

GLICOLIPOPROTEÍNA DE LEPTOSPIRA INTERROGANS SOROGRUPO ICTERHAEMORRHAGIAE: DISTRIBUIÇÃO EM FÍGADO E RIM DE COBAIAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS

R.T. MACÊDO SANTOS (1), E.E. SAKATA (2), P.H. YASUDA (3), A. WAKAMATSU (1), C.T. KANAMURA (1), I. CANDELORI (1), C.B. PESTANA (1) & V.A.F. ALVES (1)

RESUMO

Acredita-se que as lesões teciduais na leptospirose possam decorrer da ação direta das leptospirosas, de toxinas sintetizadas ou liberadas durante sua lise. O presente estudo visou a extração química da glicolipoproteína (GLP) da leptospira, a produção de anti-soro anti-GLP e a avaliação de sua distribuição em cortes de fígado e rim de cobaias inoculadas e sacrificadas em estudo sequencial diário até o 6º dia de infecção, correspondente ao pico da doença. Procurou-se também correlacionar a expressão tecidual da GLP com o grau de lesões locais, em busca de novos subsídios para a compreensão da patogenia da leptospirose. A GLP foi detectada em fígado e rim de 2 dentre 6 cobaias no 5º dia e em todas as 6 no 6º dia de infecção, sob a forma de grânulos no citoplasma de macrófagos, livres no interstício ou acolados à membrana de células endoteliais e parenquimatosas, especialmente nas regiões mais lesadas. A cronologia do aparecimento da GLP e sua distribuição sugerem tratar-se de produto de lise de leptospirosas fagocitadas por macrófagos e que esta substância, conquanto não comprovada como iniciadora das lesões, associa-se a seu agravamento nas etapas mais avançadas da leptospirose.

UNITERMOS: Glicolipoproteína; Leptospirose; Imunohistoquímica.

INTRODUÇÃO

Estudos clínicos e anátomo-patológicos da leptospirose têm sugerido que as lesões ou as disfunções orgânicas possam ser causadas pela ação direta das leptospirosas, por toxinas elaboradas por essas bactérias ou liberadas durante a sua lise^{2,4,5,6,9,10,11,23,29}. Diversas tentativas de isolamento e caracterização de possíveis fatores tóxicos, foram realizadas por STALHEIM²⁴, MILLER e cols.¹⁹, JACKSON & ZEY¹⁶, KNIGHT e cols.¹⁷ e FAINE e cols.¹⁵. A ação citotóxica do

sorotipo **pomona** sobre cultura de fibroblastos foi demonstrada por YAM e cols.²⁸, sem entretanto caracterizar a natureza química responsável por essa atividade tóxica. Já, VINH e cols.²⁷ extraíram do sorotipo **copenhagên**, tanto de cepas virulentas quanto de cepas avirulentas, uma glicolipoproteína (GLP) de efeito citotóxico sobre fibroblastos de camundongos e sugeriram ser o componente lipídico dessa GLP o fator responsável por essa toxicidade.

(1) Divisão de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

(2) Seção de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

(3) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Endereço para correspondência: Dr. Venâncio A.F. Alves. Divisão de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355. Caixa Postal 7027. CEP 01246 São Paulo, SP, Brasil.

Tendo em vista novos subsídios à compreensão da patogenia da leptospirose, o presente estudo teve como objetivo a extração química da glicolipoproteína (GLP) de *Leptospira*, a produção de anti-soro de coelho anti-GLP e, através de técnicas imunohistoquímicas, a avaliação de sua presença em tecidos de cobaias inoculadas experimentalmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração da GLP — A amostra utilizada foi a cepa 15/86 isolada de paciente internado no Hospital Emilio Ribas e tipificada como sendo do sorotipo *monymusk* do grupo Icterohaemorrhagiae de *L. interrogans*, pela técnica de absorção cruzada de aglutininas.

