a presença de lesão renal aguda e classificá-la conforme protocolo “Kidney Disease Improving Global Outcome (KDIGO), utilizando as variações da creatinina sérica como parâmetro.

Verificar a relação entre a lesão endotelial, representada pelos valores do biomarcador sérico ICAM-1, e as variações da creatinina sérica.

Verificar a relação entre a lesão do glicocálice endotelial, representada pelos valores do biomarcador Sindecano-1, e as variações da creatinina sérica.

Verificar a relação entre a lesão tubular, representada pelos valores do biomarcador NGAL, a presença de lesão renal e as variações da creatinina sérica.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo de Coorte, observacional e analítico.

4.2 Caracterização do local de estudo

Foram estudados pacientes clinicamente tratados no Hospital Geral de Fortaleza (HGeF), Ceará, Brasil, com diagnóstico laboratorial confirmado de leptospirose pelo Laboratório Central do Estado do Ceará (LACEN-CE).

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo: Pacientes tratados no Hospital Geral de Fortaleza (HGeF) com diagnóstico de leptospirose confirmado laboratorialmente pelo LACEN em 2011. Foram excluídos do estudo: Pacientes com menos de três registros de creatinina sérica em prontuário e pacientes sorologicamente negativos para leptospirose.

4.4 Diagnóstico da leptospirose

Foram realizados em todos os pacientes sorologia por IgM-Elisa (kit *PanBio*) e Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) com 19 diferentes sorovariantes de *Leptospiras*. A Secretaria de Saúde do Estado do Ceará colheu amostras de soro de todos os sujeitos três semanas após a convalescença. IgM-ELISA e MAT foram executados, respectivamente, pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) e pela FIOCRUZ.

Os casos positivos foram definidos como provável (Títulos de MAT maiores que 200 e menores que 800 em uma amostra de soro) ou confirmado (aumento de quatro ou mais vezes nos títulos de aglutinação entre amostras de soro da fase aguda e convalescença, ou títulos maiores que 800 em uma amostra isolada) conforme critérios laboratoriais do Centro para Controle e Prevenção de

Doenças (CDC) Norte-Americano. Outras doenças infecciosas, como Hepatite A, dengue e febre tifóide foram excluídas.

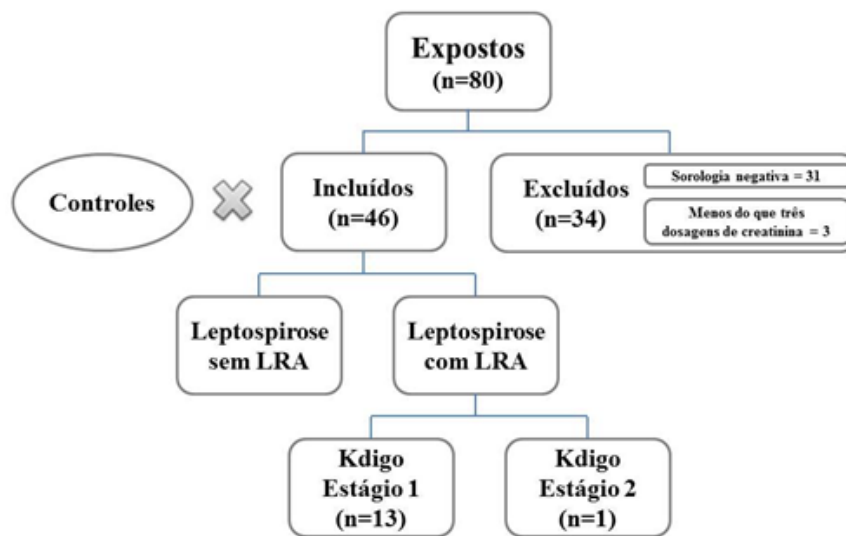
4.5 População de estudo

Neste estudo, foram avaliados militares envolvidos em um surto de leptospirose. Durante quatro dias, 83 pessoas foram submetidas a atividades de treinamento militar em uma área silvestre. Por motivos pessoais, três militares abandonaram a atividade antes de qualquer exposição no campo, restando apenas 80 militares.

Entre as atividades militares, aquelas que envolveram a maior exposição de pele ou membranas mucosas à água ou solo contaminado com *Leptospiras* foram realizadas no segundo e terceiro dias de treinamento. Nestes dois dias, atividades com imersão em água ou lama foram realizadas, como transposição de cursos de água e exercícios de “rastejo” rente ao solo. No rastejo, os militares se deslocaram rente ao solo úmido, apoiados sobre os antebraços e pernas, resultando em imersão em lama. Naquele local havia acúmulo de água parada, provavelmente contaminadas com excretas de animais urbanos e silvestres, em função dos altos índices pluviométricos observados à época.

Dos 80 indivíduos expostos à *Leptospira* na execução destas atividades, 49 casos foram laboratorialmente confirmados como Leptospirose. Destes 49, três pacientes foram excluídos do estudo por não terem registros de pelo menos três dosagens distintas de creatinina plasmática. Restaram 46 pacientes que foram incluídos na análise final.

Figura 2 – População de estudo.



Fonte: elaborada pelo autor.

O grupo de estudo foi comparado com um grupo controle composto por 14 indivíduos civis sadios sem histórico de leptospirose, não expostos ao campo de 2011, com faixa etária semelhante a dos pacientes estudados.

Uma equipe de médicos militares foi responsável por prestar cuidados aos pacientes. Eles decidiram sobre a necessidade ou não de hospitalização, solicitação de exames complementares e terapia antimicrobiana.

Sintomas e sinais encontrados ao exame físico e testes laboratoriais de rotina foram extraídos dos prontuários médicos de forma retrospectiva. Amostras de soro coletadas à primeira avaliação de cada paciente foram processadas e armazenadas a -70°C para análises posteriores.

4.6 Coleta do material biológico

Dos controles saudáveis foram coletados 3 mL de sangue, por punção venosa, utilizando tubos BD SST® II Advance® com ativador de coágulo, que acelera o processo de coagulação, e gel separador para a obtenção de soro após a centrifugação. As amostras de soro foram identificadas, aliquotadas e uma parte congelada em freezer a -70°C . Os controles estavam com pelo menos 4 horas de jejum antes da coleta do material.

Para a coleta do material bioológico foram considerados a identificação da amostra (Nome, idade, profissão); o tempo de incubação (Tempo decorrido entre a exposição provável e o primeiro sintoma).

Além disso, a Avaliação e Classificação da Lesão Renal Aguda. A Lesão Renal Aguda (LRA) foi definida de acordo com os padrões da iniciativa *Kidney Disease Improving Global Outcome* (KDIGO). De forma resumida, alterações da creatinina sérica (Δ SCr) durante o tratamento hospitalar foram calculadas e a LRA era diagnosticada a partir de um aumento de 50% no seu valor basal, bem como no caso de aumento superior ou igual a 0.3 mg/dL dentro de um intervalo de até 48h entre as coletas.

Quanto à gravidade da lesão, foi classificada em estágio 1, quando o aumento da creatinina sérica era limitado a 100% do valor basal. Em estágio 2, quando o aumento correspondia a 101 a 200% do valor e em estágio 3, quando maior que 200%.

O valor basal foi considerado como o menor valor registrado durante o acompanhamento hospitalar e a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) foi calculada através da fórmula CKD-EPI. Adicionalmente, a diferença entre a maior e a menor SCr (Δ SCr) foi considerada um marcador de gravidade da LRA.

Foram utilizados para os métodos analíticos: ICAM-1, Sindecano-1 e NGAL. Os três biomarcadores foram quantificados através da técnica do ELISA (*Enzyme-linked immuno sorbent assay*) sanduíche utilizando os kits comercialmente disponíveis para Sindecano-1 da *ABCAM Co.* (Cambridge, MA, EUA), para ICAM-1 da *INVITROGEN Co.* (Frederick, MD, EUA), e para NGAL da *BOSTER BIOLOGICAL TECHNOLOGY Co., Inc.* (Fremont, CA, EUA). Todos os exames foram realizados a partir de amostras de soro. A técnica do ELISA sanduíche se baseia na quantificação dos antígenos através de sua ligação com anticorpos específicos adsorvidos na placa de 96 poços (placa sensibilizada e fornecida pelo fabricante). Foram seguidos os procedimentos de acordo com as normas do fabricante.

Também utilizou-se a Proteína-C reativa de alta sensibilidade (hs-PCR). Determinados pelo método de imunoturbidimetria automatizado (Cobas C 111, Roche®). Os valores de Creatinina Sérica, Hemoglobina, Leucometria, Plaquetometria e Aminotransferases extraídos de registros de prontuário.

E, por fim, a Quantificação do Malonaldeído (MDA) sérico. O método empregado para determinação do MDA em amostras biológicas foi baseado na sua

reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nesta reação, duas moléculas de TBARS reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar um cromóforo róseo que tem absorvância máxima em solução ácida 535 a 560 nm (DRAPER; HADLEY, 1990).

4.7 Análise estatística

As análises foram realizadas por meio do software SPSS para Windows versão 19.0 (*SPSS Inc.* Chicago, IL, USA).

As variáveis foram testadas para distribuição normal. Variáveis contínuas foram descritas como medianas e interquartis. Dados contínuos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Dados categóricos foram descritos como proporções e comparados usando o teste exato de Fischer. As correlações foram realizadas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. Duas análises de regressão linear múltipla foram realizadas para identificar os fatores independentes associados com os marcadores de lesão renal aguda (Δ SCr and NGAL).

Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes para todas as comparações.

4.8 Aspéctos éticos da pesquisa

O protocolo desse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas sob parecer de nº: 783.272 (ANEXO A).

5 RESULTADOS

Todos os indivíduos eram do sexo masculino, entre 18 a 24 anos de idade, com uma mediana de 21 [19 – 23] anos. Nenhum dos pacientes tinha comorbidades. A taxa de filtração glomerular estimada basal era maior que 80mL/min em todos os casos. Nos pacientes com LRA, a taxa de filtração glomerular estimada basal foi definida como seu momento de melhor função renal, com menor valor de creatinina plasmática, seja antes da lesão ou após sua recuperação.

O caso índice relatou o início dos sintomas a partir de cinco dias após a exposição e os sintomas do último acometido foram relatados 21 dias após a exposição. Os sintomas mais comuns foram cefaléia (98%), mialgia, febre e prostração (96,1%), vômitos, diarreia, dor nas panturrilhas (30%) e dor abdominal (17,1%). Os dados laboratoriais são apresentados na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 – Dados clínicos e laboratoriais em função da lesão renal aguda.

	Grupo Controle (Expostos) N = 31	Todos os pacientes N = 46	Valor de P	Pacientes (Leptospirose) sem LRA	Pacientes (Leptospirose) com LRA	Valor de P
Idade (Anos)	21.3 ± 1.7	21.3 ± 1.7	0.645	21.5 ± 1.3	20.8 ± 1.9	0.911
TFG basal (mL/min/1,73m ²)	104.1 ± 10.2	102.6 ± 12.5	0.896	104.1 ± 13.1	99.2 ± 9.8	0.769
Hemoglobina (g/dL)	13.1 ± 1.7	11.7 ± 2.4	0.011	11.5 ± 3.4	12.0 ± 0.9	0.596
Leucócitos (células/mm ³)	6.3 ± 2.0	11.9 ± 2.9	<0.001	12.2 ± 3.4	11.6 ± 2.5	0.784
Plaquetometria (/μL)	212.6 ± 26.4	155.4 ± 39.1	<0.001	159.3 ± 39.9	150.1 ± 40.8	0.573
Alanina Aminotransferase (U/L)	26.2 ± 9.4	106.9 ± 50.7	<0.001	113.9 ± 49.8	95.8 ± 55.0	0.369
Creatinoquinase (U/L)	72.9 ± 28.1	171.4 ± 57.2	<0.001	104.6 ± 73.9	263.6 ± 81.5	0.062
hs-PCR (mg/dl)	3.9 ± 3.4	110.0 ± 30.9	<0.001	109.0 ± 66.1	111.1 ± 58.3	0.940
Malondialdeído	3.5 ± 1.8	9.5 ± 2.7	<0.001	8.9 ± 2.6	10.6 ± 2.6	0.081
ICAM-1 (mg/L)	234.9 ± 24.4	483.1 ± 31.7	<0.001	434.9 ± 35.3	576.9 ± 70.4	0.034
Sindecano-1 (ng/mL)	21.2 ± 7.9	73.7 ± 15.9	<0.001	41.5 ± 11.7	112.1 ± 45.4	0.021
NGAL (ng/mL)	32.3 ± 9.7	139.4 ± 22.2	<0.001	139.3 ± 22.6	139.8 ± 22.0	0.952

LRA: lesão renal aguda; TFG: taxa de filtração glomerular; hs-PCR: proteína C reativa de alta sensibilidade; ICAM-1: molécula de adesão intercellular tipo 1; NGAL: lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos; Significativo: p < 0,05.

Do total de 46 pacientes, 17 (36,9%) tinham anemia e 16 (34,8%) apresentaram plaquetometria inferior aos limites da normalidade. Lesão Renal Aguda foi diagnosticada em 14 pacientes (30,4%), e todos tinham a forma menos grave de lesão renal pelo padrão KDIGO (estágio 1) à exceção de um paciente, classificado como estágio 2. Nenhum dos pacientes exteriorizou hemorragia pulmonar. Todos foram tratados com Ceftriaxona.

Pacientes com leptospirose tinham níveis séricos mais elevados de ICAM-1 (483,1 ± 31,7 vs. 234,9 ± 24,4 mg/L; p < 0,001) e de Sindecano-1 (73,7 ± 15,9 vs. 21,2 ± 7,9 ng/mL; p < 0,001) do que controles expostos sem leptospirose (Tabela 1).

Não foi observada correlação significativa entre ICAM-1 ou Sindecano-1 com os níveis de proteína C reativa de alta sensibilidade (hs-PCR), Malondialdeído (MDA), níveis de hemoglobina, creatinoquinase (CK) ou plaquetometria (Tabela 2).

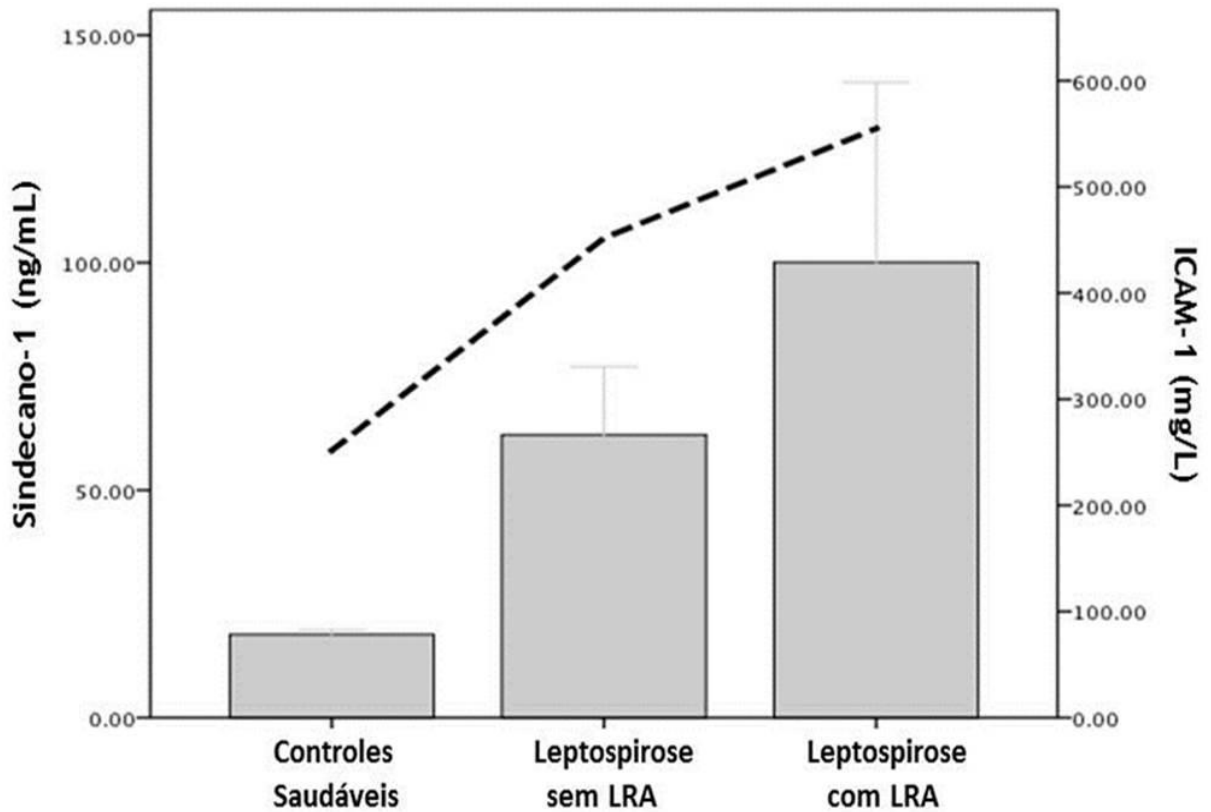
Tabela 2 – Correlação entre marcadores de lesão renal e endotelial e outros parâmetros laboratoriais.

