

COMPARAÇÃO E EFICÁCIA DE DIFERENTES VIAS DE DESAFIO PARA O MODELO LETAL DE LEPTOSPIROSE EM HAMSTERS (*MESOCRICETUS AURATUS*)

JÉSSICA DIAS SOUZA¹; ANDRÉ ALEX GRASSMANN²; NEIDA LUCIA CONRAD²;
MARCELLE MOURA SILVEIRA²; SAMUEL RODRIGUES FÉLIX³; ALAN JOHN
ALEXANDER MCBRIDE⁴

¹Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, CDTec, Universidade Federal de Pelotas - jessi.dias@yahoo.com.br

²Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – grassmann.aa@gmail.com; neidaconrad@yahoo.com.br; marcellemsilveira@gmail.com

³ClinPet, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – samuelf@gmail.com

⁴Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – alan.mcbride@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose negligenciada, possui distribuição mundial e é um problema de saúde pública, com impacto também na produção animal. Esta doença é causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Atualmente é estimado que ocorram cerca de 873 mil casos graves e 49 mil mortes anuais em todo o mundo (PICARDEAU et al., 2014).

A abordagem mais eficiente para o controle e prevenção da leptospirose é o uso de vacinas. As vacinas atualmente disponíveis são bacterinas, compostas por um ou mais sorovares endêmicos de determinado local e estão disponíveis para cães, suínos, bovinos e para humanos em alguns poucos países (VERMA et al., 2013). Esta estratégia vacinal apresenta uma série de problemas, principalmente reações adversas e imunidade de curta duração restrita aos sorovares inclusos na vacina (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Desta forma, o desenvolvimento de uma vacina eficiente contra leptospirose, com imunoproteção cruzada contra diferentes sorovares, permanece um desafio, e por isso, os esforços para o desenvolvimento de vacinas recombinantes.

Os modelos murinos são os principais reservatórios das leptospirosas, albergando-as nos rins e disseminando-as através da urina. Porém estes modelos não apresentam sinais clínicos da doença, o que os torna incompatíveis com estudos onde é necessária a observação das consequências da infecção por leptospirosas virulentas (DELLAGOSTIN et al., 2011). O hamster sírio capa-dourada (*Mesocricetus auratus*) apresenta sinais de infecção, o que o torna o modelo animal ideal para estudo de vacinas contra leptospirose, bem como para compreender os aspectos imunológicos e patológicos da doença (HAAKE, 2006).

Desde os trabalhos iniciais na investigação do estabelecimento da leptospirose, seja para o desenvolvimento de vacinas ou entendimento da doença, a infecção experimental dos modelos animais é feita por injeção intraperitoneal (IP) das leptospirosas virulentas, que a partir daí estabelecem a infecção (DELLAGOSTIN et al., 2011). Esta via clássica, a única estabelecida para este tipo de estudo, não reproduz a entrada natural das bactérias no hospedeiro, que ocorre principalmente através da pele (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Dessa forma, proteínas leptospirais importantes para a entrada das bactérias no hospedeiro e com potencial para uso como alvo para uma vacina contra leptospirose, podem estar sendo subaproveitadas.

Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um modelo de desafio transcutâneo que simule fielmente a infecção natural por leptospiras e compara-lo com outras vias de infecção.

2. METODOLOGIA

2.1 Ensaio de desafio

Neste estudo foram utilizados 16 hamsters machos, com nove semanas de idade. Os animais foram divididos em 4 grupos contendo 4 animais em cada para testar as possíveis vias de infecção:

- a) Raspagem cutânea: a raspagem cutânea foi realizada utilizando uma lâmina de bisturi. Uma das pernas posteriores foi raspada na face interna levemente até que a coloração da pele ficasse rosada/avermelhada (sem ocorrer sangramento).
- b) Com lesão: os animais tiveram o plantar das patas perfuradas superficialmente (sem ocorrer sangramento) com uma agulha de insulina.
- c) Sem lesão: este grupo apenas ficou exposto às bactérias.
- d) Permeabilização em água: os hamsters ficaram com as patas submersas em água à 27°C por 10 minutos, antes do desafio.