Segundo a técnica de VINH e cols.²⁷, a cultura de 7 dias à 30°C em meio EMJH (Difco) foi centrifugada e seu sedimento ressuspense em solução Tris/HCl 0,01M pH 7.4, contendo 50 mcg de lisozima (Sigma) e incubado por 18 horas a 34°C. As leptospiras assim tratadas foram submetidas a nova centrifugação a 20.000 x g por 30 minutos e seu sobrenadante foi tratado com uma mistura de 50 mcg/ml de RNase e de DNase (Sigma) por 3 horas a 37°C. A seguir foi realizada diálise com solução tampão Tris/HCl pH 7.4 por 24 horas a 4°C e o dialisado foi acidificado até pH 3.7 com solução de ácido acético 1M. Formou-se então um precipitado, correspondente à glicolipoproteína (GLP), que foi centrifugado a 37.000 x g por 30 minutos e lavado 2 vezes com ácido acético 0.1M.

Obtenção de anti-GLP em coelho — 2 mg de GLP (peso úmido) foram ressuspensos em PBS, emulsionados v/v com adjuvante incompleto de Freund e injetados intradermicamente em coelhos de 4kg. Após 3 semanas, procedeu-se à sangria de prova e o teor de anticorpos anti-GLP foi dosado pela reação de soroaglutinação microscópica, empregando a própria cepa 15/86.

Reprodução experimental da leptospirose em cobaias — Foi realizado um estudo sequencial diário até o 6º dia de infecção utilizando 30 cobaias recém-desmamadas, pesando de 170 a 200 gramas e inoculadas com a cepa 15/86. Os grupos foram assim constituídos:

Grupo 1: 2 cobaias sacrificadas no 1º dia após inoculação

Grupo 2: 2 cobaias sacrificadas no 2º dia após inoculação

Grupo 3: 2 cobaias sacrificadas no 3º dia após inoculação

Grupo 4: 6 cobaias sacrificadas no 4º dia após inoculação

Grupo 5: 6 cobaias sacrificadas no 5º dia após inoculação

Grupo 6: 6 cobaias sacrificadas no 6º dia após inoculação

Cada cobaia dos grupos teste (1 a 6) foi inoculada por via intraperitoneal com 1 ml de cultura, de 5 a 7 dias a 28-30°C em meio Fletcher e com densidade aproximada de 10 a 10 leptospiras/ml. Antes de serem sacrificadas, as cobaias foram submetidas à punção intracardíaca para obtenção de retrocultura como testemunho da etiologia.

O grupo-controle (grupo O) constituído de 6 cobaias, foi inoculado com 1 ml de meio Fletcher estéril.

Após o sacrifício, seguiu-se um exame macroscópico e a retirada de fragmentos de fígado e rim que, após fixação em solução de Bouin, desidratação em álcoois, diafanização em xilóis e inclusão em parafina, foram seccionados a 4 micrômetros para análises imunohistoquímicas.

Anti-soro — Soro total de coelho anti-GLP de leptospira, absorvido com pó de fígado e rim de cobaias normais na proporção de 0,1g/ml de soro diluído 1/2 durante uma noite, foi centrifugado a 3.000 xg por 15 minutos, sendo o sobrenadante utilizado como anticorpo primário na diluição 1/40. Como anticorpo secundário foi empregado soro de cabra anti-IgG de coelho diluído 1/50, obtido comercialmente (Diagnostic Reagents, USA). A amplificação foi feita pelo uso do complexo peroxidase anti-peroxidase (PAP) obtido em coelho (Dako, USA), diluído 1/2000.

Protocolo Imunohistoquímico — Foi utilizado o método de anticorpos não-conjugados, descrito por STERNBERGER e cols.²⁵ modificado às nossas condições laboratoriais, de acordo com ALVES e cols.¹, sendo agora introduzida a pré-digestão protéica com tripsina tipo II de pâncreas de porco (Sigma, USA), 15 mg% em tampão PBS 0,01M, contendo 134 mg% de cloreto de cálcio, ajustando-se o pH a 7.8, por 15 minutos a 37°C e a incubação com o anticorpo primário por 24 horas a 4°C.

Controles negativos:

1 — Casos-controle (grupo O) foram sempre submetidos às mesmas pesquisas de antígenos efetuadas nos demais grupos.

2 — Foi aplicada reação a cortes de tecido sabidamente positivos para o antígeno, mas omitindo-se a incubação com anticorpo primário.