Parâmetro Laboratorial	ICAM-1		Sindecano-1	
	Coefficiente de correlação de Pearson	<i>p</i>	Coefficiente de correlação de Pearson	<i>p</i>
Hemoglobina	0,086	0,676	-0,087	0,673
Leucócitos	0,005	0,979	0,167	0,414
Plaquetometria	0,035	0,864	-0,082	0,689
Creatinoquinase (CK)	-0,002	0,994	-0,026	0,867
Varição da Creatinina Sérica (Δ SCr)	0,388	0,016	0,416	0,009
NGAL	0,309	0,059	0,469	0,003
hs-PCR	0,128	0,444	0,184	0,269
Malondialdeído	0,169	0,309	0,094	0,573

hs-PCR: proteína C reativa de alta sensibilidade; ICAM: molécula de adesão intercelular; NGAL: lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos; Significativo: $p < 0,05$.

Pacientes com LRA induzida pela Leptospirose apresentaram níveis elevados de Sindecano-1 ($112,1 \pm 45,4$ vs. $41,5 \pm 11,7$ ng/mL, $p=0,021$) e ICAM-1 ($576,9 \pm 70,4$ vs. $434,9 \pm 35,3$, $p=0,034$) quando comparados aos pacientes com Leptospirose sem LRA (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Dosagem de Sindecano-1 e ICAM-1 por grupos.

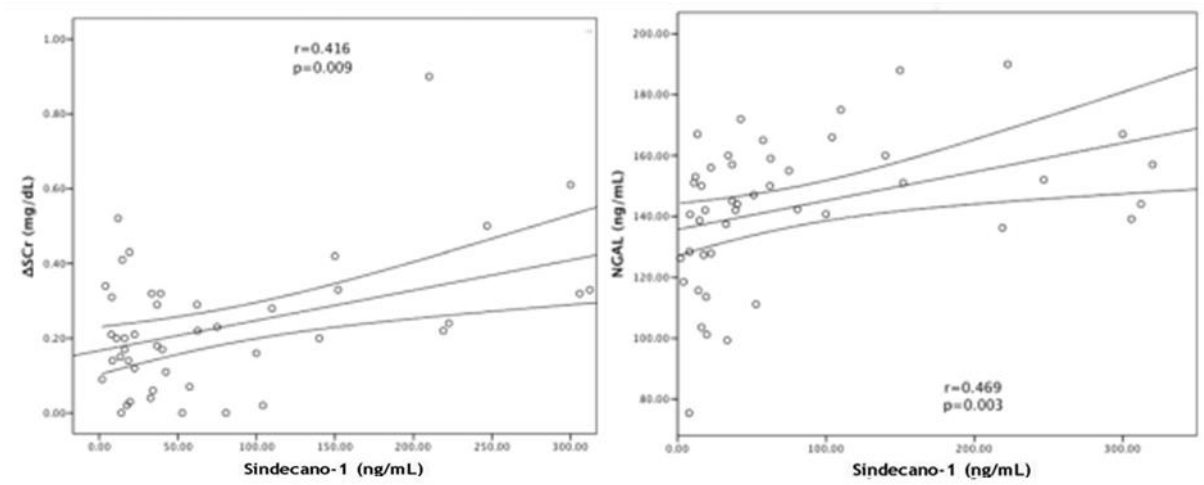


Fonte: elaboração do autor.
Colunas: Sindecano-1; Linha tracejada: ICAM-1.

Houve correlação significativa entre os níveis séricos de ICAM-1 e Sindecano-1 ($r = 0,629$, $p < 0,0001$).

Também verificou-se importante associação entre Sindecano-1 e ICAM-1 com variações da Creatinina Plasmática, tanto em valores absolutos quanto relativos, em relação à Creatinina Plasmática basal (Tabela 2 e Gráfico 4).

Gráficos 4 e 5 – Correlação entre Sindecano-1 e variação da Creatinina Sérica e entre Sindecano-1 e NGAL.

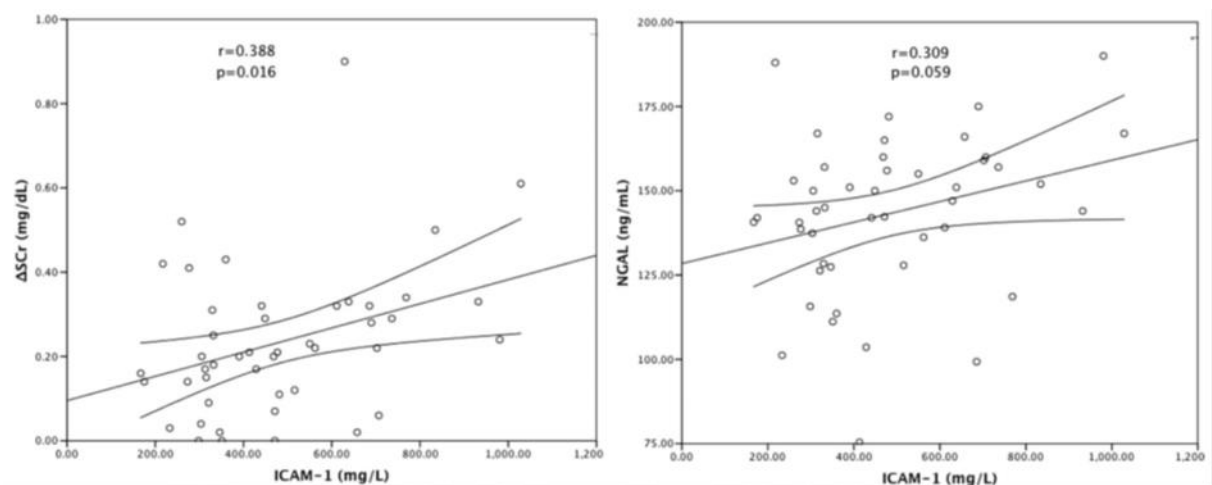


Fonte: elaborada pelo autor.

NGAL obteve valores semelhantes nos pacientes de leptospirose com ou sem LRA ($139,8 \pm 22,0$ vs. $139,3 \pm 22,6$; $p = 0,952$) (Tabela 1) e não houve associação significativa entre NGAL e Δ SCr.

Apesar de não se identificar correlação entre NGAL e a presença de LRA, houve correlação positiva entre Sindecano-1 e NGAL ($r = 0,469$, $p = 0,003$) (Tabela 2 e Gráfico 5).

Gráficos 6 e 7– Correlação entre ICAM-1 e variação da Creatinina Sérica e entre ICAM-1 e NGAL.



Fonte: elaboração do autor.

Identificou-se uma tendência de correlação positiva entre ICAM-1 e NGAL ($r = 0,309$, $p = 0,059$) (Tabela 2 e Gráfico 7).

Na exploração da associação entre Sindecano-1, ICAM-1 e lesão renal, modelos de análise de regressão linear multivariada foram aplicados para avaliar a associação independente entre estes marcadores e os valores da variação da Creatinina Sérica (Δ SCr) e de NGAL.

Nesses modelos foram incluídas todas as variáveis potencialmente associadas com LRA na Leptospirose: *status* inflamatório (leucometria e hs-PCR), estresse oxidativo (MDA), rbdomiólise (CK), enzimas hepáticas séricas e contagem de plaquetas.

Tabela 3 – Análise Multivariada.

Variável	Coefficiente β	Valor de P
Variável dependente: Δ SCr		
Sindecano-1 (ng/mL)	0,682	0,021
ICAM-1	0,560	0,032
Hemoglobina (g/dL)	0,077	0,793
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	-0,224	0,479
Plaquetometria ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	-0,729	0,484
Alanina Aminotransferase (U/L)	-1,550	0,160
Creatinoquinase (U/L)	1,095	0,305
hs-PCR	0,145	0,613
Malondialdeído	-0,043	0,893
Variável dependente: NGAL		
Sindecano-1 (ng/mL)	0,600	0,034
ICAM-1	0,480	0,047
Hemoglobina (g/dL)	-0,102	0,738
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0,145	0,683
Plaquetometria ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0,234	0,444
Alanina Aminotransferase (U/L)	-0,097	0,730
Creatinoquinase (U/L)	0,432	0,108
hs-PCR	-0,101	0,712
Malondialdeído	0,149	0,629

hs-PCR: proteína C reativa de alta sensibilidade; NGAL: lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos; Δ SC: Variação da creatinina sérica. Significativo: $p < 0,005$.

Mesmo com a inclusão de todas as variáveis, Sindecano-1 e ICAM-1 permaneceram associados de forma independente Δ SCr e NGAL (Tabela 3).

6 DISCUSSÃO

Os pacientes foram selecionados a partir de um surto de leptospirose entre militares que aconteceu no nordeste brasileiro em 2011, o que fortalece o estudo em dois aspectos: o grupo de pacientes era bastante homogêneo (mesmo sexo, mesma faixa etária e ausência de comorbidades). Como todos os indivíduos expostos foram submetidos a avaliação clínica e laboratorial, não houve viés de seleção em relação à gravidade da doença. Apesar de todos terem sido submetidos ao mesmo tipo de exposição, a carga de inoculação de *Leptospiras* não foi necessariamente similar e presença e intensidade de lesões traumáticas no tegumento pode ter influenciado a taxa de ataque.

Nenhum paciente, neste estudo, apresentou a forma grave da doença. Todos apresentaram formas brandas de leptospirose. De acordo com a definição de leptospirose grave (presença de pelo menos um dos seguintes critérios: lesão renal aguda com indicação de terapia de substituição renal, choque tratado com drogas vasoativas, hemorragia alveolar, sangramento que exija reposição volêmica com hemoderivados, insuficiência respiratória com necessidade de ventilação mecânica ou morte durante a internação hospitalar) (TUBIANA et al., 2013).

Para caracterização da lesão renal aguda utilizamos o padrão KDIGO, sensível e validado em diversos estudos para predição de desfecho clínico. Entre os indivíduos estudados, aproximadamente 30% (14) desenvolveram algum grau de LRA, sendo 13 no estágio 1 e apenas um indivíduo no estágio 2. A literatura descreve lesão renal aguda em 44% a 67% dos pacientes com leptospirose (SITPRIJA; LOSUWANRAK; KANJANABUCH, 2003). Essa diferença, provavelmente, explica-se pela ausência de viés de seleção: neste estudo todos os infectados foram avaliados. Em estudos retrospectivos hospitalares casos subclínicos que não chegam ao hospital não são incluídos. Além disso todos os pacientes eram jovens, previamente saudáveis com doença leptospirótica branda.

Nesta pesquisa, pela primeira vez, os biomarcadores de lesão endotelial, foram estudados, em humanos com leptospirose. Encontrou-se importante associação entre lesão endotelial, sobretudo do glicocálice, com presença e gravidade da lesão renal. Houve correlação tanto com a redução da taxa de filtração glomerular (representada pela Δ SCr) quanto com marcadores de lesão tubular proximal (NGAL).

Embora seja reconhecido o potencial da leptospirose em induzir inflamação vascular, poucos estudos avaliaram o papel do endotélio na fisiopatologia da doença. O dano endotelial capilar causado pela leptospirose foi descrito há quase quatro décadas, sendo considerado fator mais importante para os sangramentos do que os distúrbios de coagulação (JAROONVESAMA, VIRANUVATTI, CHAROENLARP, 1975).

Em um estudo experimental clássico foi demonstrado edema endotelial e trombose microvascular em porcos-da-índia infectados por leptospira. Em nível celular, retículos endoteliais e mitocôndrias estavam aumentados, além de junções abertas, como lesões iniciais, com progressão para necrose endotelial (DE BRITO; BÖHM; YASUDA, 1979).

Um grupo de pesquisadores descreveu em 2007 que uma proteína de membrana externa de *Leptospira* ativa células endoteliais *in vitro*, fenômeno observado previamente em outras espiroquetas: *Borrelia sp.* e *Treponema sp.* O gene LIC10365 foi clonado para expressar a sua proteína recombinante em cepas de *Escherichia coli*. A seguir, culturas de Células Endoteliais de Veias Umbilicais Humanas (HUVEC) foram expostas a esta proteína, que ativou o endotélio e induziu a expressão de ICAM-1 de forma dose-dependente. A proteína codificada por LIC10365 também foi identificada em animais durante infecção experimental por *Leptospira interrogans* (VIEIRA et al., 2007).

Aumentos na expressão de ICAM-1 são observados na lesão aguda do endotélio renal induzido por diversos mecanismos, como isquemia-reperfusão (BONVENTRE; ZUK, 2004; GOLIGORSKY et al., 2010); cisplatina (KELLY et al., 1999) e mercúrio (GHIELLI et al., 2000).

Neste trabalho a leptospirose elevou os níveis de ICAM-1 solúvel *in vivo* em relação aos controles saudáveis ($p=0,011$). Pacientes com leptospirose e LRA apresentaram níveis ainda mais elevados do que aqueles sem LRA ($p=0,034$) (Figura 3).

Apesar de também se elevar em outras condições além da LRA, como hiperglicemia (PARK et al., 2000), hiperlipidemia (HATTORI et al., 1999), hiperinsulinemia (OKOUCHI et al., 2002) doença renal, cardiovascular e cerebrovascular em diabéticos (FASCHING et al., 1996; KAWAMURA et al., 1998/ GASIC et al., 1999; KADO; NAGATA, 1999; LIM et al., 1999; CLAUSEN et al., 2000; BECKER et al., 2002; GÜLER et al., 2002; WU; DEATH; YUE, 2004), nosso grupo

de pacientes era previamente hígido, sem qualquer comorbidade reconhecida. Este ponto simplifica e fortalece a interpretação dos valores de ICAM-1 encontrados nos pacientes com leptospirose.

O Sindecano-1 é um dos principais componentes do glicocálce endotelial e a clivagem de seus domínios extracelulares libera sua forma solúvel no plasma (GÖTTE, 2003; SAVERY et al., 2013). Sua imunoexpressão, liberação do glicocálce e níveis séricos aumentam em condições inflamatórias ou que cursam com lesão do glicocálce endotelial, como na terapia hemodialítica crônica (DAY et al., 1999; PRINCIPI et al., 2006; BARTLETT; HAYASHIDA; PARK, 2007; VLAHU et al., 2012; PALAIOLOGOU; DELLADETSIMA; TINIAKOS, 2013; ZHANG et al., 2013).

