

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas



Trabalho de Conclusão de Curso

**Estabelecimento de metodologia alternativa para a indução de leptospirose
experimental em modelo animal simulando a infecção natural**

Jéssica Dias Souza

Pelotas, 2014

Jéssica Dias Souza

Estabelecimento de metodologia alternativa para a indução de leptospirose experimental em modelo animal simulando a infecção natural

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

Orientador: Prof Alan John Alexander McBride, PhD
Coorientador: Msc. Neida Lucia Conrad

Pelotas, 2014

S729e Souza, Jéssica Dias

Estabelecimento de metodologia alternativa para a indução de leptospirose experimental em modelo animal simulando a infecção natural / Jéssica Dias Souza. – 41f. il. – Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2014. – Orientador Alan John Alexander McBride ; coorientadora Neida Lucia Conrad.

1.Biologia. 2.*Leptospira interrogans*. 3. Hamster sírio capa dourada. 4.Via de infecção. 5.Via transcutânea 6.Vacina.
I.McBride, Alan John Alexander. II.Conrad, Neida Lucia. III.Título.

CDD:614.56

Agradecimentos

Aos meus pais, Jaqueline e Célio pelo apoio e incentivo dedicados a mim durante minha formação acadêmica.

À minha avó, Silda por dividir comigo não só os momentos de conquistas, mas também as dificuldades durante a vida acadêmica.

Aos colegas e amigos, Najara, William, Matheus e Liliane por compartilhar os melhores momentos da graduação.

Ao meu orientador e amigo, professor Alan por todas as oportunidades dadas, paciência, ensinamentos e pela dedicação para fazer da minha formação um caminho de grande aprendizado.

Aos pós-graduandos André, Neida, Marcelle e ao Dr. Samuel por todo o conhecimento passado, pelos momentos divertidos durante as rotinas no laboratório, sendo companheiros de experimento do TCC, os quais se dedicaram ao máximo tanto para fazermos um trabalho de qualidade quanto para tornar o dia a dia mais divertido.

Aos colegas de laboratório Liana, Maurício, Júlia e Carol pela amizade, apoio, colaboração e convivência agradável.

Aos professores do curso de graduação em Ciências Biológicas pelos ensinamentos.
A todos que colaboraram de alguma forma, muito obrigada!

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”

(Marcel Proust)

Jéssica Dias Souza

Estabelecimento de metodologia alternativa para a indução de leptospirose experimental em modelo animal simulando a infecção natural

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 17 de novembro de 2014

Banca examinadora:

Prof. PhD. Alan John Alexander McBride (Orientador)

PhD em Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada pelo Institute of Science and Technology

Prof. Dra. Daiane Drawanz Hartwig

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Anelize de Oliveira Campello Félix

Doutora Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Resumo

SOUZA, Jéssica Dias. **Estabelecimento de metodologia alternativa para a indução de leptospirose experimental em modelo animal simulando a infecção natural.** 2014. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014

A leptospirose é uma zoonose negligenciada, de distribuição mundial, e um importante problema de saúde pública, com impacto também na produção animal. Esta doença é causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Os principais reservatórios das leptospirosas são roedores que albergam estas bactérias nos rins, sem desenvolver a doença, liberando-as no ambiente através da urina. A infecção é estabelecida pela entrada de leptospirosas por arranhões ou feridas na pele do hospedeiro e a subsequente disseminação no organismo. A vacina atual contra a doença é composta pela célula inteira morta (bacterina), uma estratégia que apresenta uma série de problemas, tornando-se necessário o desenvolvimento de uma vacina com amplo espectro e com efeitos colaterais reduzidos. O hamster sírio capa-dourada (*Mesocricetus auratus*) é o modelo animal mais utilizado para estudos de leptospirose, bem como para estudar os aspectos imunológicos e patológicos da doença. Desde os trabalhos de vanguarda na investigação do estabelecimento da leptospirose, o ensaio em modelos animais é feito por injeção intraperitoneal, única via estabelecida para este tipo de estudo, o que não caracteriza a entrada natural das bactérias no hospedeiro. Dessa forma, proteínas de leptospirosas, importantes para a entrada de bactérias no hospedeiro, e início da interação com estruturas extracelulares do hospedeiro, podem estar sendo subaproveitadas em testes vacinais. Com isso, o objetivo deste trabalho foi estabelecer uma via de infecção alternativa para leptospirose letal em hamsters que simule a infecção natural. Foram realizados quatro experimentos: primeiro para determinar se uma via transcutânea (TC) é eficaz, segundo com diferentes abordagens da entrada de leptospirosas pela via TC, terceiro para determinar a dose letal 50% (DL50) via intraperitoneal (IP) e quarto para determinar a DL50 via transcutânea. A carga renal de leptospirosas foi avaliada por imunofluorescência após *imprint* de órgãos e reisolamento do agente por cultura de rim. Neste trabalho demonstramos que a via de infecção TC é efetiva, e apresenta uma DL50 de $1,7 \times 10^7$ e $3,16 \times 10^7$ leptospirosas/ml para infecção para fêmeas e machos, respectivamente. Também demonstramos que uma leve raspagem de uma das patas posteriores parece contribuir para infecção.