O desafio foi realizado com *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. Os hamsters ficaram expostos a 10^8 leptospiras/ml em solução de PBS mantida à 27°C em quantidade suficiente para cobrir as patas dos animais por 5 min. Como controle, um grupo de animais (2 fêmeas) foi desafiado pela via clássica, ou seja, IP, com 10^4 leptospiras/ml. Após o desafio, os animais foram monitorados e pesados diariamente por 28 dias.

2.2 Imprint

Imediatamente após o óbito dos animais realizou-se a remoção de rins, fígado e pulmão para o ensaio de *imprint*. Os animais que sobreviveram até o fim do experimento foram eutanasiados e também tiveram os órgãos coletados. O *imprint* foi realizado em lâminas de vidro para microscopia, preparadas previamente com poli-L-lisina. Os cortes dos tecidos foram pressionados diretamente nas lâminas. Estas secaram à temperatura ambiente e foram fixadas com acetona por três minutos. Posteriormente, as lâminas com as amostras foram hidratadas com PBS e bloqueadas com BSA. Após período de incubação e lavagem adicionou-se as lâminas anticorpos anti-*Leptospira*, e por fim, os anticorpos anti-coelho conjugados ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Entre cada etapa as lâminas foram incubadas por 1 h a 37°C e lavadas 4 vezes com solução de PBS. Ao final, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desafio pela via de raspagem cutânea foi eficaz, levando ao óbito 75,0% dos animais do grupo. A infecção com a exposição da pele lesionada às bactérias levou a óbito apenas 50,0% dos animais. O desafio realizado após a permeabilização em água morna foi menos eficiente que as anteriores, levando a óbito 25,0% dos animais. No grupo de animais sem lesão não houve óbito. No grupo controle, desafiado pela via IP, todos os animais vieram a óbito (Figura 1).

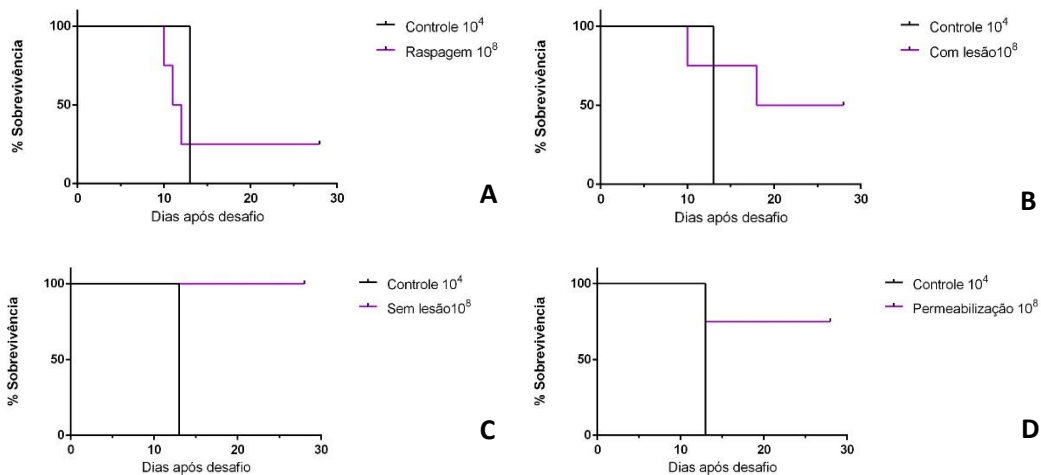


Figura 1. Percentual de óbitos por leptospirose em relação ao tempo de sobrevivência (em dias), para diferentes vias de infecção: IP (A, B, C, D), raspagem cutânea (A), com lesão (B), sem lesão (C) e permeabilização em água (D).

A partir destes resultados pode-se observar que uma via natural de infecção pode levar ao óbito e a via mais eficaz entre as testadas foi por raspagem cutânea. No trabalho de MACEDO et al. (2004) a via natural mais eficiente encontrada foi também foi por escarificação cutânea, o que reforça que o uso desta via é viável para desafio transcutâneo.