Até onde sabemos, nosso estudo é o primeiro a descrever a lesão do glicocálce endotelial na leptospirose humana. Os níveis séricos de Sindecano-1 em pacientes com leptospirose foram mais elevados do que em controles saudáveis ($p = <0,001$; tabela 1 e figura 3). Nos pacientes com LRA induzida pela leptospirose, os níveis de Sindecano-1 foram ainda maiores do que nos pacientes com leptospirose sem LRA ($p=0.021$) (Tabela 1 e Figura 3). Mais interessante é o fato de que tais alterações puderam ser observadas mesmo na forma mais branda da leptospirose.

A migração da *Leptospira* para os tecidos do hospedeiro envolve a sua adesão e saída dos vasos. Recentemente foi descrita a adesão da *Leptospira* às Caderinas do endotélio vascular (EVANGELISTA et al., 2014.), cuja importância reside na manutenção das propriedades da barreira bascular. A adesão da *Leptospira* à vasculatura mediada pelas Caderinas pode resultar em dano vascular, facilitando o escape do patógeno da corrente sanguínea para uma variedade de tecidos. Podemos especular que as lesões do glicocálce e do endotélio ocorram durante esta translocação; e que os biomarcadores endoteliais sejam marcadores da gravidade da doença nos rins e em outros órgãos.

Essas especulações estão de acordo com os achados de outros pesquisadores, de que a partir da adesão das leptospiros patogênicas às células endoteliais, há ruptura da integridade das camadas celulares (à microscopia) e conseqüente comprometimento de sua função de barreira, promovendo a disseminação do patógeno e contribuindo para as manifestações da doença (MARTINEZ-LOPEZ; FAHEY; COBURN, 2010).

Alternativamente, podemos supor que a lesão do glicocálce e do endotélio ocorram antes da adesão e translocação da espiroqueta, favorecendo a

disseminação do patógeno. Essas hipóteses não podem ser testadas a partir da nossa pesquisa, devido ao desenho do estudo.

A significativa correlação encontrada entre os níveis séricos de ICAM-1 e Sindecano-1 ($r=0,629$, $p < 0,0001$) caracteriza a lesão endotelial e de seu glicocálice na leptospirose, mas em virtude do desenho de nosso estudo, estas hipóteses não podem ser exploradas.

Os órgãos mais gravemente afetados na leptospirose são os rins, fígado e pulmões. Na população do estudo, nenhum paciente teve manifestações pulmonares ou falência hepática, mas quase todos tiveram elevações moderadas de enzimas hepáticas e aproximadamente 30% apresentaram Lesão Renal Aguda pelos critérios KDIGO. Exceto um paciente apresentou a forma mais branda de LRA e teve correlação positiva entre Sindecano-1 e ICAM-1 com as variações da creatinina sérica (ΔSCr).

Esse achado corrobora com a participação da ativação e lesão do endotélio na fisiopatologia da Lesão Renal Aguda da Leptospirose. Ressalta-se que a *Leptospira* afeta principalmente as células dos túbulos renais proximais após transmigração através da rede capilar peritubular. Sendo assim, para melhor esclarecer essa associação, mensurou-se o marcador renal que é mais específico para a lesão tubular proximal (NGAL) e se identificou correlação positiva apenas com Sindecano-1.

Após utilizar vários achados laboratoriais como controles, Sindecano-1 (mas não ICAM-1) manteve associação com a gravidade da LRA. Logo, atenta-se para a potencial participação, ainda não explorada, do glicocálice endotelial na LRA associada à Leptospirose. Somente dois estudos avaliaram níveis séricos de Sindecano-1 em pacientes com doença renal. No primeiro, pacientes em terapia de substituição renal de manutenção (hemodiálise) tinham níveis de Sindecano-1 mais elevados do que os controles (VLAHU et al., 2012). O outro estudo foi capaz de excluir qualquer efeito acumulativo de Sindecano-1 na circulação em função da redução do *clearance* renal (PADBERG et al., 2014). Portanto, é improvável que a redução isolada da TFG seja responsável pelo incremento nos níveis séricos de Sindecano-1.

Embora não fosse o foco principal, ressalta-se a ausência de correlação entre NGAL e LRA, refutando resultados de estudos anteriores.

Já foi demonstrada a elevação dos níveis séricos de NGAL em uma variedade de condições, como lúpus eritematoso sistêmico, peritonites infecciosas, gravidez, doença renal crônica, anemias, neoplasias, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares. Também é útil para o diagnóstico diferencial de infecções bacterianas (XU; PAUKSEN; VENGE, 1995; XU; VENGE, 2000; KALOUSEK; RÖSELOVÁ; OTEVRELOVÁ, 2006; RUBINSTEIN; PITASHNY; PUTTERMAN, 2008; CRUZ et al., 2012; IRWIN et al., 2012; MAKRIS et al., 2012; LIPPI et al., 2013). NGAL se eleva no plasma até 48 horas antes da creatinina e se correlaciona ao seu aumento (DI GRANDE et al., 2009; MUSSAP et al., 2010).

Embora não se tenha encontrado, neste trabalho, correlação entre as elevações de NGAL e a LRA, do total de 46 pacientes com leptospirose com e sem LRA, 33 (71,73%) tinham níveis séricos de NGAL superiores a 135 ng/mL. As pesquisas com NGAL utilizaram pontos de corte que variaram de 120 e 229 ng/mL. Um trabalho encontrou médias de NGAL plasmática de 287, 128 e 62 ng/ml, respectivamente, em grupos de crianças com infecções bacterianas graves, crianças enfermas sem confirmação de infecção bacteriana e controles saudáveis (HAASE et al., 2009; IRWIN et al., 2012; LIPPI et al., 2013; PRABHU et al., 2010; XU; PAUKSEN; VENGE, 1995 ; XU; VENGE, 2000).

É possível que a Leptospirose promova elevações da NGAL plasmática independentemente da ocorrência de LRA, tornando-a menos útil na diferenciação entre pacientes com e sem LRA, em especial nos estágios iniciais.

Apoiam essa hipótese, a correlação positiva obtida entre NGAL e Sindecano-1 ($r = 0,469$, $p = 0,003$) e a tendência de correlação positiva entre NGAL e ICAM-1 ($r = 0,309$, $p = 0,059$).

A produção de NGAL é induzida de forma rápida e robusta na defesa imune contra bactérias patogênicas por uma via dependente do receptor 'Toll-like' tipo 4 (TLR4). Parece atuar ligando-se e tornando inativos os sideróforos bacterianos (quelantes com alta afinidade para ferro), impedindo a obtenção de ferro por bactérias (BORREGAARD; COWLAND, 2006; CHAN et al., 2009). Porém, o TLR4 monocítico humano parece incapaz de ser ativado por lipopolissacarídeos (LPS) de leptospirosas (WERTS et al., 2001; LEE et al., 2002; QUE-GEWIRTH et al., 2004; NAHORI et al., 2005), o que poderia também limitar as elevações da NGAL plasmática na leptospirose.

A Lesão Renal Aguda na leptospirose também é associada a outros parâmetros clínico-laboratoriais, como plaquetopenia (RAOULT et al., 1983) e rabdomiólise (COURSIN; UPDIKE; MAKI, 2000) . Não conseguimos demonstrar essas associações , possivelmente, pela baixa gravidade das Lesões Renais Agudas encontradas em nossos pacientes.

Entre as limitações do estudo, tem-se: primeiramente, que embora tenhamos medido biomarcadores de endotélio e glicocálice na primeira avaliação médica, alguns pacientes já apresentavam naquele momento algum grau de lesão renal ou queda da taxa de filtração glomerular, tornando difícil estabelecer uma relação causal entre o dano endotelial e a Lesão Renal Aguda. A segunda limitação refere-se ao fato de que todos os pacientes, à exceção de um, apresentaram a forma mais branda de Lesão Renal Aguda e poderíamos, portanto, supor que as associações descritas seriam mais fortes em casos com lesão renal de maior gravidade, mas trata-se apenas de especulação.

7 CONCLUSÕES

Em jovens previamente saudáveis, do sexo masculino, com Leptospirose a incidência de Lesão Renal Aguda foi de 30% (14 pacientes) segundo o protocolo “Kidney Disease Improving Global Outcome” (KDIGO) e apenas um indivíduo apresentou classificação estágio 2, tendo os demais classificação estágio 1.

Nesse grupo homogêneo, a elevação dos níveis séricos de biomarcadores de lesão do endotélio (ICAM-1) e, principalmente, do glicocálice (Sindecano-1), está relacionada à ocorrência de Lesão Renal Aguda, mesmo na sua forma mais branda.

Não foi encontrada diferença significativa nos valores de NGAL nos grupos com e sem lesão renal aguda, embora tenhamos identificado correlação positiva entre NGAL e Sindecano-1.

REFERÊNCIAS

- ABASSI, Z; SAGI, O; ARMALY, Z; BISHARA, B. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a novel biomarker for acute kidney injury. **Harefuah**, v. 150, n. 2, p.111-6, 2011.
- ABDULKADER, R. C.; SEGURO, A. C.; MALHEIRO, P. S.; BURDMANN, E. A.; MARCONDES, M. Peculiar electrolytic and hormonal abnormalities in acute renal failure due to leptospirosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.54, p. 1-6, 1996.
- ABDULKADER, R. C; DAHER, E. F; CAMARGO, E. D; SPINOSA, C; SILVA, M. V. Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. **Revis Inst Med Trop São Paulo**, v. 44, n. 1, p. 79-83, 2002.
- ABDULKADER, R. C. R. M.; SILVA, M. V. The kidney in leptospirosis. **Pediatr. Nephrol.**, v.23, p. 2111-2120, 2008.
- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. D. P. Leptospira and leptospirosis. **Vet. Microbiol.**, v.140, p. 287-296, 2010.
- ADLER, B.; FAINE, S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. **Infect Immun**, v. 17, n. 1, p. 67–72, 1977.
- ALMENAR-QUERALT, A.; DUPERRAY, A.; MILES, L. A.; FELEZ, J.; ALTIERI, D. C. Apical topography and modulation of ICAM-1 expression on activated endothelium. **Am J Pathol.**, v. 147, n. 5, p.1278-88, 1995.
- ALPÍZAR-ALPÍZAR, W.; LAERUM, O. D.; ILLEMANN, M.; RAMÍREZ, J. A; ARIAS, A.; MALESPÍN-BENDAÑA, W.; RAMÍREZ, V.; LUND, L. R.; BORREGAARD, N.; NIELSEN, B. S. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL/Lcn2) is preregulated in gastric mucosa infected with Helicobacter pylori. **Virchows Arch.**, v. 455, n. 3, p. 225-33, 2009.
- ALSTON, J. M.; BROOM J. C. **Leptospirosis in man and animals**. E. & S. Livingstone, Edinburgh, U.K. 1958.
- ALVES, V. A.; VIANNA, M. R.; YASUDA, P. H.; BRITO, T. Detection of leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. **J Pathol.**, v. 151, n. 2, p.125-31, 1987.
- ANDRADE, L.; CLETO, S.; SEGURO, A. C. Door-to-dialysis time and daily hemodialysis in patients with leptospirosis: impact on mortality. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v.2, p. 739-744, 2007.
- ARAÚJO, E. R.; SEGURO, A. C.; SPICHLER, A.; MAGALDI, A. J.; VOLPINI, R. A.; BRITO, T. Acute kidney injury in human leptospirosis: an immunohistochemical study with pathophysiological correlation. **Virchows Arch.**, v.456, p. 367-375, 2010.

- AREÁN, V. M. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). **Am J Pathol.**, v.40, n.1, p. 393-423, 1962.
- AREÁN, V. M.; SARASIN, G.; GREEN, J. H. The pathogenesis of leptospirosis: toxin production by *Leptospira icterohaemorrhagiae*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 25, n. 1, p. 836–843, 1964.
- ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J. F.; NALLY, J.; VERMA, A. Host-inducible immunogenic sphingomyelinase-like protein, Lk73.5, of *Leptospira interrogans*. **Infect Immun** v. 72, n. 2, p. 742–749, 2004.
- ARUMUGAM, G.; JACOB, S. M.; ANITHA, D.; RAJAPPA, S. M. Occurrence of leptospirosis among suspected cases in Chennai, Tamil Nadu. **Indian J Pathol Microbiol.**, v. 54, n. 1, p. 100-2, 2011.
- ATZINGEN, M. V.; BARBOSA, A. S.; BRITO, T.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; LIMA, D. M.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiol**, v.8, n. 1, p.70, 2008.
- AUBRY, P.; BORDAHANDY, R.; FERAH, T.; MAILLOUX, M.; THOMAS, J. Une anadémie de leptospirose ictéro-hémorragique dans une collectivité militaire a Alger. **Bull Soc Pathol Exot Filiales**, v. 68, n. 4, p. 370-6, 1975.
- BAGSHAW, S. M. Acute kidney injury: diagnosis and classification of AKI: AKIN or RIFLE? **Nat Rev Nephrol.**, v. 6, n. 2, p. 71-3, 2010.
- BAJANI, M. D.; ASHFORD, D. A.; BRAGG, S. L.; WOODS, C. W.; AYE, T.; SPIEGEL, R. A.; PLIKAYTIS, B. D.; PERKINS, B. A.; PHELAN, M.; LEVETT, P. N.; WEYANT, R. S. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. **J Clin Microbiol.**, v. 41, n. 2, p. 803-9, 2003.
- BAKER, C. B. Leptospirosis. **Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.**, v.12, p.105-108, 1948.
- BAL, A. E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R. A.; MEZA-BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, W. J. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 1, p.1894–1898, 1994.
- BARBARESCHI, M.; MAISONNEUVE, P.; ALDOVINI, D.; CANGI, M. G.; PECCIARINI, L; MAURI, F. A.; VERONESE, S.; CAFFO, O.; LUCENTI, A.; PALMA, P. D.; GALLIGIONI, E.; DOGLIONI, C. High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. **Cancer.** , v.98, n. 3, p. 474-83, 2003.
- BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A.; NEVES, F. O.; ATZINGEN, M. V.; WATANABE, M. M.; VIEIRA, M. L.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infect Immun**, v. 74, n. 11, p. 6356–6364, 2006.

BARON, E. J. Classification. In: **Baron's Medical Microbiology**. 4th ed. Univ of Texas Medical Branch. 1996.

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. **Infect. Immun.**, v.67, p. 853-861, 1999.

BARTLETT, A. H.; HAYASHIDA, K.; PARK, P. W. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. **Mol Cells**. v, 24, n. 2, p.153-66, 2007.

BASTA, G.; LAZZERINI, G.; MASSARO, M.; SIMONCINI, T.; TANGANELLI, P.; FU, C.; KISLINGER, T.; STERN, D. M.; SCHMIDT, A. M.; CATERINA, R. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: A mechanism for amplification of inflammatory responses. **Circulation**, v. 105, n. 7, p. 816–822, 2002.

BECKER, A.; HINSBERGH, V. W.; JAGER, A.; KOSTENSE, P. J.; DEKKER, J. M.; NIJPELS, G.; HEINE, R. J.; BOUTER, L. M.; STEHOUWER, C. D. Why is soluble intercellular adhesion molecule-1 related to cardiovascular mortality? **Eur J Clin Invest**. v. 32, n. 1, p.1-8, 2003.

BELLOMO, R.; RONCO, C.; KELLUM, J. A.; MEHTA, R. L.; PALEVSKY, P. **Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs**: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit. Care*, v. 8, p. R204-R212, 2004.

BERNFELD M.; HINKES, M. T.; GALLO, R. L. Developmental expression of the syndecans: possible function and regulation. **Dev Suppl**. p. 205-12, 1993.

BERNHEIMER, A. W.; BEY, R. F. Copurification of *Leptospira interrogans* serovar pomona hemolysin and sphingomyelinase C. **Infect Immun.**, v. 54(1):262-4, 1986.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, 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. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis.**, v. 3, n. 12, p. 757-71, 2003.