Palavras-chave: *Leptospira interrogans*; hamster sírio capa dourada; via de infecção; via transcutânea; vacinas.

Abstract

SOUZA, Jéssica Dias. Establishment of an alternative method for induction of experimental leptospirosis an animal model simulating natural infection. 2014. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014

Leptospirosis is a neglected zoonosis with worldwide distribution, an important public health problem, and has an impact on animal production. This disease is caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*. The main reservoirs are rodents that harbour these bacteria in their kidneys, usually without developing the disease, releasing them into the environment via urine. The infection is established after the entry of leptospires through scratches or small wounds in the skin of the host and the subsequent spread throughout the body. The current vaccine against the disease is a bacterin (whole-cell killed leptospires) that show a number of problems, making it necessary to develop a broad-spectrum vaccine with fewer side effects. The golden Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) is the most widely used animal model for leptospirosis studies, including the studies of the immunological and pathological aspects of the disease. Since the first work investigating the establishment of leptospirosis, the tests in animal models was carried out by intraperitoneal injection, the only via established for this type of study, which does not characterize the natural entry route of the bacteria into the host. Thus, important leptospiral proteins, involved in the entry of the bacteria into the host, and interaction with host extracellular structures may be poorly evaluated in vaccine trials. The objective of this project was establish an alternative infection route for lethal leptospirosis in hamsters, and one that accurately simulates natural infection. Four different experiments were performed: the first one determined whether or not the transcutaneous (TC) infection was efficient; the second one tested different approaches to leptospires entry via TC infection, the third and fourth experiments focused in determine a lethal dose to 50% of the hamsters by transcutaneous or intraperitoneal routes, respectively. The leptospiral burden in the kidneys was also evaluated by immunofluorescence after the imprint of organs and the *in vitro* culture of kidney macerate. In this work, we showed that TC route for infection with leptospires is effective, with a LD50 of 1.7×10^7 and 3.16×10^7 leptospires/mL of solution used to exposed female and male hamsters, respectively. We also showed that a slightly scrape in one of the hamster's legs seems to increase the infection rate.

Keywords: *Leptospira interrogans*; golden syrian hamster; route of infection; transcutaneous; vaccines.

Lista de Figuras

Figura 1	Sobrevivência dos animais via perfuração e sem lesão provocada	24
Figura 2	Peso dos animais via perfuração e sem lesão provocada	25
Figura 3	Sobrevivência dos animais com diferentes vias de inoculação	26
Figura 4	Peso dos animais com diferentes vias de inoculação	27
Figura 5	Sobrevivência dos animais via intraperitoneal	29
Figura 6	Peso dos animais via intraperitoneal	30
Figura 7	Sobrevivência dos animais via transcutânea	31
Figura 8	Peso dos animais via transcutânea em machos	31
Figura 9	Peso dos animais via transcutânea em fêmeas	32

Lista de Tabelas

Tabela 1	Resultados da análise de <i>imprint</i> piloto 2 :individual	28
Tabela 2	Resultados do reisolamento de leptospiras	32