Através da pesagem diária dos animais após o desafio, foi possível observar a perda de peso dos animais que posteriormente vieram a óbito. A perda de peso pode ser um ponto de desfecho, para a eutanásia do animal de acordo com COUTINHO et al. (2011), visando minimizar seu sofrimento. Foram observados sinais clínicos nos animais que vieram ao óbito, como perda de peso, apatia, movimentos involuntários, icterícia e hemorragia.

No desafio pela via transcutânea os animais foram expostos a uma solução contendo 10^8 leptospiras/ml, enquanto que no grupo controle via IP foi utilizada uma concentração de 10^4 leptospiras/ml. Essa alta concentração de leptospiras foi estabelecida, pois na via transcutânea as bactérias precisam atravessar todas as barreiras do organismo do hospedeiro até atingir o órgão de eleição, não havendo um controle de quantas leptospiras conseguiram infectar o animal. Enquanto que, na via intraperitoneal, mais invasiva e que não simula a via natural de infecção, a dose inoculada pode ser bem menor, já que as bactérias são depositadas diretamente no interior do hospedeiro.

O *imprint* foi realizado para avaliar a presença de leptospiras nos tecidos, conforme descrito previamente. A partir desta técnica pode-se comprovar a presença das bactérias nos órgãos analisados, confirmando que em todas as vias utilizadas as bactérias atingiram estes órgãos. Destaca-se que o rim e o pulmão tiveram uma frequência maior, de 61,1%, enquanto que no fígado, de 33,3% no total de amostras analisadas.

Tabela 1. Frequência de animais com leptospiras presentes nos órgãos: rim, fígado e pulmão de acordo com os diferentes tipos desafio.

Grupo	<i>Imprint</i>			
	Dias para óbito	Tecido		
		Rim	Fígado	Pulmão
Com Lesão	10,17,28	3/4	3/4	3/4
Sem Lesão	28	2/4	1/4	2/4
Raspagem Cutânea	10,11,12,28	2/4	2/4	2/4
Permeabilização em Água	13,28	2/4	0/4	2/4
Intraperitoneal	13	2/2	0/2	2/2

4. CONCLUSÕES

As vias de desafio transcutâneo são viáveis para experimentos de estudos com leptospirose e simulam a infecção natural, o que poderá contribuir para um melhor entendimento da doença e para o desenvolvimento de vacinas contra leptospirose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B. e DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet Microbiol**, v.140, n.3-4, p. 287-96. 2010.
- COUTINHO, M. L.; CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; MATSUNAGA, J.; BABBITT, J. T.; LEWIS, M. S.; ALEIXO, J. A. e HAAKE, D. A. A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. **PLoS Negl Trop Dis**, v.5, n.12, p. e1422. 2011.
- DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FELIX, S. R.; DA SILVA, E. F. e MCBRIDE, A. J. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Hum Vaccin**, v.7, n.11, p. 1215-24. 2011.
- HAAKE, D. A. Hamster model of leptospirosis. **Curr Protoc Microbiol**, v.Chapter 12, p. Unit 12E 2. 2006.
- MACEDO, N. A. D.; MORAIS, Z. M. D.; CAMARGO, C. R. D. A.; ALVES, C. J.; AZEVEDO, S. S. D.; NÜMBERGER JÚNIOR, R. e VASCONCELLOS, S. A. Influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e a evolução da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar pomona. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p. 194-200. 2004.
- PICARDEAU, M.; BERTHERAT, E.; JANCLOES, M.; SKOULLOUDIS, A. N.; DURSKI, K. e HARTSKEERL, R. A. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.78, n.1, p. 1-8. 2014.
- VERMA, R.; KHANNA, P. e CHAWLA, S. Whole-cell inactivated leptospirosis vaccine: future prospects. **Hum Vaccin Immunother**, v.9, n.4, p. 763-5. 2013.