BLASI, E.; ARDIZZONI, A.; COLOMBARI, B.; NEGLIA, R.; BASCHIERI, C.; PEPOLONI, S.; CINCO, M. NF- κ B activation and p38 phosphorylation in microglial cells infected with *Leptospira* or exposed to partially purified leptospiral lipoproteins. **Microb. Pathog.**, v. 42, p. 80-87, 2007.

BOLIGNANO, D.; DONATO, V.; LACQUANITI, A.; FAZIO, M. R.; BONO, C.; COPPOLINO, G.; BUEMI, M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human neoplasias: a new protein enters the scene. **Cancer Lett.**, v. 288, n. 1, p.10-6, 2010.

BONVENTRE, J. V.; ZUK, A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? **Kidney Int.**, v. 66, n. 2, p. 480–485, 2004.

BORREGAARD N, COWLAND JB. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a siderophore-binding eukaryotic protein. **Biometals.**, v. 19, n. 2, p. 211-5, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portal da Saúde:** Tabela de Casos Confirmados de Leptospirose, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 2000 a 2013. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/junho/18/Anexo-I--Casos-Confirmados-Lepto-2000-a-2013-.pdf>.>. Acessado em 25 de fevereiro de 2014.

BREINER, D. D.; FAHEY, M.; SALVADOR R, NOVAKOVA J, COBURN J. *Leptospira interrogans* binds to human cell surface receptors including proteoglycans. **B Infect Immun.**, v. 77, n. 12, p. 5528-36, 2009.

BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G.; ROGERS, F. C.; WEYANT, R. S. 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. **Int J Syst Bacteriol.**, v. 49, p. 839-858, 1999.

BRETT-MAJOR, D. M.; LIPNICK, R. J. Antibiotic prophylaxis for leptospirosis. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 8, n. 3, p. CD007342, 2009.

BRETT-MAJOR, D. M.; COLDREN, R. Antibiotics for leptospirosis. **Cochrane Database Syst Rev.** v, 15, n. 2, p. CD008264, 2012.

BROWN, P. D.; GRAVEKAMP, C.; CARRINGTON, D. G.; KEMP, H.; HARTSKEERL, R. A., EDWARDS, C. N.; EVERARD, C. O.; TERPSTRA, W. J.; LEVETT, P. N. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. **J Med Microbiol.**, v. 43, n. 2, p. 110-4, 1995.

BROWN, P. D.; CARRINGTON, D. G.; GRAVEKAMP, C.; KEMP, H. V.; EDWARDS, C. N.; JONES, S. R.; PRUSSIA, P. R.; GARRIQUES, S.; TERPSTRA, W. J.; LEVETT, P. N. Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. **Res Microbiol.**, v. 154, n. 8, p. 581-6, 2003.

BRYAN, J. P.; IQBAL, M.; KSIAZEK, T. G.; AHMED, A.; DUNCAN, J. F.; AWAN, B.; KRIEG, R. E.; RIAZ, M.; LEDUC, J. W.; NABI, S.; QURESHI, M. S.; MALIK, I. A.; LEGTERS, L. J. Prevalence of sand fly fever, West Nile, Crimean-Congo hemorrhagic fever, and leptospirosis antibodies in Pakistani military personnel. **Mil Med.**, v. 161, n. 3, p. 149-53, 1996.

BULACH, D. M.; KALAMBAHETI, T.; PENA-MOCTEZUMA, A.; ADLER, B. 2000. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** 2: 375–380.

CAREY DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. **Biochem J.**, v. 327, n. 1, p. 1-16, 1997.

CARVALHO, E.; BARBOSA, A. S.; GÓMEZ, R. M.; OLIVEIRA, M. L.; ROMERO, E. C.; GONÇALES, A. P.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HO, P. L. Evaluation of the expression and protective potential of leptospiral sphingomyelinases. **Curr Microbiol**, v. 60, n. 2, p. 134–142, 2010.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. **Morbidity and Mortality Weekly Report MMWR**. v. 46, n. RR-10, p. 49-, 1997.

CERQUEIRA, T. B.; ATHANAZIO, D. A.; SPICHLER, A. S.; SEGURO, A. C. Renal involvement in leptospirosis – new insights into pathophysiology and treatment. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.12, p. 248-252, 2008.

CHAGAS, J. A.; ATHANAZIO, D.; MACEDO, J.; MENEZES, M.; REIS, M.; MCBRIDE, F.; MCBRIDE, A. Cytokines in experimental leptospirosis: association with severe disease and postimmunization immune response. **Int. J. Infect. Dis.**, v.14, p.e189-e190, 2010.

CHAKURKAR, G.; VAIDEESWAR, P.; PANDIT, S. P.; DIVATE, S. A. Cardiovascular lesions in leptospirosis: an autopsy study. **J. Infect.**, v.56, p. 197-203, 2008.

CHAN, Y. R.; LIU, J. S.; POCIASK, D. A.; ZHENG, M.; MIETZNER, T. A.; BERGER, T.; MAK, T. W.; CLIFTON, M. C.; STRONG, R. K.; RAY, P.; KOLLS, J. K. Lipocalin 2 is required for pulmonary host defense against Klebsiella infection. **J Immunol.**, v. 182, n. 8, p. 4947-56, 2009.

CHANDRASEKARAN S, KRISHNAVENI S, CHANDRASEKARAN N. Darkfield microscopic (DFM) and serologic evidences for leptospiral infection in panuveitis cases. **Indian J Med Sci.**, v. 52, n. 7, p. 294-8, 1998.

CHAPMAN, A. J.; ADLER, B.; FAINE, S. Antigens recognised by the human immune response to infection with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. **J Med Microbiol.**, v. 25, n. 4, p. 269-78, 1988.

CHASSIN, C.; PICARDEAU, M.; GOUJON, J. M.; BOURHY, P.; QUELLARD, N.; DARCHE, S.; BADELL, E.; D'ANDON, M. F.; WINTER, N.; LACROIX-LAMANDÉ, S.; BUZONI-GATEL D, VANDEWALLE A, WERTS C. Tlr4- and tlr2-mediated b cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, leptospira interrogans. **J Immunol**, v. 183, n. 4, p. 2669–2677, 2009.

CHIKAMA, S.; IIDA, S.; INOUE, M.; KAWAGOE, N.; TOMIYASU, K.; MATSUOKA, K.; NODA, S.; TAKAZONO, I. Role of heparan sulfate proteoglycan (syndecan-1) on the renal epithelial cells during calcium oxalate monohydrate crystal attachment. **Kurume Med J.**, v. 49, n. 4, p. 201-10, 2002.

CHOW, F. Y.; NIKOLIC-PATERSON, D. J.; OZOLS, E.; ATKINS, R. C.; TESCH, G. H. Intercellular adhesion molecule-1 deficiency is protective against nephropathy in type 2 diabetic db/db mice. **J Am Soc Nephrol**, v. 16, p. 1711–1722, 2005.

CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; CHEN, T. L.; MØLLER, A. K.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix protein and fibrinogen. **Infect Immun**, v. 75, n. 5, p. 2241–2450, 2007.

CINCO, M.; BANFI, E.; SORANZO, M. R.. Studies on the interaction between macrophages and leptospires. **J. Gen. Microbiol.**, v. 124, p. 409–413, 1981.

CLAUSEN, P.; JACOBSEN, P.; ROSSING, K.; JENSEN, J. S.; PARVING, H. H.; FELDT-RASMUSSEN, B. Plasma concentrations of VCAM-1 and ICAM-1 are elevated in patients with Type 1 diabetes mellitus with microalbuminuria and overt nephropathy. **Diabet Med.**, v. 17, n. 9, p. 644-9, 2000.

COLAVITA, G.; PAOLETTI, M. Leptosirosi: rischio professionale nella filiera degli alimenti di origine animale. **G Ital Med Lav Ergon.**, v. 29, n. 1, p. 21-4, 2007.

CONROY, A. L.; PHIRI, H.; HAWKES, M.; GLOVER, S.; MALLEWA, M.; SEYDEL, K. B.; TAYLOR, T. E.; MOLYNEUX, M. E.; KAIN, K. C. Endothelium-based biomarkers are associated with cerebral malaria in Malawian children: a retrospective case-control study. **PLoS One**, v. 5, n. e15291, 2010.

CORWIN, A.; RYAN, A.; BLOYS, W.; THOMAS, R.; DENIEGA, B.; WATTS, D. A waterborne outbreak of leptospirosis among United States military personnel in Okinawa, Japan. **Int J Epidemiol.**, v. 19, n. 3, p. 743-8, 1990.

COSTA, E.; LOPES, A. A.; SACRAMENTO, E.; COSTA, Y. A.; MATOS, E. D.; LOPES, M. B.; BINA, J. C. Penicillin at the late stage of leptospirosis: a randomized controlled trial. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.45, p. 141-145, 2003.

COURSIN, D. B.; UPDIKE, S. J.; MAKI, D. G. Massive rhabdomyolysis and multiple organ dysfunction syndrome caused by leptospirosis. **Intensive Care Med.**, v. 26, p. 808-812, 2000.

COVIC, A.; GOLDSMITH, D. J.; GUSBETH-TATOMIR, P.; SEICA, A.; COVIC, M. A retrospective 5-year study in Moldova of acute renal failure due to leptospirosis: 58 cases and a review of the literature. **Nephrol Dial Transplant.**, v. 18, n. 6, p. 1128-34, 2003.

CRUZ, D. N.; GAIAO, S.; MAISEL, A.; RONCO, C.; DEVARAJAN, P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of cardiovascular disease: a systematic review. **Clin Chem Lab Med.**, v. 50, n. 9, p. 1533-45, 2012.

CUMBERLAND, P.; EVERARD, C. O. R.; WHEELER, J. G.; LEVETT, P. N. Persistence of anti-leptospiral IgM, IgG and agglutinating antibodies in patients presenting with acute febrile illness in Barbados 1979– 1989. **Eur J Epidemiol**, v. 17, n. 7, p. 601–608, 2001.

CUMMINGS, C. J.; SESSLER, C. N.; BEALL, L. D.; FISHER, B. J.; BEST, A. M.; FOWLER, A. A. Soluble E-selectin levels in sepsis and critical illness. Correlation with infection and hemodynamic dysfunction. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 156, n. 2 Pt 1, p. 431-7, 1997.

SILVA, M. V.; BATISTA, L.; CAMARGO, E. D.; LEITAO, P. A.; SZALKAY, V. G.; ROSENTHAL, C.; VAZ, A. J. SOUZA, A. M. Leptospirosis in patients with anti-HIV antibodies: report of 2 cases. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 23, p. 229–231, 1990.

PEÑA-MOCTEZUMA, A.; BULACH, D. M.; KALAMBAHETI, T.; ADLER, B. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 177, n. 2, p. 319-26, 1999.

DAHER, E. F.; ZANETTA, D. M. T.; CAVALCANTE, M.; ABDULKADER, R. C. Risk factors for death and changing patterns in acute renal failure of leptospirosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.61, p. 630-634, 1999.

DAHER, E. F.; NOGUEIRA, C. B. Evaluation of penicillin therapy in patients with leptospirosis and acute renal failure. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 42, p. 327-332, 2000.

DAHER, E. F.; ZANETTA, D. M.; ABDULKADER, R. C. Pattern of renal function recovery after leptospirosis acute renal failure. **Nephron Clin Pract.**, v. 98, n. 1, p. c8-14, 2004.

DAHER, E. F.; MARQUES, C. N.; LIMA, R. S.; JÚNIOR, G. B. S.; BARBOSA, A. S.; BARBOSA, E. S.; MOTA, R. M.; SILVA, S. L.; ARAÚJO, S. M.; LIBÓRIO, A. B. Acute kidney injury in an infectious disease intensive care unit – an assessment of prognostic factors. **Swiss Med. Wkly.**, v.138, p. 128-133, 2008.

DAHER, E. F.; SILVA JUNIOR, G. B.; KARBAGE, N. N. N.; CARVALHO JÚNIOR, P. C.; KATAOKA, R. S.; SILVA, E. C.; MAGALHÃES, M. M.; MOTA, R. M.; ARAÚJO, S. M.; GUTIÉRREZ-ADRIANZÉN, O. A.; LIBÓRIO, A. B. Predictors of oliguric acute kidney injury in leptospirosis: a retrospective study on 196 consecutive patients. **Nephron Clin. Pract.**, v.112, p. c25-c30, 2009.

DAHER, E. F.; SILVA JÚNIOR, G. B.; LIBÓRIO, A. B. **Nefropatia nas doenças tropicais.** In: RIELLA, M. C. Princípios de nefrologia e distúrbios hidreletrolíticos. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2010. p. 617-640.

DAY, R.; ILYAS, M.; DASZAK, P.; TALBOT, I.; FORBES, A. Expression of syndecan-1 in inflammatory bowel disease and a possible mechanism of heparin therapy. **Dig Dis Sci.**, v. 44, n. 12, p. 2508-15, 1999.

BRITO, T.; BÖHM, G. M.; YASUDA, P. H. Vascular damage in acute experimental leptospirosis of the guinea-pig. **J Pathol.**, v. 128, n. 4, p. 177-82, 1979.

DE GREEF, K. E.; YSEBAERT, D. K.; PERSY, V.; VERCAUTEREN, S. R.; BROE, M. E. ICAM-1 expression and leukocyte accumulation in inner stripe of outer medulla in early phase of ischemic compared to HgCl₂-induced ARF. **Kidney Int**, v. 63, p.1697–1707, 2003.

DE PABLO, R.; MONSERRAT, J.; REYES, E.; DÍAZ, D.; RODRÍGUEZ-ZAPATA, M.; DE LA HERA, A.; PRIETO, A.; ÁLVAREZ-MON, M. Circulating sICAM-1 and sE-Selectin as biomarker of infection and prognosis in patients with systemic inflammatory response syndrome. **Eur J Intern Med.**, v. 24, n. 2, p. 132-8, 2013.

DE-SOUZA, L.; KOURY, M. C. Chemical and biological properties of endotoxin from *Leptospira interrogans* serovars canicola and icterohaemorrhagiae. **Braz J Med Biol Res.**, v. 25, n. 5, p. 467-75, 1992.

DEEPA, S. S.; YAMADA, S.; ZAKO, M.; GOLDBERGER, O.; SUGAHARA, K. Chondroitin sulfate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparan sulfate chains to bind growth factors. A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor. **J Biol Chem**, v. 279, p. 37368-37376, 2004.

DEL REAL, G.; SEGERS, R. P.; VAN DER ZEIJST, B. A.; GAASTRA, W. Cloning of a hemolysin gene from *Leptospira interrogans* serovar hardjo. **Infect Immun.**, v. 57, n. 8, p. 2588-90, 1989.

DI GRANDE, A.; GIUFFRIDA, C.; CARPINTERI, G.; NARBONE, G.; PIRRONE, G.; DI MAURO, A.; CALANDRA, S.; NOTO, P.; LE MOLI, C.; ALONGI, B.; NIGRO, F. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel biomarker for the early diagnosis of acute kidney injury in the emergency department. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.**, v. 13, n. 3, p.197-200, 2009.

DHODAPKAR, M. V.; SANDERSON, R. D. Syndecan-1 (CD 138) in myeloma and lymphoid malignancies: a multifunctional regulator of cell behavior within the tumor microenvironment. **Leuk Lymphoma.**, v. 34, n. 1-2, p. 35-43, 1999.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 421-31, 1990.

EDGAR, J. D. M.; GABRIEL, V.; GALLIMORE, J. R.; MCMILLAN, S. A.; GRANT, J. A. A prospective study of the sensitivity, specificity and diagnostic performance of soluble intercellular adhesion molecule 1, highly sensitive C-reactive protein, soluble E-selectin and serum amyloid A in the diagnosis of neonatal infection. **BMC Pediatr**, v. 10, n. 22, 2010.