Sumário

1. Introdução	11
1.1 Objetivo geral	13
1.2 Objetivos específicos	13
2 Revisão de Literatura	14
2.1 Agente etiológico	14
2.2 Leptospirose	15
2.3 Transmissão	16
2.4 Reservatórios e modelos animais	17
2.5 Vacinas para leptospirose	18
3 Materiais e métodos	19
3.1 Cultivo <i>in vitro</i> de leptospiras	19
3.2 Animais e coleta de amostras	19
3.3 Determinação dos experimentos: execução de pilotos	20
3.4 Determinação da dose letal 50% (DL50) na infecção intraperitoneal (IP) ...	21
3.5 Determinação da dose letal 50% (DL50) na infecção transcutânea (TC)	21
3.6 Avaliação da presença de leptospiras nos órgãos de hamsters infectados	22
4 Resultados	24
4.1 Experimento Piloto 1	24
4.2 Experimento Piloto 2	26
4.3 Determinação da dose letal 50% (DL50) de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni em hamsters infectados pela via intraperitoneal	28
4.4 Determinação da dose letal 50% (DL50) de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni em hamsters infectados pela via transcutânea	30
5 Discussão	33
6 Conclusão	37
Referências	40

1 Introdução

A leptospirose é uma zoonose negligenciada de distribuição mundial e um importante problema de saúde pública, com impacto também na produção animal. Esta doença é causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, que tem como principais reservatórios roedores que hospedam estas bactérias nos rins, sem desenvolver a doença, liberando-as no ambiente por meio da urina. A infecção é estabelecida principalmente pela entrada de leptospiros através de pequenos cortes ou abrasões na pele do hospedeiro e a subsequente disseminação no organismo (FAINE et al., 1999).

A abordagem mais eficiente para o controle da leptospirose é o uso de vacinas (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Na vacina atual, é utilizada a célula das leptospiros inativadas, sendo utilizados sorovares endêmicos de determinado local, e está disponível globalmente para cães, suínos, bovinos e para humanos em alguns poucos países como Japão, Cuba, França e China (DELLAGOSTIN et al., 2011). Esta estratégia vacinal apresenta uma série de problemas, principalmente reações adversas, imunidade de curta duração e restrita aos sorovares incluídos na vacina (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Existem cerca de 300 sorovares de *Leptospira*, resultando numa ineficiência amplificada da vacina, bem como exige acompanhamento epidemiológico constante (MCBRIDE et al., 2005). Uma vacina de amplo espectro contra leptospirose, de proteção duradoura e com efeitos colaterais reduzidos é uma necessidade evidente para o controle desta doença.

O hamster sírio capa-dourada (*Mesocricetus auratus*) é o modelo animal mais utilizado para estudo de vacinas contra leptospirose, bem como para estudar os aspectos imunológicos e patológicos da doença (HAAKE, 2006). Roedores como camundongos e ratos são modelos animais de experimentação mais comuns, porém, são também os reservatórios de leptospiros, não desenvolvendo a doença (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Desta forma, ratos e camundongos são incompatíveis com estudos onde é necessária a observação das complicações que ocorrem em hospedeiros suscetíveis causadas pela infecção por leptospiros virulentas.

Diversos estudos recentes, objetivando produzir uma vacina contra leptospirose, fizeram uso da vacinologia de nova geração, focando em proteínas expostas na superfície das leptospirosas como alvos vacinais, principalmente como vacinas recombinantes de subunidade e de DNA (DELLAGOSTIN et al., 2011). Na grande maioria destes experimentos a proteção observada foi apenas parcial, apesar de alguns alvos serem sem dúvida, promissores. É o caso da lipoproteína de 32 kDa (LipL32) (GRASSMANN et al., 2012; SEIXAS et al., 2007) e das proteínas *Immunoglobulin-like* (Lig) (SILVA et al., 2007). Tanto LipL32 quanto LigA e LigB foram investigadas como alvos vacinais, porém a proteção observada era parcial ou apresenta incoerência na reprodução de resultados. As proteínas Ligs são alvos mais promissores para o desenvolvimento de vacinas contra leptospirose, pois são expostas na superfície, expressas em todos os sorovares patogênicos (exceto LigA, restrito à algumas espécies), e apresentam funções importantes relacionadas principalmente a adesão na matriz extracelular, um importante passo no estabelecimento da infecção (DELLAGOSTIN et al., 2011).

Desde os trabalhos de vanguarda na investigação do estabelecimento da leptospirose, seja para o desenvolvimento de vacinas ou entendimento da doença, o desafio dos modelos animais é feito por injeção IP de leptospirosas virulentas, que a partir de então estabelecem a infecção (DELLAGOSTIN et al., 2011). Esta via clássica, não reproduz a entrada natural das bactérias no hospedeiro (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Desta forma, proteínas leptospirais importantes nesta etapa inicial da infecção, especialmente o início da interação com estruturas extracelulares do hospedeiro, podem estar sendo subaproveitadas em testes vacinais. Uma via natural, TC de infecção poderia evidenciar que candidatos a vacinas já testadas, e com baixa eficácia, pela via intraperitoneal, sejam na verdade capazes de induzir uma resposta imune protetora. Essas proteínas subaproveitadas envolvidas na entrada no hospedeiro e estabelecimento da infecção, podem abrir caminho para o estudo da eficiência de preparações vacinais contra leptospirose.