3 — Idem, omitindo-se a incubação do anticorpo secundário.

4 — Idem, omitindo-se a incubação do complexo de amplificação.

5 — Idem, com incubação do sobrenadante resultante da absorção do anticorpo primário com excesso de GLP de leptospira.

Análise imunohistoquímica: A análise dos preparados foi efetuada por um único observador (V.A.F.A.), visando avaliar qualitativamente a distribuição da GLP nas estruturas hepáticas e renais das cobaias experimentalmente infectadas.

RESULTADOS

Nenhum dos controles negativos apresentou qualquer coloração à pesquisa imunohistoquímica, o mesmo sucedendo com as cobaias sacrificadas no 1º, 2º, 3º e 4º dias.

A glicolipoproteína foi encontrada no tecido hepático e renal apenas a partir do 5º dia de infecção, com padrão granuloso ou de curtos bastões.

No tecido hepático, dentre os casos do grupo 5, apenas as cobaias 5.1 e 5.6 mostraram-se positivas, notando-se raros grânulos no citoplasma de macrófagos, livres no interstício ou acolados à membrana de células endoteliais. Por outro lado, no 6º dia de infecção, todos os casos apresentaram número variável de grânulos no citoplasma de macrófagos (Fig. 1), livres no interstício ou acolados à membrana de células endoteliais e de hepatócitos (Fig. 2). Raros grânulos foram ainda visualizados no citoplasma destes últimos.

No tecido renal, no grupo 5, apenas as cobaias 5.1 e 5.6 exibiram raros grânulos de glicolipoproteína no citoplasma de macrófagos, livres no interstício ou na membrana de células endoteliais. Já no 6º dia, todas as cobaias apresentaram número variável de grânulos ou bastões em macrófagos (Fig. 3), livres no interstício ou na luz dos túbulos contornados em seus diversos segmentos, sendo também vistos acolados à membrana de células endoteliais e do epitélio tubular.

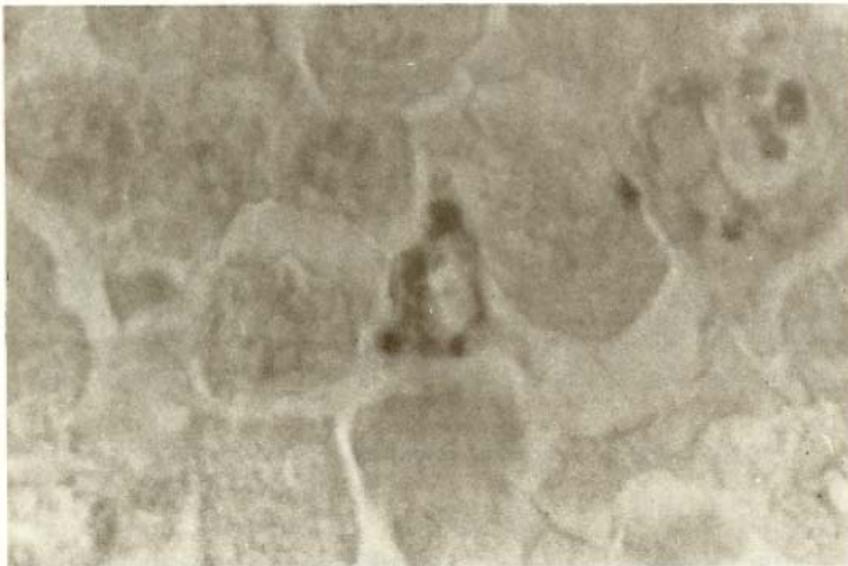


Fig. 1 — Caso 6.1 — Glicolipoproteína de leptospira, sob forma de grânulos grosseiros, é encontrada predominantemente no citoplasma de células de Kupffer. (1000 x PAP).