EDWARDS, C. N.; NICHOLSON, G. D.; HASSELL, T. A.; EVERARD, C. O.; CALLENDER, J. Penicillin therapy in icteric leptospirosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.39, p. 388-390, 1988.

EDWARDS, C. N.; NICHOLSON, G. D.; HASSELL, T. A.; EVERARD, C. O.; CALLENDER, J. Leptospirosis in Barbados. A clinical study. **West Indian Med. J.**, v.39, p. 27-34, 1990.

ERDMAN, L. K.; DHABANGI, A.; MUSOKE, C.; CONROY, A. L.; HAWKES, M.; HIGGINS, S.; RAJWANS, N.; WOLOFSKY, K. T.; STREINER, D. L.; LILES, W. C.; CSERTI-GAZDEWICH, C. M.; KAIN, K. C. Combinations of host biomarkers predict mortality among Ugandan children with severe malaria: a retrospective case-control study. **PLoS One.**, v. 6, n. 2, p. e17440, 2011.

ESEN, S.; SUNBUL, M.; LEBLEBICIOGLU, H.; EROGLU, C.; TURAN, D. Impact of clinical and laboratory findings on prognosis in leptospirosis. **Swiss Med. Wkly.**, v.134, p. 347-352, 2004.

ESKO, J.D.; SELLECK, S. B. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 435-71, 2002.

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiol.**, v. 5, n. 9, p. 1413-25, 2010.

EVANGELISTA, K.; FRANCO, R.; SCHWAB, A.; COBURN, J. Leptospira interrogans binds to cadherins. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 30, n. 8, p. e2672, 2014.

FAINE S. **Guidelines for the control of leptospirosis** (offset publication No. 67). Geneva: World Health Organization, 1982. 84. 2014.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2nd ed. Melbourne: MedSci; 1999.

FASCHING, P.; VEITL, M.; ROHAC, M.; STRELI, C.; SCHNEIDER, B.; WALDHÄUSL, W.; WAGNER, O. F. Elevated concentrations of circulating adhesion molecules and their association with microvascular complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 81, n. 12, p. 4313-7, 1996.

FEKADE, D.; KNOX, K.; HUSSEIN, K.; MELKA, A.; LALLOO, D. G.; COXON, R. E.; WARRELL, D. A. Prevention of Jarisch-Herxheimer reactions by treatment with antibodies against tumor necrosis factor alpha. **N Engl J Med.**, v. 335, n. 5, p. 311-5, 1996.

FERNANDO, T.; RODRIGO, C.; SAMARAKOON, L.; NAVINAN, M. R.; DANDENIYA, C.; CONSTANTINE, G.; RAJAPAKSE, S. Electrocardiographic and echocardiographic manifestations of cardiac involvement in leptospirosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 107, n. 7, p. 457-9, 2013.

FOSSIEZ, F.; BANCHEREAU, J.; MURRAY, R.; VAN KOOTEN, C.; GARRONE, P.; LEBECQUE, S. Interleukin-17. **Int Rev Immunol.**, v. 16, n. 5-6, p. 541-51, 1998.

FRIEDLAND, J. S.; WARREL, D. A. The Jarisch Herxheimer reaction in leptospirosis: possible pathogenesis and review. **Rev. Infect. Dis.**, v.13, p. 207-210, 1991.

FULOP, M.; SANDSON, J. The effect of bile salts on the binding of bilirubin by plasma proteins. **Clin Sci.**, v. 33, n. 3, p. 459-69, 1967.

FULOP, M.; KATZ, S.; LAWRENCE, C. Extreme hyperbilirubinemia. *Arch Intern Med.*, v. 127, n. 2, p. 254-8, 1971.

GAGNEUX-BRUNON A , DELANAYE P, LEGRAND D, CAVALIER E, MARIAT C. NGAL, biomarker of acute kidney injury in 2012. **Nephrol Ther.**, v. 8, n. 7, p. 508-15, 2012.

GALLI, M., R. ESPOSITO, P. CROCCHIOLO, M. CHEMOTTI, M. GASPARRO, AND P. P. DALL'AGLIO. Immune complexes in leptospirosis. **Infection**, v.13, n. 156, 1985.

GAMBERINI, M.; GOMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C. et al. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiol Lett**, v. 244, p. 305-13, 2005.

GASIC, S.; WAGNER, O. F.; FASCHING, P.; LUDWIG, C.; VEITL, M.; KAPIOTIS, S.; JILMA, B. Fosinopril decreases levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in borderline hypertensive type II diabetic patients with microalbuminuria. **Am J Hypertens.**, v. 12, n. 2 Pt 1, p. 217-22, 1999.

GHIELLI, M.; VERSTREPEN, W. A.; DE GREEF, K. E.; HELBERT, M. H.; YSEBAERT, D. K.; NOUWEN, E. J.; DE BROE, M. E. Antibodies to both ICAM-1 and LFA-1 do not protect the kidney against toxic (HgCl₂) injury. **Kidney Int**, v. 58, p. 1121–1134, 2000.

GOLDSTEIN SF, CHARON NW. Motility of the spirochete *Leptospira*. **Cell Motil Cytoskelet.**, v. 9, p. 101-110, 1988.

GOLDSTEIN, S. L. Acute kidney injury biomarkers: renal angina and the need for a renal troponin I. **BMC Med.**, v. 21, n. 9, p. 135, 2011.

GOLIGORSKY, M. S.; PATSCHAN, D.; KUO, C.; PARK, H-C.; HOCHEGGER, K.; ROSENKRANZ, A.; BRADY, H.; MAYADAS, T. **Cell Adhesion Molecules in Renal Injury**. In: Schnellmann, R., editor. *Comprehensive Toxicology*. Vol. 7. Elsevier Ltd.; p. 813-845, 2010.

GÓMEZ, R. M.; VIEIRA, M. L.; SCHATTNER, M.; MALAVER, E.; WATANABE, M. M.; BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A.; MORAIS, Z. M.; CIFUENTE, J. O.; ATZINGEN, M. V.; OLIVEIRA, T. R.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. Putative outer membrane proteins of *Leptospira interrogans* stimulate human umbilical vein endothelial cells (HUVECS) and express during infection. **Microb Pathog.**, v. 45, n. 5-6, p. 315-22, 2008.

GONÇALVES, A. J.; CARVALHO, J. E.; SILVA, J. B. G.; ROZEMBAUM, R.; VIEIRA, A. R. Hemoptysis and the adult respiratory distress syndrome as the causes of death in leptospirosis. Changes in the clinical and anatomicopathological patterns. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 25, n. 4, p. 261-70, 1992.

GONÇALVES, D. D.; TELES, P. S.; REIS, C. R.; LOPES, F. M. R.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; ALVES, L. A.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paraná State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 48, p. 135-140, 2006.

GONSALEZ, C. R.; CASSEB, J.; MONTEIRO, F. G.; PAULA-NETO, J. B.; FERNANDEZ, R. B.; SILVA, M. V.; CAMARGO, E. D.; MAIRINQUE, J. M.; TAVARES, L. C. Use of doxycycline for leptospirosis after high-risk exposure in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 40, n. 1, p. 59-61, 1998.

GÖTTE, M. Syndecans in inflammation. **Faseb J.**, v. 17, p. 575–591, 2003.

GUARNER, J.; SHIEH, W. J.; MORGAN, J.; BRAGG, S. L.; BAJANI, M. D.; TAPPERO, J. W.; ZAKI, S. R. Leptospirosis mimicking acute cholecystitis among athletes participating in a triathlon. **Hum Pathol.**, v. 32, n. 7, p. 750-2, 2001.

GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; REIS, M. G.; LEVETT, P. N.; KO, A. I.; HAAKE, D. A. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infect Immun.**, v. 69, p. 4958-4968, 2001.

GÜLER, S.; ÇAKIR, B.; DEMIRBAS, B.; YÖNEM, A.; ODABASI, E.; ONDE, U.; AYKUT, O.; GÜRSOY, G. Plasma soluble intercellular adhesion molecule 1 levels are increased in type 2 diabetic patients with nephropathy. **Horm Res.** v. 58, n. 2, p. 67-70, 2002.

HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infect Immun.**, v. 67, n. 12, p. 6572-82, 1999.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infect Immun.**, v. 68, n. 4, p. 2276-85, 2000.

HAASE, M.; BELLOMO, R.; DEVARAJAN, P.; SCHLATTMANN, P.; HAASE-FIELITZ, A. NGAL Meta-analysis . Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. **Am J Kidney Dis.**, v. 54, n. 6, p. 1012-24, 2009.

HADAD, E.; PIROGOVSKY, A.; BARTAL, C.; GILAD, J.; BARNEA, A.; YITZHAKI, S.; GROTTTO, I.; BALICER, R. D.; SCHWARTZ, E. An outbreak of leptospirosis among Israeli troops near the Jordan River. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 74, n. 1, p. 127-31, 2006.

HATTORI, M.; NIKOLIC-PATERSON, D. J.; MIYAZAKI, K.; ISBEL, N. M.; LAN, H. Y.; ATKINS, R. C.; KAWAGUCHI, H.; ITO, K. Mechanisms of glomerular macrophage infiltration in lipid-induced renal injury. **Kidney Int Suppl**, v. 71, p. S47–S50, 1999.

HAUK, P.; MACEDO, F.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; BARBOSA, A. S.; HO, P.L. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the Cterminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. **Infect Immun**, v. 76, n. 6, p. 2642–2650, 2008.

HELÁNOVÁ, K.; PAŘENICA, J.; DLOUHÝ, V.; GOLDBERGOVÁ, M. P.; CERMÁKOVÁ, Z.; GOTTWALDOVÁ, J.; SPINAR, J. The importance of NGAL and cystatin C biomarkers in cardiovascular diseases. **Vnitr Lek.**, v. 58, n. 4, p. 286-90, 2012.

HOFER, S.; BRENNER, T.; BOPP, C.; STEPPAN, J.; LICHTENSTERN, C.; WEITZ, J.; BRUCKNER, T.; MARTIN, E.; HOFFMANN, U.; WEIGAND, M. A. Cell death serum biomarkers are early predictors for survival in severe septic patients with hepatic dysfunction. **Crit Care.**, v. 13, n. 3, p. R93, 2009.

HOKE, D. E.; EGAN, S.; CULLEN, P. A.; ADLER, B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infect Immun**, v. 76, n. 5, p. 2063–2069, 2008.

HUBBARD, A. K.; ROTHLEIN, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. **Free Radic Biol Med.**, v. 28, n. 9, p. 1379-86, 2000.

IDO, Y.; HOKI, R.; ITO, H.; WANI, H. The rat as a carrier of *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, the causative agent of Weil's disease (*spirochaetosis icterohaemorrhagica*). **J. Exp. Med.**, v. 26, p. 341–353, 1917.

INTERNATIONAL LEPTOSPIROSIS SOCIETY. ILS Worldwide Survey 1998, 1999, 2000. Barbados Meeting of the ILS. 2000 disponível em http://www.leptonet.net/assets/images/LeptoNet_ILS_survey.ppt.

IM, J. G.; YEON, K. M.; HAN, M. C.; KIM, C. W.; WEBB, W. R.; LEE, J. S.; HAN, Y. C.; CHANG, W. H.; CHI, J. G. Leptospirosis of the lung: radiographic findings in 58 patients. **AJR Am J Roentgenol.**, v. 152, n. 5, p. 955-9, 1989.

INADA, R.; IDO, Y. (1915): A report on the discovery of the causal organism (a new species of *Spirochaeta*) of Weil's disease. **Tokyo Ijishinshi**, p. 351-360, 1908.

INKI P, JALKANEN M. The role of syndecan-1 in malignancies. **Ann Med.**, v. 28, n. 1, p. 63-7, 1996.

IRWIN, A. D.; MARRIAGE, F.; MANKHAMBO, L. A.; JEFFERS, G.; OLAMUNNAGE-DONA, R.; GUIVER, M.; DENIS, B.; MOLYNEUX, E. M.; MOLYNEUX, M. E.; DAY, P. J.; CARROL, E. D. Novel biomarker combination improves the diagnosis of serious bacterial infections in Malawian children. **BMC Med Genomics**, v. 4, n. 5, p.13, 2012.

ISOGAI, E.; ISOGAI, H.; KUREBAYASHI, Y.; ITO, N. Biological activities of leptospiral lipopolysaccharide. **Zentbl. Bakteriologie**, v. 261, p. 53–64, 1986.

ITTYACHEN, A. M.; KRISHNAPILLAI, T. V.; NAIR, M. C.; RAJAN, A. R. Retrospective study of severe cases of leptospirosis admitted in the intensive care unit. **J Postgrad Med.**, v. 53, n. 4, p. 232-5, 2007.

JAKOBSEN, P. H.; MORRIS-JONES, S.; RØNN, A.; HVIID, L.; THEANDER, T. G.; ELHASSAN, I. M.; BYGBJERG, I. C.; GREENWOOD, B. M. Increased plasma concentrations of sICAM-1, sVCAM-1 and sELAM-1 in patients with *Plasmodium falciparum* or *P. vivax* malaria and association with disease severity. **Immunology**, v. 83, p. 665-9, 1994.

JAROONVESAMA, N.; VIRANUVATTI, V.; CHAROENLARP, K. Coagulation studies in leptospirosis. **Southeast Asian J Trop Med Public Health.**, v. 6, n. 4, p. 562-6, 1975.

JAU RÉGUIBERRY, S.; ROUSSEL, M.; BRINCHAULT-RABIN, G.; GACOUIN, A.; LE MEUR, A.; ARVIEUX, C.; MICHELET, C.; TATTEVIN, P. Clinical presentation of leptospirosis: retrospective study of 34 patients admitted to a single institution in metropolitan France. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.11, p. 391-394, 2005.

JOST, B. H.; ADLER, B.; VINH, T.; FAINE S. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. **J Med Microbiol**, v. 22, n. 3, p. 269–275, 1986.

KADO, S.; NAGATA, N. Circulating intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin in patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 46, p. 143–8, 1999.

KAISER, G. E.; DOETCH, R. N. Enhanced translational motion of *Leptospira* in viscous environments. **Nature (London)**, v. 255, p. 656-657, 1975.

KALOUSEK, I.; RÖSELOVÁ, P.; OTEVRELOVÁ, P. NGAL--neutrophil gelatinase associated lipocalin in biochemistry, physiology and clinical praxis. **Cas Lek Cesk.**, v. 145, n. 5, p. 373-6, 2006.

KARASNEH, G. A.; ALI, M.; SHUKLA, D. An important role for syndecan-1 in herpes simplex virus type-1 induced cell-to-cell fusion and virus spread. **PLoS One.**, v. 6, n. 9, p. e25252, 2011.

KATZ, A. R.; SASAKI, D. M.; MUMM, A. H.; ESCAMILLA, J.; MIDDLETON, C. R.; ROMERO, S. E. Leptospirosis on Oahu: an outbreak among military personnel associated with recreational exposure. **Mil Med.**, v. 162, n. 2, p. 101-4, 1997.

KAWAMURA, T.; UMEMURA, T.; KANAI, A.; UNO, T.; MATSUMAE, H.; SANO, T.; SAKAMOTO, N.; SAKAKIBARA, T.; NAKAMURA, J.; HOTTA, N. The incidence and characteristics of silent cerebral infarction in elderly diabetic patients: association with serum-soluble adhesion molecules. **Diabetologia**, v. 41, n. 8, p. 911-7, 1998.

KAYAL, S.; JAÏS, J. P.; AGUINI, N.; CHAUDIÈRE, J.; LABROUSSE, J. Elevated circulating E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and von Willebrand factor in patients with severe infection. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 157, n. 3 Pt 1, p. 776-84, 1998.

KELLY, K. J.; WILLIAMS, W. W. J.; COLVIN, R. B.; BONVENTRE, J. V. Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 812–816, 1994.