1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi estabelecer um modelo de infecção transcutânea (TC) para leptospirose letal em hamsters e que simule a infecção natural.

1.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer e padronizar o modelo de infecção TC por *L. interrogans*;
- Infectar hamsters pela via TC utilizando animais com exposição por lesão induzida ou com a pele íntegra, para determinar a metodologia mais eficiente para induzir a doença;
- Determinar a dose letal 50% (DL50) em hamsters machos e fêmeas para *L. interrogans*, pelas vias IP e TC;
- Acompanhar indicadores clínicos de leptospirose nos hamsters infectados para validar a perda de peso como um *end point* para eutanásia.

2 Revisão de Literatura

2.1 Agente etiológico

As leptospiros são bactérias espiraladas, flexíveis e móveis, pertencentes à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e gênero *Leptospira*. Apresentam de 6 a 20 µm de comprimento e 0,1 µm de diâmetro, com uma ou ambas extremidades em forma de gancho ou retas. Não são facilmente visualizadas por luz direta, mas sim por microscopia de campo escuro, e também não são coradas facilmente. Há dois flagelos subterminais, ancorados um em cada extremidade. São aeróbicas e utilizam sais de amônio, como fonte de nitrogênio e ácidos graxos insaturados, como fonte de carbono e purinas. Apresentam um crescimento ideal 6 a 14 dias em meio de cultivo com pH 7,2-7,6 e temperatura 18-30°C. (FAINE et al., 1999). Sua aparência e motilidade também podem variar com a natureza do meio em que elas são cultivadas (BARTHI et al., 2003).

Tradicionalmente, o sorotipo é o identificador sorológico de base, e caracteriza-se por cerca de 300 sorovares antigenicamente diferentes. Análises moleculares identificaram 21 espécies de *Leptospira*, com dez principais espécies patogênicas (*L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. kirschneri*, *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. kmetyi* e *L. mayottensis*), cinco espécies com patogenicidade intermediária e seis saprófitas (BOURHY et al., 2014; VARNI et al., 2013).

Os estudos de biologia básica e da patogênese de *Leptospira* spp. avançaram com o sequenciamento do genoma de três espécies patogênicas (*L. interrogans* sorovares Lai e Copenhageni, *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo e *L. santarosai* sorovar Varillal) e de uma espécie saprófita (*L. biflexa* sorovar Patoc) (BULACH et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2004; PICARDEAU et al., 2008; REN et al., 2003). O genoma de *L. interrogans* consiste em dois cromossomos circulares, um com 4,3 Mb e outro com 350 Kb. *L. biflexa* apresenta, ainda, um terceiro replicon de 74 Kb. O core do genoma leptospiral, identificando através de análise comparativa entre os genomas de *L. interrogans* e *L. biflexa*, apresenta um total de 2052 genes (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; PICARDEAU et al., 2008).

Entre os genes únicos de espécies patogênicas, a grande maioria é de função desconhecida, sugerindo a existência de mecanismos de patogenicidade únicos nestas espécies (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Além destes genomas publicados, há ainda disponibilidade de sequências de centenas de genomas de diferentes espécies disponíveis no GenBank (NCBI), que ainda aguardam anotação.

2.2 Leptospirose

A leptospirose é a doença causada pelas bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. Caracteriza-se por ser uma doença febril aguda que ocorre tanto em humanos como em animais (FAINE et al., 1999; VIEIRA et al., 2013). É uma zoonose endêmica em muitos países e negligenciada por falta de comunicação e conscientização sobre a doença e, especialmente, devido ao diagnóstico relativamente inacessível e demorado. A ausência de ferramentas de diagnóstico adequadas e estratégias de prevenção e controle agravam o problema (LEVETT et al., 2001; MCBRIDE et al., 2005; VARNI et al., 2013; WHO, 2011). Atualmente é estimado que ocorram cerca de 873 mil casos graves e 49 mil mortes anuais em todo o mundo (PICARDEAU et al., 2014).