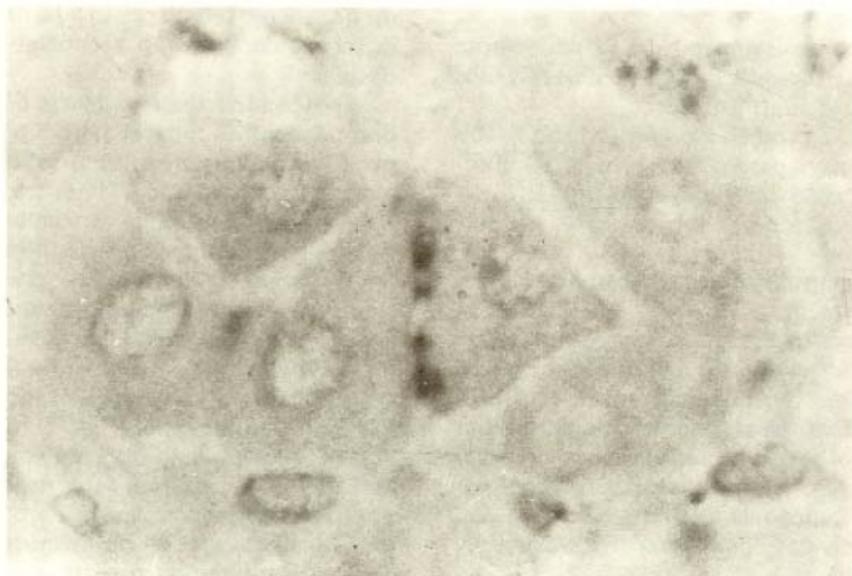


Fig. 2 — Caso 6.3 — Glicolipoproteína de leptospira aderida à membrana de hepatócitos em destrabeculação. (1000 x PAP).

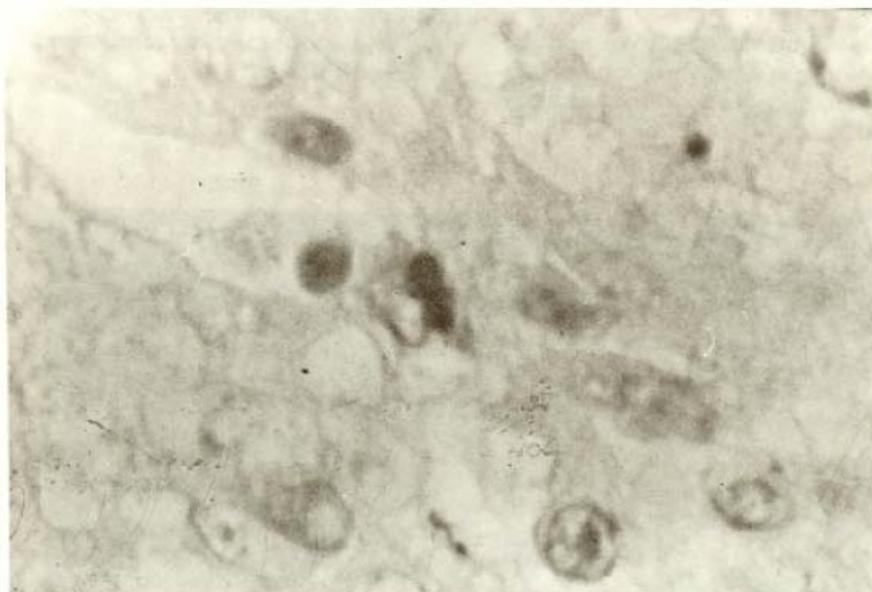


Fig. 3 — Caso 6.1 — Grânulos de glicolipoproteína de leptospira fagocitados por macrófagos no interstício renal (1000 x PAP).

DISCUSSÃO

Para o estudo das lesões máximas da leptospirose icterohemorrágica, selecionamos dentre as coleções de cultura de *L. interrogans* so-

rogrupo Icterohaemorrhagiae do Instituto Adolfo Lutz e Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, uma cepa (15/86) isolada de paciente internado no Hospital Emilio Ribas com quadro clínico exuberan-

te, incluindo icterícia, insuficiência renal aguda e diátese hemorrágica. A absorção cruzada de aglutininas, foi confirmada sua classificação no sorogrupo Icterohaemorrhagiae, sendo identificado como sorotipo **monymusk**.

Este estudo, com sacrifício sequencial diário de animais do 1º ao 6º dia de infecção, demonstrou-se suficiente para análise de todo o espectro da doença já que, no último dia do experimento três das cobaias evoluíram para morte espontânea, encontrando-se outras duas em fase agônica quando do sacrifício.