KELLY, K. J.; WILLIAMS, W. W. J.; COLVIN, R. B.; MEEHAN, S. M.; SPRINGER, T. A.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C.; BONVENTRE, J. V. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. **J Clin Invest**, v. 97, n. 4, p. 1056–1063, 1996.

KELLY, K. J.; MEEHAN, S. M.; COLVIN, R. B.; WILLIAMS, W. W.; BONVENTRE, J. V. Protection from toxicant-mediated renal injury in the rat with anti-CD54 antibody. **Kidney Int**, v. 56, p. 922–931, 1999.

KELLUM, J. A.; BELLOMO, R.; RONCO, C. Definition and classification of acute kidney injury. **Nephron Clin. Pract.**, v.109, p. c182-c187, 2008.

KHOSITSETH, S.; SUDJARITJAN, N.; TANANCHAI, P.; ONG-AJYUTH, S.; SITPRIJA, V.; THONGBOONKERD, V. Renal magnesium wasting and tubular dysfunction in leptospirosis. **Nephrol. Dial. Transplant**, v.23, p. 952–958, 2008.

KJELDSEN, L.; JOHNSEN, A. H.; SENGELØV, H.; BORREGAARD, N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. **J Biol Chem**, v. 268, n. 14, p. 10425-32, 1993.

KNAPP, S.; THALHAMMER, F.; LOCKER, G. J.; LACZIKA, K.; HOLLENSTEIN, U.; FRASS, M.; WINKLER, S.; STOISER, B.; WILFING, A.; BURGMANN, H. Prognostic value of MIP-1 alpha, TGF-beta 2, sELAM-1, and sVCAM-1 in patients with gram-positive sepsis. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 87, n. 2, p. 139-44, 1998.

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

KO, A.; GOARANT, C.; PICCARDEAU, M. Leptospira: the dawn of molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, p. 736–746, 2009.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. **FEMS Microbiol Lett**, v. 226, n. 2, p. 215–219, 2003.

KONING, G. A.; SCHIFFELERS, R. M.; STORM, G. Endothelial cells at inflammatory sites as target for therapeutic intervention. **Endothelium.**, v. 9, n. 3, p. 161-71, 2002.

KOPPER, L.; SEBESTYÉN, A. Syndecans and the lymphoid system. **Leuk Lymphoma**, v. 38, n. 3-4, p. 271-81, 2000.

KULARATNE, S. A.; BUDAGODA, B. D.; ALWIS, V. K.; WICKRAMASINGHE, W. M.; BANDARA, J. M.; PATHIRAGE, L. P.; GAMLATH, G. R.; WIJETHUNGA, T. J.; JAYALATH, W. A.; JAYASINGHE, C.; PINTO, V.; SOMARATNE, P.; KUMARASIRI, P. V. High efficacy of bolus methylprednisolone in severe leptospirosis: a descriptive study in Sri Lanka. **Postgrad Med J.**, v. 87, n. 1023, p. 13-7, 2011.

LAMBAERTS, K.; WILCOX-ADELMAN, S. A.; ZIMMERMANN, P. The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 21, n. 5, p. 662-9, 2009.

LEAL-CASTELLANOS, C. B.; GARCIA-SUAREZ, R.; GONZALES-FIGUEROA, E.; FUENTES-ALLEN, J. L.; ESCOBEDO DE LA PEÑA, J. Risk factors and the prevalence of leptospirosis infection in a rural community of Chiapas, Mexico. **Epidemiol. Infect.**, v.131, p. 1149-1156, 2003.

LEE, S. H.; KIM, K. A.; PARK, Y. G.; SEONG, I. W.; KIM, M. J.; LEE, Y. J. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Lai. **Gene**, v. 254, n. 1–2, p.19–28, 2000.

LEE, S. H.; KIM, S.; PARK, S. C.; KIM, M. J. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. **Infect Immun.**, v. 70, n. 1, p. 315-22, 2002.

LEUNG, J. C.; LAM, M. F.; TANG, S. C.; CHAN, L. Y.; TAM, K. Y.; YIP, T. P.; LAI, K. N. Roles of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in continuous ambulatory peritoneal dialysis-related peritonitis. **J Clin Immunol.**, v. 29, n. 3, p. 365-78, 2009.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev.**, v.14, n. 2, p. 296-326, 2001.

LEVETT, P. N.; BRANCH, S. L. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 66, n. 6, p. 745-8, 2002.

LEVETT, P. N. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. **Clin Infect Dis.**, v.15, n. 36, n. 4, p. 447-52, 2003.

LEVETT, P. N. *Leptospira*. In: Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H. et al, eds. **Manual of Clinical Microbiology**. 9th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; p. 963-970, 2007.

LEVETT, P. N.; HAAKE, D. A. **Leptospira species (Leptospirosis)**. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed. London: Churchill Livingstone, p. 3059-3067, 2009.

LEVI, T. M.; SOUZA, S. P.; MAGALHÃES, J. G.; CARVALHO, M. S.; CUNHA, A. L.; DANTAS, J. G.; CRUZ, M. G.; GUIMARÃES, Y. L.; CRUZ, C. M. Comparison of the RIFLE, AKIN and KDIGO criteria to predict mortality in critically ill patients. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 25, n. 4, p. 290-6, 2013.

LI, S.; OJCIUS, D. M.; LIAO, S.; LI, L.; XUE, F.; DONG, H.; YAN, J. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. **Innate Immun**, v. 16, p. 80–92, 2010.

LIBÓRIO, A. B. Can rhabdomyolysis be the only cause of acute renal failure in leptospirosis? **Nephrol Dial Transplant.**, v. 20, n. 11, p. 2580-1, 2005.

LIM, S. C.; CABALLERO, A. E.; SMAKOWSKI, P.; LOGERFO, F. W.; HORTON, E. S.; VEVES, A. Soluble intercellular adhesion molecule, vascular cell adhesion molecule, and impaired microvascular reactivity are early markers of vasculopathy in type 2 diabetic individuals without microalbuminuria. **Diabetes Care**, v. 22, n.11, p. 1865-70, 1990.

LIMA, R. S. A.; SILVA JÚNIOR, G. B.; LIBÓRIO, A. B.; DAHER, E. F. Acute kidney injury due to rhabdomyolysis. **Saudi J. Kidney Dis. Transplant.**, v.19, p. 721-729, 2008.

LIN, Y. P.; CHANG, Y. F. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 362, n. 2, p. 443-8, 2007.

LIN, Y. P.; CHANG, Y. F. The C-terminal variable domain of LigB from *Leptospira* mediates binding to fibronectin. **J Vet Sci.**, v. 9, n. 2, p. 133-44, 2008.

LIN, Y. P.; GREENWOOD, A.; YAN, W.; NICHOLSON, L. K.; SHARMA, Y.; MCDONOUGH, S. P.; CHANG, Y. F. A novel fibronectin type III module binding motif identified on C-terminus of *Leptospira* immunoglobulin-like protein, LigB. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 389, n. 1, p. 57-62, 2009.

LIN, Y. P.; RAMAN, R.; SHARMA, Y.; CHANG, Y. F. Calcium binds to leptospiral immunoglobulin-like protein, LigB, and modulates fibronectin binding. **J Biol Chem.**, v. 283, n. 37, p. 25140-9, 2008.

LINGAPPA, J.; KUFFNER, T.; TAPPERO, J.; WHITWORTH, W.; MIZE, A.; KAISER, R.; MCNICHOLL, J. HLA-DQ6 and ingestion of contaminated water: possible gene-environment interaction in an outbreak of leptospirosis. **Genes Immun.**, v. 5, p. 197-202, 2004.

LIPPI, G.; CALEFFI, A.; PIPITONE, S.; ELIA, G.; NGAH, A.; ALOE, R.; AVANZINI, P.; FERRARI, C. Assessment of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and lactate dehydrogenase in peritoneal fluids for the screening of bacterial peritonitis. **Clin Chim Acta**, v. 15, n. 418, p. 59-62, 2013.

LIPPI, G.; AVANZINI, P.; CALZETTI, C.; CALEFFI, A.; PIPITONE, S.; MUSA, R.; ALOE, R.; FERRARI, C. The role of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in cerebrospinal fluids for screening of acute bacterial meningitis. **Clin Lab.**, v. 60, n. 3, p. 377-81, 2014.

LO, M.; BULACH, D. M.; POWELL, D. R.; HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J.; PAUSTIAN, M. L.; ZUERNER, R. L.; ADLER, B. Effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays. **Infect Immun.**, v. 74, n. 10, p. 5848-59, 2006.

LO, M.; CORDWELL, S. J.; BULACH, D. M.; ADLER, B. Comparative transcriptional and translational analysis of leptospiral outer membrane protein expression in response to temperature. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 3, n. 12, p. e560, 2009.

LOMAR, A. V.; VERONESI, R.; BRITO, T.; DIAMENT, D. **Leptospiroses**. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. 2a edição. São Paulo: Editora Atheneu, p. 1007-1023, 2002.

LONGHI, M. T.; OLIVEIRA, T. R.; ROMERO, E. C.; GONÇALES, A. P.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. **J Med Microbiol**, v. 58, n. Pt 10, p. 1275–1282, 2009.

LOPES, A. A.; COSTA, E.; COSTA, Y. A.; SACRAMENTO, E.; OLIVEIRA, A. R.; LOPES, M. B.; LOPES, G. B. Comparative study of the in-hospital case-fatality rate of leptospirosis between pediatric and adult patients of different age groups. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 46, n. 1, p. 19-24, 2004.

MAGALDI, A. J.; YASUDA, P. N.; KUDO, L. H.; SEGURO, A. C.; ROCHA, A. S. Renal involvement in leptospirosis: a pathophysiologic study. **Nephron**, v.62, p. 332-339, 1992.

MAKRIS, K.; RIZOS, D.; KAFKAS, N.; HALIASSOS, A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a new biomarker in laboratory medicine. **Clin Chem Lab Med.**, v. 50, n. 9, p.1519-32, 2012.

MANOCHA, H.; GHOSHAL, U.; SINGH, S. K.; KISHORE, J.; AYYAGARI, A. Frequency of leptospirosis in patients of acute febrile illness in Uttar Pradesh. **Assoc Physicians India**, v. 52, p.623-5, 2004.

MÁRQUEZ-MARTÍNEZ, E.; VALERA-BESTARD, B.; LUQUE-MÁRQUEZ, R.; ALARCÓN-GONZÁLEZ, A. Afectación pulmonar en la leptospirosis. **Arch. Bronconeumol.**, v.42, p. 202-204, 2006.

MARSHALL, R. B. The route of entry of leptospire into the kidney tubule. **J. Med. Microbiol.**, v.9, p. 149-152, 1976.

MARTINEZ-LOPEZ, D. G.; FAHEY, M.; COBURN, J. Responses of human endothelial cells to pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* species. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 4, n. 12, p. e918, 2010.

MASUZAWA, T.R.; NAKAMURA, T.; SHIMIZU, A. N. D.; YANAGIHARA, Y. Biological activities and endotoxic activities of protective antigens (PAGs) of *Leptospira interrogans*. **Zentbl. Bakteri.**, v. 274, p. 109–117, 1990.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; YOUNG, T. A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C. A.; REIS, M. G.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol Microbiol.**, v. 49, n. 4, p. 929–949, 2003.

MCBRIDE, A. J.; PEREIRA, F. A.; SILVA, E. D.; MATOS, R. B.; SILVA, E. D.; FERREIRA, A. G.; REIS, M. G.; KO, A. I. Evaluation of the EIE-IgM-Leptospire assay for the serodiagnosis of leptospirosis. **Acta Trop.**, v. 102, n. 3, p. 206-11, 2007.

MÉGARBANE, B.; MARCHAL, P.; MARFAING-KOKA, A.; BELLIARD, O.; JACOBS, F.; CHARY, I.; BRIVET, F. G. Increased diffusion of soluble adhesion molecules in meningitis, severe sepsis and systemic inflammatory response without neurological infection is associated with intrathecal shedding in cases of meningitis. **Intensive Care Med.**, v. 30, n. 5, p. 867-74, 2004.

MEDEIROS, F. R.; SPICHLER, A.; ATHANAZIO, D. A. Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. **Acta Tropica**, v.115, p. 155-162, 2010.

MÉRIEN, F.; BARANTON, G.; PÉROLAT, P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. **J Infect Dis.**, v. 172, p. 281-285, 1995.

MERIEN, F.; TRUCCOLO, J.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. **FEMS Microbiol Lett**, v. 185, n. 1, p. 17–22, 2000.

MOHAN, A. R. M.; CUMBERBATCH, A.; ADESIYUN, A. A.; CHADEE, D. D. Epidemiology of human leptospirosis in Trinidad and Tobago, 1996-2007: a retrospective study. **Acta Tropica**, v.112, p. 260-265, 2009.

MOJCIK, C. F.; SHEVACH, E. M. Adhesion molecules: a rheumatologic perspective. **Arthritis Rheum.**, v. 40, n. 6, p. 991-1004, 1997.

MORGAN, J. et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clin Infect Dis.**, v. 34, n. 12, p. 1593-9, 2002.

MORRISON, W. I.; WRIGHT, N. G. Canine leptospirosis: an immunopathological study of interstitial nephritis due to *Leptospira canicola*. **J. Pathol.**, v.120, p. 83-89, 1976.

MORTIMER, R. B. Leptospirosis in a caver returned from Sarawak, Malaysia. **Wilderness Environ Med.**, v. 16, n. 3, p. 129-31, 2005.

MURO, S.; MUZYKANTOV, V. R. Targeting of antioxidant and anti-thrombotic drugs to endothelial cell adhesion molecules. **Curr Pharm Des.**, v. 11, n. 18, p. 2383-401, 2005.

MURO, S.; GAJEWSKI, C.; KOVAL, M.; MUZYKANTOV, V. R. ICAM-1 recycling in endothelial cells: a novel pathway for sustained intracellular delivery and prolonged effects of drugs. **Blood**, v. 105, n. 2, p. 650-8, 2005.

MURO, S.; WIEWRODT, R.; THOMAS, A.; KONIARIS, L.; ALBELDA, S. M.; MUZYKANTOV, V. R.; KOVAL, M. A novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1. **J Cell Sci.**, v. 116, n. Pt 8, p. 1599-609, 2003.

MULTHAUPT, H. A.; YONEDA, A.; WHITEFORD, J. R.; OH, E. S.; LEE, W.; COUCHMAN, J. R. Syndecan signaling: when, where and why? **J Physiol Pharmacol.**, v. 4, p. 31-8, 2009.

MUSSAP, M.; DEGRANDI, R.; FRAVEGA, M.; FANOS, V. Acute kidney injury in critically ill infants: the role of urine Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL). **J Matern Fetal Neonatal Med.**, v. 3, p. 70-2, 2010.

NAHORI MA, FOURNIÉ-AMAZOUZ E, QUE-GEWIRTH NS, BALLOY V, CHIGNARD M, RAETZ CR, SAINT GIRONS I, WERTS C. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. **J Immunol.**, v. 175, p. 6022-6031, 2005.

NALLY, J. E.; TIMONEY, J. F.; STEVENSON, B. Temperature-regulated protein synthesis by *Leptospira interrogans*. **Infect Immun.**, v. 69, n. 1, p. 400-4, 2001.

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. **Infect Immun.**, v. 75, n. 2, p. 766-773, 2007.

NAVARRETE-ESPINOSA, J.; ACEVEDO-VALES, J. A.; HUERTA-HERNÁNDEZ, E.; TORRES-BARRANCA, J.; GAVALDÓN-ROSAS, D. G. Prevalencia de anticuerpos contra dengue y leptospira en la población de Jáltipan, Veracruz. **Salud Pública Mex.**, v. 48, p. 220-228, 2006.