Esta doença apresenta uma distribuição geográfica cosmopolita, no entanto, sua ocorrência é maior em países de clima tropical e subtropical, principalmente nos períodos de altos níveis pluviométricos. Isso se deve à elevada sobrevivência da bactéria em ambientes úmidos, o que aumenta o risco de exposição e infecção de animais susceptíveis e de seres humanos (BRATHI et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2010).

As leptospirosas patogênicas se disseminam rapidamente no hospedeiro, causando infecção sistêmica após a penetração na pele (VIEIRA et al., 2013). O desenvolvimento da doença em humanos, considerando um hospedeiro acidental, pode variar em relação à gravidade de acordo com o sorovar infectante, idade, saúde e nutrição do paciente. Os sintomas podem ser semelhantes aos de uma gripe leve, ou mais graves, com insuficiência, comprometimento e perda da função renal (doença de Weil), insuficiência hepática, miocardite, hemorragias e até a morte, que é mais comum quando a doença evolui para a sua forma mais grave, com hemorragias severas pulmonares (Síndrome Hemorrágica Pulmonar relacionada à Leptospirose) (FAINE et al., 1999; GOUVEIA et al., 2008; MCBRIDE et al., 2005).

A leptospirose causa impacto negativo na agropecuária, com redução da produtividade por meio de aborto e natimortos, perda de produção de leite ou declínio no crescimento (FAINE et al., 1999; SRINIVAS et al., 2013). A leptospirose é considerada uma doença ocupacional em países desenvolvidos, relacionada com trabalhos de produção animal como, produção de laticínios, suínos, trabalhos em frigoríficos, à veterinária, entre outros (FAINE et al., 1999).

Na última década, a leptospirose tem provado ser uma doença endêmica em países tropicais, com potencial epidêmico. Há notificações de surtos recentes na Guiana, Índia, Quênia, Laos, República Democrática, Nova Caledônia, Nicarágua, Filipinas e Tailândia. Estes surtos normalmente estão relacionados com eventos climáticos extremos (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; WHO, 2011).

2.3 Transmissão

As leptospirosas colonizam os túbulos contorcidos proximais dos rins de seus hospedeiros, e a partir deles são excretadas por meio da urina. Esta bactéria necessita de um ambiente úmido para sobreviver, portanto, normalmente a transmissão está relacionada com o contato indireto, através de solo, lama, águas subterrâneas, córregos, rios e esgotos a céu aberto contaminados com a urina de animais infectados. A infecção pode ocorrer ainda de forma direta, por meio do contato com tecidos e secreções de animais infectados (FAINE et al., 1999).

O clima pode afetar a transmissão das doenças infecciosas. Mudanças de temperatura, umidade, precipitação e um aumento do nível do mar, em combinação com fatores antrópicos como a densidade populacional, local de moradia, tipo de água, saneamento e gestão de resíduos, podem alterar a dinâmica de transmissão da doença (WHO, 2011). A incidência de infecção humana é maior nos trópicos do que em regiões temperadas, mas a transmissão ocorre em ambos os países industrializados e em desenvolvimento (BARTHI et al., 2003).

2.4 Reservatórios e modelos animais

Na leptospirose, os portadores podem ser animais selvagens ou domésticos, especialmente roedores e pequenos marsupiais, bovinos, suínos e caninos. Quase todos os mamíferos (incluindo os aquáticos) e marsupiais foram relatados como portadores de leptospirosas. Os humanos quase nunca são portadores crônicos, sofrem infecções agudas, e às vezes adquirem sequelas a longo prazo, sendo definidos como hospedeiros acidentais (FAINE et al., 1999). Humanos contraem as leptospirosas através de abrasões na pele, membranas mucosas e com contato da urina de animais infectados (SRINIVAS et al., 2013).

O uso de animais em experimentação é indispensável em estudos de leptospirose, onde é necessário observar a patogênese e transmissão da doença, desenvolver vacinas e compreender a colonização destas bactérias no hospedeiro. Camundongos podem ser utilizados para estudos da resposta imune mediada por vacinação, porém como são animais resistentes à infecção é necessário utilizar altas doses do inóculo para induzir a doença, o que não ocorre naturalmente (KO et al., 2009). Os ratos são utilizados como modelo para estudar a colonização das leptospirosas nos órgãos, mas também exigem altas doses do inóculo (ATHANAZIO et al., 2008; NALLY et al., 2005). Dessa forma, hamsters e *guinea pigs* são modelos experimentais utilizados como padrão para leptospirose aguda (RANDALL; COOPER, 1944; FAINE et al., 1999). A infecção com baixas doses (menores que 100 leptospirosas) resulta em uma infecção aguda, semelhante à observada em humanos (SILVA et al., 2008).