A detecção de antígenos específicos das leptospiros mediante imunohistoquímica enzimática, foi publicada por ELLIS e cols. (1983)¹⁴ que exploraram a expressão de antígenos em tecido de rim de porcos com objetivos de diagnóstico veterinário. Esses autores valorizaram apenas as estruturas antigênicas com formato de leptospiros íntegras e mostraram a alta sensibilidade e especificidade do método quando comparado com o diagnóstico obtido por cultura de leptospiros. No primeiro estudo referindo detecção imunohistoquímica enzimática de antígeno de leptospira em rim de cobaia¹ empregamos o complexo peroxidase anti-peroxidase. A seguir, constatamos a presença de antígeno de leptospira em tecidos humanos hepáticos e renais, comprovando a utilidade do método para diagnóstico em autópsias². Foi também esta a metodologia que usamos em recente estudo de lesões vasculares e cardíacas na leptospirose¹².

Estas experiências prévias levaram-nos a escolher o complexo peroxidase anti-peroxidase para a amplificação das reações com antígenos de leptospira.

Os anticorpos usados foram preparados a partir da própria cepa 15/86, empregada na inoculação de cobaias. Ressalte-se que, no presente estudo, o antígeno utilizado na produção de anti-soro consistiu apenas da glicolipoproteína GLP, extraída desta leptospira. Para obtenção de maior contraste foram efetuadas algumas modificações no método que descrevemos originalmente¹, sendo agora introduzida a pré-digestão proteica com tripsina e a incubação com o anticorpo primário por 24 horas.

A imunohistoquímica enzimática com emprego de peroxidase tem dentre suas principais características favoráveis a aplicabilidade a tecidos fixados e incluídos rotineiramente, desde que os antígenos não sejam totalmente destruídos por estes procedimentos, a manutenção da coloração por tempo indefinido e a possibilida-

de de análise à microscopia óptica convencional^{13,18,21,22,26}.

A amplificação pelo complexo peroxidase anti-peroxidase (PAP)²⁵, acarreta grande sensibilidade devido à formação de imunocomplexos mais volumosos, à estrutura cíclica do complexo PAP, que lhe confere grande estabilidade, e à ausência de ligações covalentes entre a enzima e os anticorpos envolvidos, não diminuindo a afinidade imunológica dos mesmos^{7,8,20}.

Conquanto a maioria dos estudiosos atribua a formação das lesões teciduais na leptospirose a efeito tóxico ligado às leptospiros, restam importantes questões sobre a participação direta do microorganismo através de sua movimentação ativa, como propuseram SITPRIJA e cols.²³, bem como a de seus componentes. Estes poderiam incluir produtos de síntese bacteriana ou corresponder a substâncias liberadas durante sua lise^{2,29}. Recentemente, VINH e cols.²⁷ extraíram uma glicolipoproteína a partir de cultura de *L. interrogans* sorotipo **copenhageni** e demonstraram sua toxicidade direta em fibroblastos de camundongos.

A glicolipoproteína extraída da leptospira, segundo método de VINH e col.²⁷, foi pela primeira vez detectada em tecido hepático e renal no presente trabalho, mostrando-se em pequena quantidade em apenas 2 casos no 5º dia e em abundância no 6º dia de infecção. Sua localização no fígado deu-se no citoplasma de células de Kupffer, nas membranas de células endoteliais e de hepatócitos. No rim, foram evidenciadas no citoplasma de macrófagos, livres no interstício e no epitélio ou luz tubular.

Em estudo recente³, observamos que neste modelo experimental, as lesões hepáticas e renais iniciam-se no 4º dia, crescendo até um pico no 6º dia de infecção, quando as cobaias sucumbem espontaneamente ou encontram-se em fase agônica.

A cronologia do aparecimento da GLP nos tecidos, bem como sua distribuição, sugerem que esta substância seja um dos produtos de lise das leptospiros quando fagocitadas pelos macrófagos.