NEGUSSIE, Y.; REMICK, D. G.; DEFORGE, L. E.; KUNKEL, S. L.; EYNON, A.; GRIFFIN, G. E. Detection of plasma tumor necrosis factor, interleukins 6, and 8 during the Jarisch-Herxheimer Reaction of relapsing fever. **J Exp Med.**, v. 175, n. 5, p. 1207-12, 1992.

NEVES, E. D. S., PEREIRA, M. M.; GALHARDO, M. C.; CAROLI, A.; ANDRADE, J.; MORGADO, M. G.; MENDES, R. P. Leptospirosis patient with AIDS: the first case reported. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 27, p. 39–42, 1994.

NEWMAN et al.. Soluble E-selectin is found in supernatants of activated endothelial cells and is elevated in the serum of patients with septic shock. **J Immunol.**, v. 150, n. 2, p. 644-54, 1993.

NICHOLSON, G. D.; EDWARDS, C. N.; HASSELL, T. A.; EVERARD, C. O.; CALLENDER, J. Urinary diagnostic indices in the management of leptospirosis. Selection of patients for dialysis therapy. **West Indian Med. J.**, v.38, p. 33-38, 1989.

NICHOLSON, V. M.; PRESCOTT, J. F. Outer membrane proteins of three pathogenic *Leptospira* species. **Vet Microbiol.**, v. 36. n. 1-2, p. 123-38, 1993.

NICODEMO, A. C.; DUARTE, M. I.; ALVES, V. A.; TAKAKURA, C. F.; SANTOS, R. T.; NICODEMO, E. L. Lung lesions in human leptospirosis: Microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 56, p. 181-187, 1997.

NIE, D. K.; WU, S. H.; SHI, M. H.; LU, M. L.; JIANG, X. G.; ZHU, G. F.; WANG, H. Q.; LIU, Y. M. Studies on endotoxin of *Leptospira*. I. Extraction of lipopolysaccharides from *Leptospira interrogans* serovar Lai and analysis of their chemical and biological properties. **Chung Kuo I Hsueh Ko Hsueh Yuan Hsueh Pao**, v. 6, p. 321–325, 1984.

OKOUCHI, M.; OKAYAMA, N.; SHIMIZU, M.; OMI, H.; FUKUTOMI, T.; ITOH, M. High insulin exacerbates neutrophil-endothelial cell adhesion through endothelial surface expression of intercellular adhesion molecule-1 via activation of protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. **Diabetologia**, v. 45, p. 556–559, 2002.

OLIVEIRA, M. J.; SILVA JÚNIOR, G. B.; ABREU, K. L.; ROCHA, N. A.; GARCIA, A. V.; FRANCO, L. F.; MOTA, R. M.; LIBÓRIO, A. B.; DAHER, E. F. Risk factors for acute kidney injury in visceral leishmaniasis (kala-azar). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, p. 449-453, 2010

ONozATO, M. L.; TOJO, A.; GOTO, A.; FUJITA, T. Radical scavenging effect of gliclazide in diabetic rats fed with a high cholesterol diet. **Kidney Int**, v. 65, p. 951–960, 2004.

OSTERMANN, M.; CHANG, R. Correlation between the AKI classification and outcome. **Crit. Care**, v.12, p. R144, 2008.

PADBERG, J. S. et al. Damage of the Endothelial glycocalyx in chronic kidney disease. **Atherosclerosis**, v. 234, p. 335–343. 2014.

- PAIZE, F. et al. Changes in the sublingual microcirculation and endothelial adhesion molecules during the course of severe meningococcal disease treated in the paediatric intensive care unit. *Intensive Care Med.*, v. 38, n. 5, p. 863-71, 2012.
- PALAIOLOGOU, M.; DELLADETSIMA, I.; TINIAKOS D. CD138 (syndecan-1) expression in health and disease. *Histol Histopathol*, 2013.
- PALANIAPPAN, R. U. et al. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*, v. 70, n. 11, p. 5924–5930, 2002.
- PALANIAPPAN, R.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis*, v. 20, n. 3, p. 284–292, 2007.
- PALMER, M. F.; ZOCHOWSKI, W. J. Survival of leptospires in commercial blood culture systems revisited. *J Clin Pathol.*, v. 53, p. 713-714, 2000.
- PANAPHUT, T.; DOMRONGKITHAPORN, S.; VIBHAGOOL, A.; THINKAMROP, B.; SUSANENGRAT, W. Ceftriaxone compared with sodium penicillin G for treatment of severe leptospirosis. *Clin. Infect. Dis.*, v.36, p. 1507–1513, 2003.
- PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; SIOZOPOULOU, V.; CHRISTOU, L.; AKRITIDIS, N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int. J. Infect. Dis.*, v.12, p. 351-357, 2008.
- PARIS, D. H.; JENJAROEN, K.; BLACKSELL, S. D.; PHETSOUVANH, R.; WUTHIEKANUN, V.; NEWTON, P. N.; DAY, N. P.; TURNER, G. D. Differential patterns of endothelial and leucocyte activation in 'typhus-like' illnesses in Laos and Thailand. *Clin Exp Immunol.*, v. 153, n.1, p. 63-7, 2008.
- PARK, C. W. et al. High glucose-induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression through an osmotic effect in rat mesangial cells is PKC-NFkappa B-dependent. *Diabetologia*, v. 43, p. 1544–1553, 2000.
- PASHKOW, F. J.; CALISHER, C. H.; RELLER, L. B.; SULZER, C. R. Leptospirosis in a traveler from Honduras. *Colo Med.*, v. 78, n. 6, p. 210-2, 1981.
- PATTI, J. M.; ALLEN, B. L.; MCGAVIN, M. J.; HÖÖK, M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol*, v. 48, p. 585–617, 1994.
- PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Travel-acquired leptospirosis. *J. Travel Med.*, v.15, p. 447-453, 2008.
- PHIMDA, K. et al. Doxycycline versus azithromycin for treatment of leptospirosis and scrub typhus. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 51, n. 9, p. 3259-63, 2007.
- PINNE, M.; HAAKE, D. A. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. *PLoS One*, v. 4, n. 6, p. E6071, 2009.

POUND, M. W; MAY, D. B. Proposed mechanisms and preventative options of Jarisch-Herxheimer reactions. **J Clin Pharm Ther.**, v. 30, n. 3, p. 291-5, 2005.

PRABHU, A.; SUJATHA, D. I.; NINAN, B.; VIJAYALAKSHMI, M. A. Neutrophil gelatinase associated lipocalin as a biomarker for acute kidney injury in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. **Ann Vasc Surg.**, v. 24, n. 4, p. 525-31, 2010.

PRINCIPI, M. et al. Differential immunohistochemical expression of syndecan-1 and tumor necrosis factor alpha in colonic mucosa of patients with Crohn's disease. **Immunopharmacol Immunotoxicol.**, v. 28, n. 2, p. 185-95, 2006.

PUPKEVICH-DIAMANT, I. A. S.; GURFINKEL, L. R.; NISNEVICH, E. B. Electrocardiographic changes in leptospirosis. **Klin Med (Mosk).**, v. 68, n. 3, p. 82-6, 1990.

QIN, J. H. et al. Genome-wide transcriptional analysis of temperature shift in *L. interrogans* serovar lai strain 56601. **BMC Microbiol.**, v. 9, n. 6, p. 51, 2006.

QUE-GEWIRTH, N. L. et al. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* lipid A. **J Biol Chem.**, v. 279, p. 25420- 25429, 2004.

RABB, H. et al. Antibodies to ICAM-1 protect kidneys in severe ischemic reperfusion injury. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 211, p. 67-73, 1995.

RAO, P. S.; SHIVANANDA, P. G. Comparison of darkground microscopy with serological tests in the diagnosis of leptospirosis with hepatorenal involvement--A preliminary study. **Indian J Pathol Microbiol.**, v. 41, n. 4, p. 427-9, 1998.

RAOULT, D.; JEANDEL, P.; MAILLOUX, M.; ROUGIER, Y. Thrombocytopenia and renal failure in leptospirosis. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 32, p. 1464-1464, 1983.

RAPTIS, L.; PAPPAS, G.; AKRITIDIS, N. Use of ceftriaxone in patients with severe leptospirosis. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.28, p. 259-261, 2006.

RATNAM, S. et al. Humoral and cell-mediated immune responses to leptospires in different human cases. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, p. 539-542, 1984.

RICCI, Z.; CRUZ, D. N.; RONCO, C. Classification and staging of acute kidney injury: beyond the RIFLE and AKIN criteria. **Nat Rev Nephrol.**, v. 7, n. 4, p. 201-8, 2011.

RISTOW, P. et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 7, p. e97, 2007.

RUBINSTEIN, T.; PITASHNY, M.; PUTTERMAN, C. The novel role of neutrophil gelatinase-B associated lipocalin (NGAL)/Lipocalin-2 as a biomarker for lupus nephritis. **Autoimmun Rev.**, v. 7, n. 3, p. 229-34, 2008.

RUSSELL, K. L. et al. An outbreak of leptospirosis among Peruvian military recruits. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 69, n. 1, p. 53-7, 2003.

SACRAMENTO, E. et al. Electrocardiographic alterations in patients hospitalized with leptospirosis in the Brazilian City of Salvador. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.78, p. 267-270, 2002.

SAVERY, M. D.; JIANG, J. X.; PARK, P. W.; DAMIANO, E. R. The endothelial glycocalyx in syndecan-1 deficient mice. **Microvasc Res.**, v. 87, p. 83-91, 2013.

SCHMIDT-OTT, K. M. et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia. **Curr Opin Nephrol Hypertens.**, v. 15, n. 4, p. 442-9, 2006.

SCHOLZ, D. et al. Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture. **Cell Tissue Res.**, v. 284, n. 3, p. 415-23, 1996.

SCHOONE, G. J. et al. An immunoprotective monoclonal antibody directed against *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. **J. Gen. Microbiol.**, v. 135, p. 73-78, 1989.

SCHRIER, R. W.; WANG, W.; POOLE, B.; MITRA, A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. **J. Clin. Invest.**, v.114, n. 1, p. 5-14, 2004.

SCHUETZ, P.; JONES, A. E.; AIRD, W. C.; SHAPIRO, N. I. Endothelial cell activation in emergency department patients with sepsis-related and non-sepsis-related hypotension. **Shock**, v. 36, p. 104-8, 2011.

SCHWARZ-LINEK, U.; HÖÖK, M.; POTTS, J. R. The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. **Mol Microbiol**, v. 52, n. 3, p. 631-641, 2004.

SEGRS, R. et al. Presence of putative sphingomyelinase genes among members of the family Leptospiraceae. **Infect Immun**, v. 60, n. 4, p. 1707-1710, 1992.

SEGURO, A. C.; ANDRADE, L. Pathophysiology of leptospirosis. **Shock.**, v. 39, n. 1, p.17-23, 2013.

SEGURO, A. C.; LOMAR, A. V.; ROCHA, A. S. Acute renal failure of leptospirosis: Nonoliguric and hypokalemic forms. **Nephron**, v.55, p. 146-151, 1990.

SEHGAL, S. C. et al. Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. **Int J Antimicrob Agents.**, v.13, n. 4, p 249-55, 2000.

SESSLER, C. N. et al. Circulating ICAM-1 is increased in septic shock. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 151, n. 5, p. 1420-7, 1995.

SHAFTI-KERAMAT, S. et al. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. **J Virol.**, v. 77, n. 24, p.13125-35, 2003.

SHANG, E. S.; SUMMERS, T. A.; HAAKE, D. A. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2322–2330, 1996.

SHARMA, K. K.; KALAWAT, U. Early diagnosis of leptospirosis by conventional methods: one-year prospective study. **Indian J Pathol Microbiol.**, v. 51, n. 2, p. 209-11, 2008.

SHENOY, V. V. et al. Pulmonary leptospirosis: an excellent response to bolus methylprednisolone. **Postgrad Med J.**, v. 82, n. 971, p. 602-6, 2006.

SHI, Q.; JIANG, J.; LUO, G. Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes. **J Virol.**, v. 87, n. 12, p. 6866-75, 2013.

SILVA, H. R. et al. Síndrome da meningite asséptica por enterovírus e *Leptospira* sp em crianças de Salvador, Bahia. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 35, n. 2, p.159-65, 2002.

SILVA, G. B.; LIBÓRIO, A. B.; MOTA, R. M.; ABREU, K. L.; SILVA, A. E.; ARAÚJO, S. M.; DAHER, E. F. Acute kidney in AIDS: frequency, RIFLE classification and outcome. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.43, p. 1102-1108, 2010.

SIMON, F. et al. Leptospirosis in a French traveler returning from Mauritius. **J Travel Med.**, v.19, n. 1, p. 69-71, 2012.

SIRIWANIJ, T. et al. Haemodynamics in leptospirosis: effects of plasmapheresis and continuous venovenous haemofiltration. **Nephrology**, v.10, p. 1-6, 2005.

SITPRIJA, V.; KASHEMSANT, U.; SRIRATANABAN, A.; ARTHACHINTA, S.; POSHYACHINDA, V. Renal function in obstructive jaundice in man. Cholangiocarcinoma model. **Kidney Int.**, v.38, p. 948-955, 1990.

SITPRIJA, V.; LOSUWANRAK, K.; KANJANABUCH, T. Leptospiral nephropathy. **Semin Nephrol.**, v. 23, n. 1, p. 42-8, 2003.

SLACK, A. et al. Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 57, n. 4, p. 361-6, 2007.

SMITH, A. J.; SCHACKER, T. W.; REILLY, C. S.; HAASE, A. T. A role for syndecan-1 and claudin-2 in microbial translocation during HIV-1 infection. **J Acquir Immune Defic Syndr.**, v. 55, n. 3, p. 306-15, 2010.

SMITS, H. L. et al. International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. **J Clin Microbiol.**, v. 37, n. 9, p. 2904-9, 1999.

SMITS, H. L. et al. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. **J Clin Microbiol.**, v. 38, n. 3, p. 1272-5, 2000.

SMITS, H. L. et al. Latex based, rapid and easy assay for human leptospirosis in a single test format. **Trop Med Int Health.**, v. 6, n. 2, p.114-8, 2001.

SOARES, T. S. M.; LATORRE, M. R. D. O.; LAPORTA, G. Z.; BUZZAR, M. R. Spatial and seasonal analysis on leptospirosis in the municipality of São Paulo, Southeastern Brazil, 1998 to 2006. **Rev. Saúde Pública**, v.44, p. 283-291, 2010.

SOUZA, A. I.; NOGUEIRA, J. M. R.; PEREIRA, M. M. Anticorpos anti-leptospira em pacientes de Mato Grosso do Sul com suspeita clínica de dengue ou hepatite viral. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.40, p. 431-435, 2007.

STEVEN, J. et al. Sporadic Anicteric Leptospirosis in South Vietnam: A Study in 150 Patients. **Ann Intern Med.**, v. 79, n. 2, p. 167-173, 1973.

STEVENSON, B. et al. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. **PLoS One**, v. 2, n. 11, p. e1188, 2007.

STIEF, T. W. et al. Analysis of hemostasis alterations in sepsis. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 18, p. 179-86, 2007.

STIMSON A. M. Note on an Organism Found in Yellow-Fever Tissue. **Public Health Reports** (1896-1970), v. 22, n. 18, p. 541, 1907. Disponível em <http://www.jstor.org/stable/4559008> Acessado em: 15/12/2013

SUPUTTAMONGKOL, Y. et al. An open, randomized, controlled trial of penicillin, doxycycline, and cefotaxime for patients with severe leptospirosis. **Clin Infect Dis.**, v. 39, n.10, p. 1417-24, 2004.

SUPUTTAMONGKOL, Y. et al. Strategies for diagnosis and treatment of suspected leptospirosis: a cost-benefit analysis. **PLoS Negl Trop Dis.**, v.4, n. 2, p. e610, 2010.

SVENNEVIG, K.; KOLSET, S. O.; BANGSTAD, H. J. Increased syndecan-1 in serum is related to early nephropathy in type 1 diabetes mellitus patients. **Diabetologia**, v. 49, n. 9, p. 2214-6, 2006.