A inoculação experimental IP em estudos de leptospirose é a rota padrão para desafiar os animais com leptospirosas patogênicas (HAAKE, 2006). Esta via de inoculação permite distribuir um volume reproduzível do inóculo, mas não demonstra a infecção natural deste patógeno. Há poucos estudos que utilizam vias que simulam a infecção natural, como vias subcutânea (SC) (TRUCCOLO et al., 2002), intradérmica (ID) (LOURDAULT et al., 2014) e da mucosa ocular (MO) (BOLIN et al., 2001).

2.5 Vacinas para leptospirose

Enquanto que as manifestações da doença variam entre cães, suínos e bovinos, a vacinação é a melhor medida preventiva para controlar a infecção e, conseqüentemente, a transmissão para os seres humanos (RUBY; SRINIVAS, 2013).

Devido à natureza zoonótica da leptospirose junto com seu impacto econômico na pecuária, o desenvolvimento de vacinas comerciais, visando os sorogrupos de importância nos Estados Unidos, foi de fundamental importância durante o século passado (SRNIVAS et al., 2013). As primeiras vacinas comercialmente disponíveis apresentavam como alvo um único sorogrupo, Pomona, em bovinos e suínos. Vacinas bivalentes para Canicola e Icterohaemorrhagiae tornaram-se disponíveis no início de 1960 para cães e mais tarde, na mesma década, para bovinos e suínos. Hoje a maioria das vacinas no mercado nos Estados Unidos são produtos polivalentes, que tem em sua composição pelo menos quatro sorogrupos. A avaliação de vacinas para *L. interrogans* sorovar Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola e Grippotyphosa é feito usando o método de ensaio de potência descrito em hamster (SRNIVAS et al., 2013).

3 Materiais e Métodos

3.1 Cultivo *in vitro* de leptospiras e preparo das diluições

Leptospira interrogans sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, foi crescida em meio EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) (Difco) enriquecido com 10% de suplemento comercial (Difco) à 29°C. Foram realizados repiques semanais, acompanhados de contagem de células em câmara de Petroff-Hausser. Todos os experimentos *in vivo* foram realizados com culturas com menos de 6 passagens *in vitro*.

As diluições para os experimentos de desafio foram feitas de forma serial em *Phosphate Buffered Saline* (PBS), partindo de uma cultura ajustada para 10⁹ leptospiras/ml. Para quantificação das bactérias, as mesmas foram suspendidas em 1 ml de PBS e contadas em câmara de Petroff-Hausser sob microscopia de campo escuro. Foram contadas as leptospiras em todos os 25 quadrados, em triplicata para cada amostra. O número de leptospiras foi definido multiplicando-se o número de leptospiras contadas pelo fator de diluição e por 50.000, de acordo com o padrão para esta câmara.

3.2 Animais e coleta de amostras

Hamsters fêmeas e machos (*Mesocricetus auratus*) foram utilizados como modelo animal para os experimentos de infecção por via natural. Para a manutenção dos parâmetros fisiológicos, todos os animais foram mantidos em microisoladores com as dimensões de 49x34x16 cm, e alojados em racks ventilados durante todos os experimentos. O fornecimento de água e ração foi *ad libitum*, e as trocas das caixas com as camas de maravalha realizadas duas vezes por semana.

Após eutanásia, rins, fígado e pulmão foram removidos assepticamente para realização do teste de *imprint* para avaliar a carga leptospiral nestes órgãos. Um dos rins de cada animal foi coletado assepticamente e utilizado para reisolamento de leptospiras, conforme descrito no item 3.7.

Todos os procedimentos com animais foram realizados conforme as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) visando o bem-estar animal. O projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA 3783).

3.3 Determinação dos experimentos: execução de testes pilotos

Foram realizados dois experimentos pilotos: um para verificar se os animais vêm ao óbito por via de infecção natural e outro para verificar qual a porta de entrada ao hospedeiro mais eficaz para as leptospiros.