Esta GLP, que foi recentemente extraída e demonstrada como citotóxica²⁷, neste estudo esteve presente nos últimos dois dias de infecção exatamente nos locais de alterações máximas. Tal achado sugere que esta substância, conquanto não comprovada como iniciadora da lesão nesta infecção de cobaias, possa se as-

sociar a seu intenso agravamento na fase final da doença.

SUMMARY

Glycolipoprotein from *Leptospira interrogans* serogroup icterohaemorrhagiae: immunohistochemical expression in liver and kidney of experimentally infected guinea-pigs.

Tissue damage in leptospirosis has been ascribed to direct effect of the microorganisms and/or their virulence, including products synthesised by leptospire or released during their lysis. This study aimed at chemical extraction of the glycolipoprotein (GLP) from virulent leptospire, production of a rabbit anti-GLP and analysis of its distribution in liver and kidney of inoculated guinea-pigs, sacrificed sequentially from the 1st to 6th day of infection, covering the whole spectrum of acute leptospirosis. The comparison of GLP expression to local injuries aimed at new pathogenetic data. GLP was detected in liver and kidney in 2 out of 6 guinea-pigs on the 5th day and in all 6 animais on the 6th day of infection. Granular forms were seen in the cytoplasm of macrophages, free in interstitium or adhered to endothelial and parenchymal cell membranes, especially in the most damaged sites. These findings lead us to the hypothesis of GLP as a toxic factor resulting from leptospiral lysis by macrophages. Although it was not proved as a promoter of initial lesions, it seems to be related to the enhancement of tissue damage late in the course of the disease.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, V.A.F.; YASUDA, P.H.; YAMASHIRO, E.H.; SANTOS, R.T.M.; YAMAMOTO, L.U. & DE BRITO, T. — An immunohistochemic assay to localize leptospire in tissue specimens. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 28:170-173, 1986.
2. ALVES, V.A.F.; VIANNA, M.R.; YASUDA, P.H. & DE BRITO, T. — Detection of leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. *J. Pathol.*, 151:125-131, 1987.
3. ALVES, V.A.F. — *Leptospirose experimental em cobaia: contribuição de dados morfológicos e imunohistoquímicos para a compreensão de sua patogenia*. São Paulo, 1988. (Tese de Doutorado — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).
4. AREAN, V.M. — Studies on the pathogenesis of leptospirosis. II — A clinicopathologic evolution of hepatic and renal function in experimental leptospiral infections. *Lab. Invest.*, 11:273-288, 1962.
5. ARRIAGA, A.J.D.; ROCHA, A.S.; YASUDA, P. & DE BRITO, T. — Morpho-functional patterns of kidney injury in the experimental leptospirosis of the guinea-pig (*L. icterohaemorrhagiae*). *J. Pathol.*, 138:145-161, 1982.
6. AUSTONI, M. & CORÁ, D. — The pathogenesis of kidney damage in human leptospirosis. *Trop. geogr. Med.*, 13:20-26, 1961.
7. BELLON, B.; SAPIN, C. & DRUET, P. — Comparaison de la sensibilité des techniques d'immunofluorescence et d'immunoperoxidase in methodes directe et indirecte. *Ann. Immunol. (Paris)*, 126c:15-22, 1975.
8. BURNS, J.; HAMBRIDGE, M. & TAYLOR, C.R. — Intracellular immunoglobulins: a comparative study on three standard tissue processing methods using horseradish peroxidase and fluorochrome conjugates. *J. clin. Pathol.*, 27:548-557, 1974.
9. DE BRITO, T. — *Lesões renais e hepáticas na leptospirose experimental do cobaio*. Ribeirão Preto, 1965. (Tese de Livre Docência — Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto).
10. DE BRITO, T.; PENNA, D.; SANTOS, H.; FREYMULLER, E.; ALMEIDA, S.S.; GALVÃO, P.A.A. & PEREIRA, V. — Electron microscopy of human leptospirosis (kidney biopsies). *Amer. J. Med.*, 14:397-403, 1965.
11. DE BRITO, T.; PENNA, D.O.; PEREIRA, V.G. & HOSHINO, S. — Kidney biopsies in human leptospirosis: a biochemical and electron microscopy study. *Virchows Arch. Path. Anat.* 343:124-135, 1967.
12. DE BRITO, T.; MORAIS, C.F.; YASUDA, P.H.; LANCELLOTTI, C.P.; SHIMIZU, S.H.; YAMASHIRO, E. & ALVES, V.A.F. — Cardiovascular involvement in human and experimental leptospirosis: Pathologic findings and immunohistochemical detection of leptospiral antigen. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 81:207-214, 1987.
13. DE LELLIS, R.A.; STERNBERGER, L.A.; MANN, R.B.; BANKS, P.M. & NAKANE, P.K. — Immunoperoxidase techniques in diagnosis pathology. *Amer. J. clin. Pathol.*, 71:483-488, 1979.
14. ELLIS, T.M.; ROBERTSON, G.M.; HUSTAS, L. & KIRBY, M. — Detection of leptospire in tissue using an immunoperoxidase staining procedure. *Aust. vet. J.*, 60:364-367, 1983.
15. FAINE, S.; ADLER, B. & PALIT, A. — Chemical and serological properties of a serotype-specific polysaccharide antigen in *Leptospira*. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 52:311-319, 1974.
16. JACKSON, S.W. & ZEY, P.N. Ultrastructure of lipopolysaccharide isolated from *Treponema pallidum*. *J. Bact.*, 114:838-844, 1973.
17. KNIGHT, L.L.; MILLER, N.G. & WHITE, R.J. — Cytotoxic factor in the blood and plasma of animals during leptospirosis. *Infect. Immun.*, 8:401-405, 1973.
18. MESA-TEJADA, R.; PASCAL, R.R. & FENOGLIO, C.M. — Immunoperoxidase: a sensitive immunohistochemical technique as a "special stain" in the diagnostic pathology laboratory. *Hum. Pathol.*, 8:313-320, 1987.