SWAIN, R. H. A. The electron-microscopical anatomy of *Leptospira canicola*. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 73, p. 155–158, 1957.

TAKADA, M, et al. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. **J Clin Invest**, v. 99, p. 2682–2690, 1997.

TAKAFUJI, E. T. et al. An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. **N Engl J Med.**, v. 310, n. 8, p. 497-500, 1984.

TANSUPHASIRI, U. et al. A test strip IgM dot-ELISA assay using leptospiral antigen of endemic strains for serodiagnosis of acute leptospirosis. **J Med Assoc Thai.**, v. 88, n. 3, p. 391-8, 2005.

TCHINDA, V. H. et al. Severe malaria in Cameroonian children: correlation between plasma levels of three soluble inducible adhesion molecules and TNF-alpha. **Acta Trop.**, v. 102, n. 1, p. 20-8, 2007.

TREVEJO, R. T. et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. **J. Infect. Dis.**, v.178, p. 1457-1463, 1998.

TRUEBA, G. A.; BOLIN, C. A.; ZUERNER, R. L. Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 4761–4768, 1992.

TUBIANA, S. et al. Risk factors and predictors of severe leptospirosis in New Caledonia. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 7, p. e1991, 2013.

TUNG, J.; YANG, C.; CHOU, S.; LIN, C.; SUN, Y. Calcium binds to LipL32, a lipoprotein from pathogenic *Leptospira*, and modulates fibronectin binding. **J Biol Chem**, v. 285, n. 5, p. 3245–3252, 2010.

TURNER, L. H. Leptospirosis III. Maintenance, isolation and demonstration of leptospire. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 64, p. 623–646, 1970.

TURNER, G. D. et al. Systemic endothelial activation occurs in both mild and severe malaria. Correlating dermal microvascular endothelial cell phenotype and soluble cell adhesion molecules with disease severity. **Am J Pathol**, v. 152, p. 1477-87, 1998.

VAN DE WERVE, C. et al. Travel-related leptospirosis: a series of 15 imported cases. **J Travel Med.**, v. 20, n. 4, p. 228-31, 2013.

VANHOLDER, R.; SEVER, M. S.; EREK, E.; LAMEIRE, N. Rhabdomyolysis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.11, p. 1553-1561, 2000.

VAUGHAN, C.; CRONIN, C. C.; WALSH, E. K.; WHELTON, M. The Jarisch-Herxheimer reaction in leptospirosis. **Postgrad Med J.**, v. 70, n. 820, p. 118-21, 1994.

PAULA, E. V. **Leptospirose humana**: uma análise climato-geográfica de sua manifestação no Brasil, Paraná e Curitiba. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 12., 2005, Goiânia. Anais.Goiânia, 2005. v.1, p. 2301-2308.

VERMA, A. et al. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. **Infect Immun**, v. 74, n. 5, p. 2659–2666, 2006.

VERMA, A. et al. Leptospiral endostatin like protein a is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. **Infect Immun**, v. 78, n. 5, p. 2053–2059, 2010.

VICKERY, B.; FLYNN, S. A.; CALDER, L.; FREEBAIRN, R. C. Leptospirosis presenting to an intensive care unit in provincial New Zealand: a case series and review. **Crit Care Resusc.**, v. 8, n. 3, p. 192-9, 2006.

VIEIRA, M. L. et al. A novel leptospiral protein increases ICAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 276, n. 2, p. 172-80, 2007.

VIEIRA, M. L. et al. Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. **J Infect** 2010;60(1):52–64.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; UMAPATHI, T.; SEHGAL, S. C. Evaluation of darkground microscopy as a rapid diagnostic procedure in leptospirosis. **Indian J. Med. Res.**, v. 114: 54-58, 2001.

VINH, T.; ADLER, B.; FAINE, S. The role of macrophages in the protection of mice against leptospirosis: in vitro and in vivo studies. **Pathology**, v. 14, n. 4, p. 463–468, 1982.

VIRIYAKOSOL, S. et al. Toll-like receptor 4 protects against lethal *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae infection and contributes to in vivo control of leptospiral burden. **Infect Immun**, v. 74, n. 2, p. 887–895, 2006.

VLAHU, C. A. et al. Damage of the endothelial glycocalyx in dialysis patients. **J Am Soc Nephrol.**, v. 23, n. 11, p. 1900-8, 2012.

WATT, G.; PADRE, L. P.; TUAZON, M. L.; CALUBAQUIB, C.; SANTIAGO, E.; RANOA, C. P.; LAUGHLIN, L. W. Placebo controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. **Lancet**, v.1, p. 433-435, 1988.

WATT, G.; PADRE, L. P.; TUAZON, M.; CALUBAQUIB, C. Limulus lysate positivity and Herxheimerlike reactions in leptospirosis : a placebo controlled study. **J. Infect. Dis.**, v.162, p. 564-567, 1990.

WEIGAND, M. A. et al. Circulating intercellular adhesion molecule-1 as an early predictor of hepatic failure in patients with septic shock. **Crit Care Med**, v. 27, p. 2656-61, 1999.

WERTS, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nat Immunol**, v. 2, n. 4, p. 346–352, 2001.

WHALEN, M. J. et al. Intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 are increased in the plasma of children with sepsis-induced multiple organ failure. **Crit Care Med**, v. 28, p. 2600-7, 2000.

WU, T.; DEATH, A.; YUE, D. Molecular and clinical measures of cell adhesion under the synergistic influence of diabetic nephropathy and high glucose. **Meeting Proceedings: Annual Scientific Meeting of the Australian Diabetes Society**, p 62, 2004.

XIAN, X.; GOPAL, S.; COUCHMAN, J. R. Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. **Cell Tissue Res.**, v. 339, n. 1, p. 31-46, 2010.

XU, S. Y.; PAUKSEN, K.; VENGE, P. Serum measurements of human neutrophil lipocalin (HNL) discriminate between acute bacterial and viral infections. **Scand J Clin Lab Invest.**, v. 55, n. 2, p. 125-31, 1995.

XU S, VENGE P. Lipocalins as biochemical markers of disease. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1482, n. 1-2, p. 298-307, 2000.

YAITA, K. et al. Leptospirosis: a Japanese traveler returned from Laos. **Intern Med.**, v. 52, n. 12, p. 1439, 2013.

YAN, W. et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. **Microbes Infect**, v. 11, n. 2, p. 230–237, 2009.

YANAGIHARA, Y.; KOJIMA, T.; MIFUCHI, I. Hemolytic activity of *Leptospira interrogans* serovar canicola cultured in protein-free medium. **Microbiol. Immunol.**, v. 26, p. 547–556, 1982.

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

YANG, C. W. et al. The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis–mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. **J Am Soc Nephrol.**, v. 13, p. 2037-2045, 2002.

YANG, H. Y. et al. Clinical distinction and evaluation of leptospirosis in Taiwan--a case-control study. **J. Nephrol.**, v.18, p. 45-53, 2005.

YANG, C. W.; HUNG, C. C.; WU, M. S.; TIAN, Y. C.; CHANG, C. T.; PAN, M. J.; VANDEWALLE, A. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. **Kidney Int.**, v.69, p. 815-822, 2006.

YERSIN, C. et al. Pulmonary haemorrhage as a predominant cause of death in leptospirosis in Seychelles. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 94, n. 1, p. 71-6, 2000.

ZAKI, M. S.; EL-SAYED, H. Evaluation of microbiologic and hematologic parameters and E-selectin as early predictors for outcome of neonatal sepsis. **Arch Pathol Lab Med**, v. 133, p. 1291-6, 2009.

ZAKI, S. R.; SPIEGEL, R. A. **Leptospirosis**. In: Nelson AM, Horsburgh CR, eds. Pathology of Emerging Infections, vol 2. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, p. 73-92, 1998.

ZHANG, S. et al. Syndecan-1 and heparanase: potential markers for activity evaluation and differential diagnosis of Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis.**, v. 19, n. 5, p. 1025-33, 2013.

ZHAO, J. F. et al. Identification of *Leptospira interrogans* phospholipase C as a novel virulence factor responsible for intracellular free calcium ion elevation during macrophage death. **PLoS One.**, v. 8, n. 10, p. e75652, 2013.

ZVIBEL, I. et al. Syndecan 1 (CD138) serum levels: a novel biomarker in predicting liver fibrosis stage in patients with hepatitis C. **Liver Int.**, v. 29, n. 2, p. 208-12, 2009.

ANEXO A- PARECER COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL SÃO JOSÉ DE
DOENÇAS INFECCIOSAS - HSJ
/ SECRETARIA DE SAÚDE DE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O Dano Endotelial, Tubular e de Glicocálice na Lesão Renal Aguda da Leptospirose.

Pesquisador: Marcelo Boecker Munõz Braz

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30416814.5.0000.5044

Instituição Proponente: Hospital São José de Doenças Infecciosas - HSJ / Secretaria de Saúde

Patrocinador Principal: CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 783.272

Data da Relatoria: 29/08/2014

Apresentação do Projeto:

É um estudo observacional, analítico e transversal que foi realizado de junho de 2011 a agosto de 2011 é tem como objetivo avaliar a associação entre a presença e a severidade de lesão renal em pacientes com leptospirose e os níveis de biomarcadores que representam a lesão tubular, endotelial ou do glicocálice. Determinar a prevalência e classificar a lesão renal aguda de acordo com o protocolo "Kidney Disease Improving Global Outcome (KDIGO). Estabelecer a relação entre esta classificação e o nível de lesão tubular proximal, estimado pelos valores do biomarcador Lipocalina Associada à Gelatinase de Neutrófilos – NGAL. Estabelecer a relação entre esta classificação e o nível de lesão endotelial, estimado pelos valores do biomarcador ICAM-1. Estabelecer a relação entre esta classificação e o nível de lesão do glicocálice endotelial, estimado pelos valores do biomarcador Syndecan-1.

Nosso estudo avaliará pacientes de um surto de leptospirose ocorrido entre militares no Brasil em 2011 quanto à prevalência de lesão renal aguda e sua severidade, relacionando esta lesão às dosagens de biomarcadores de lesão tubular renal (NGAL), lesão endotelial (ICAM-1) e do glicocálice (Syndecan-1). A lesão renal aguda será definida de acordo com consenso internacional (KDIGO).

Endereço: Rua Nestor Barbosa, 315

Bairro: Parquelândia

CEP: 60.455-610

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3452-7880

Fax: (85)3101-2319

E-mail: melmedeiros@hotmail.com

HOSPITAL SÃO JOSÉ DE
DOENÇAS INFECCIOSAS - HSJ
/ SECRETARIA DE SAÚDE DE



Continuação do Parecer: 783.272

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a associação entre a presença e a severidade de lesão renal em pacientes com leptospirose e os níveis de biomarcadores que representam a lesão tubular, endotelial ou do glicocálice.

Objetivo Secundário:

1. Determinar a prevalência e classificar a lesão renal aguda de acordo com o protocolo "Kidney Disease Improving Global Outcome (KDIGO)". 2. Estabelecer a relação entre esta classificação e o nível de lesão tubular proximal, estimado pelos valores do biomarcador Lipocalina Associada à Gelatinase de Neutrófilos – NGAL. 3. Estabelecer a relação entre esta classificação e o nível de lesão endotelial, estimado pelos valores do biomarcador ICAM-1. 4. Estabelecer a relação entre esta classificação e o nível de lesão do glicocálice endotelial, estimado pelos valores do biomarcador Syndecan-1.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Esse trabalho apresenta risco mínimo pois todas as amostras de soro dos casos de leptospirose já se encontravam armazenadas por terem sido colhidas com finalidade clínica: diagnóstico etiológico e acompanhamento do tratamento. Apenas as coletas dos quinze controles saudáveis serão realizadas com finalidade de pesquisa científica. O restante dos dados será proveniente do estudo retrospectivo dos prontuários e resultados arquivados de dosagens laboratoriais. O anonimato será mantido para evitar a exposição dos pacientes em estudo.

Benefícios:

A oportunidade ímpar de estudar em um grupo homogêneo de jovens humanos saudáveis a performance de novos biomarcadores de lesão tubular, endotelial e glicocálix em casos de leptospirose, na sua capacidade de prever a lesão renal aguda, bem como aprofundar nosso conhecimento sobre a patogênese da lesão renal e vascular na leptospirose, que são os principais mecanismos de morte (insuficiência renal e hemorragia pulmonar) nesta zoonose de elevado potencial de gravidade e distribuição mundial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão revisados os prontuários e resultados de exames laboratoriais referentes aos pacientes atendidos por ocasião do surto de leptospirose ocorrido em julho de 2011. Sinais e sintomas, bem como exames laboratoriais de rotina serão extraídos de forma retrospectiva dos registros médicos. Amostras de soro inicialmente coletadas, foram processadas e armazenadas para análises posteriores, já que à época não havia definição da etiologia do surto. Anemia foi definida como

Endereço: Rua Nestor Barbosa, 315
Bairro: Parquelândia CEP: 60.455-610
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3452-7880 Fax: (85)3101-2319 E-mail: melmedeiros@hotmail.com

HOSPITAL SÃO JOSÉ DE
DOENÇAS INFECCIOSAS - HSJ
/ SECRETARIA DE SAÚDE DE



Continuação do Parecer: 783.272

níveis de hemoglobina inferiores a 12g/dL, e plaquetopenia como níveis de plaquetometria inferiores a 150x103/L. Quinze jovens saudáveis serão utilizados como controles para determinação dos níveis normais dos biomarcadores endoteliais.

Critério de Inclusão:

Serão incluídos todos os pacientes do surto de leptospirose de Maranguape em junho-agosto de 2011, com registro em prontuários médicos de dosagens de creatinina sérica e sintomatologia naquele período, e que tenham sorologia IgM-Elisa e/ou MAT positivos para leptospirose.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo com as pendências anteriores do projeto, foram apresentados os seguintes termos e declarações:

- Incluído TCLE dos sujeitos do grupo controle.
- Cronograma atualizado
- Informe o número de indivíduos abordados pessoalmente, recrutados, ou que sofrerão algum tipo de intervenção neste centro de pesquisa: 46
- Utilizarão as seguinte informações Identificação: Idade, Profissão, Prontuário Tempo de doença e classificação de sintomas, hemograma completo, Bioquímica (Uréia, Creatinina, Na, K, Cl, P, Ca, TGO e TGP, Bilirrubina total e frações. Testes com biomarcadores específicos ICAM-1 e Syndecan-1.
- Incluída Declaração de ausência de ônus financeiro do Hospital São José e do Hospital Geral de Fortaleza
- Declaração de participação dos pesquisadores incluída.

Recomendações:

Como não foi solicitado TCLE do grupo de pacientes com Leptospirose não poderá haver correlação entre dados laboratoriais e clínico-epidemiológicos a fim de garantir o sigilo dos mesmos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências anteriores foram adequadamente corrigidas através das novas declarações e documentação do pesquisador apresentadas ao CEP. Portanto, consideramos o trabalho aprovado. Recomendamos o envio de relatório para o Cep apos 6 meses da sua aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Nestor Barbosa, 315
Bairro: Parquelândia CEP: 60.455-610
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3452-7880 Fax: (85)3101-2319 E-mail: melmedeiros@hotmail.com

HOSPITAL SÃO JOSÉ DE
DOENÇAS INFECCIOSAS - HSJ
/ SECRETARIA DE SAÚDE DE



Continuação do Parecer: 783.272

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FORTALEZA, 08 de Setembro de 2014

Assinado por:
Melissa Soares Medeiros
(Coordenador)

Endereço: Rua Nestor Barbosa, 315
Bairro: Parquelândia **CEP:** 60.455-610
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3452-7880 **Fax:** (85)3101-2319 **E-mail:** melmedeiros@hotmail.com