19. MILLER, N.G.; FOREHLING, R.C. & WHITE, R.S. — Activity of leptospire and their products on L cells monolayer. *Amer. J. vet. Res.*, 31:371-377, 1970.
20. MORIARTY, G.C.; MORIARTY, C.M. & STERNBERGER, L.A. — Ultrastructural immunocytochemistry by unlabelled antibodies and the PAP complex. A technique more sensitive than radioimmunoassay. *J. Histochem. Cytochem.*, 21:825-833, 1973.
21. NAKANE, P.K. & PIERCE, G.B. — Enzyme-labelled antibodies preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.*, 14:929-938, 1966.
22. PINKUS, G.S. — Diagnostic immunocytochemistry of paraffin-embedded tissues. *Hum. Path.*, 13:411-415, 1982.
23. SITPRIJA, V.; PIPATANAGUL, V.; MERTOWIDJOJO, K.; BOONPUCKNAVIG, V. & BOONPUCKNAVIG, S. — Pathogenesis of renal disease in leptospirosis: Clinical and experimental studies. *Kidney Int.*, 17:827-836, 1980.
24. STALHEIM, O.H.V. — A toxic factor in *Leptospira pomona*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 126:412-415, 1967.
25. STERNBERGER, L.A.; HARDY, P.H.; CUCULIS, J.J. & MEYER, H.G. — The unlabelled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (PAP) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, 18:315-333, 1970.
26. TAYLOR, C.R. — Immunoperoxidase techniques: practical and theoretical aspects. *Arch. Path. Lab. Med.*, 102:113-121, 1978.
27. VINH, T.; ADLER, B. & FAINE, S. — Glycolipoprotein cytotoxin from *Leptospira interrogans* serovar *co-penhageni*. *J. gen. Microbiol.*, 132:111-123, 1986.
28. YAM, P.A.; MILLER, N.G. & WHITE, R.J. — A leptospiral factor producing a cytopathic effect on L cells. *J. infect. Dis.*, 122:310-317, 1970.
29. YASUDA, P.H.; SHIMIZU, S.H.; YAMASHIRO, E.H. & DE BRITO, T. — Experimental leptospirosis (*L. interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*) of the guinea pig: leptospiral antigen, gamma globulin and complement C3 detection in the kidney. *Exp. Path.*, 29:35-43, 1986.

Recebido para publicação em 9/2/1989.