No teste Piloto 1 foram utilizados 34 hamsters, machos, com nove semanas de idade, distribuídos em oito grupos (n=4) para testar quatro concentrações de leptospiros na infecção pela via TC, sendo quatro grupos sem nenhuma lesão cutânea provocada e quatro grupos com uma perfuração por agulha. Cada grupo (com lesão e sem lesão) foi exposto a uma das seguintes concentrações: 10^8 , 10^6 , 10^4 e 10^2 leptospiros/ml. Além deste, também houve um grupo (n=2) inoculado com a dose de 10^4 leptospiros pela via IP, como controle da virulência do cultivo utilizado na via TC. Nos grupos onde os animais sofreram perfuração, a lesão foi provocada utilizando uma agulha de insulina (0,45×13 mm) para perfurar o plantar de uma das patas traseiras (sem ocorrer sangramento) e o grupo sem lesão provocada ficou exposto às bactérias naturalmente. Ambos os grupos foram expostos às leptospiros, deixando o animal em contato com solução contendo a quantidade desejada desta espiroqueta em um pote plástico (aproximadamente 11×19×15 cm), com a tampa perfurada para permitir a correta ventilação. Foram adicionados 50 ml da solução PBS contendo leptospiros, quantidade suficiente para cobrir o fundo do pote. Em seguida quatro hamsters (um grupo por vez) foram mantidos dentro do pote, onde mantiveram pelo menos as patas traseiras em contato com a solução de leptospiros, durante cinco minutos.

No experimento Piloto 2, para verificar se uma lesão no hospedeiro facilita o processo de invasão por *Leptospira* através da via TC, foram utilizados 18 hamsters machos com nove semanas de idade. Da mesma forma que no experimento Piloto 1, 10^4 leptospiros/ml foram inoculadas via IP em dois hamsters fêmeas. Nas infecções TC, foi estabelecida a dose de 10^8 leptospiros/ml de solução no pote, de acordo com os resultados do Piloto 1. Foram utilizados quatro animais para cada tipo de lesão:

raspagem, perfuração, imersão em água e sem lesão. Para raspagem foi utilizada uma lâmina de bisturi na face interna de uma das pernas posteriores, esta foi raspada levemente até que a coloração da pele ficasse rosada/avermelhada (sem ocorrer sangramento, 10-12 passagens da lâmina de bisturi sobre a pata). No grupo de imersão em água, os hamsters ficaram com as patas submersas em água à 27 °C por 10 minutos, antes da infecção. Os grupos perfuração e sem lesão provocada seguiram a mesma metodologia do Piloto 1. Todos os grupos foram expostos à mesma metodologia do experimento Piloto 1.

Para ambos os experimentos piloto, durante o intervalo de tempo entre o surgimento dos sintomas e o óbito, todos os animais foram pesados diariamente, para acompanhamento pós-infecção. Os animais sobreviventes foram eutanasiados 28 dias após a infecção para a coleta de tecidos.

3.4 Determinação da dose letal 50% (DL50) com infecção intraperitoneal (IP)

Com base em estudos prévios, onde a DL50 em hamsters desafiados com L1-130 é de cerca de 50 leptospiras (SILVA, et al., 2008), foram testadas apenas cinco diluições: 10^5 a 10^1 leptospiras/ml. Quinze hamsters fêmeas com nove semanas de idade, foram distribuídos em cinco grupos, com três animais em cada e inoculados com diluições de 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 bactérias/ml de PBS. Os hamsters foram inoculados pela via IP com 1ml de cada uma das diluições de leptospiras.

Durante o intervalo de tempo entre o surgimento dos sintomas e o óbito, todos os animais foram pesados diariamente e monitorados para a avaliação clínica após a infecção. Os animais sobreviventes foram eutanasiados 28 dias após a inoculação para a coleta de tecidos. A DL50 deste experimento foi calculada a partir da fórmula de Reed e Muench (1938).

3.5 Determinação da dose letal 50% DL50 com infecção transcutânea (TC)

Baseado nos experimentos pilotos, foram estabelecidas cinco diluições de leptospiras para serem testadas. Quarenta hamsters com nove semanas de idade, sendo 20 machos e 20 fêmeas, foram distribuídos em cinco grupos, com quatro animais cada (do mesmo sexo) e expostos às diluições de 10^9 a 10^5 bactérias/ml. Antes do contato com as leptospiras, os hamsters foram submetidos às raspagens na

região interna de uma das pernas, até que a pele ficasse rosada/avermelhada sem que ocorresse sangramento. A metodologia para permitir a infecção TC foi otimizada para garantir que cada animal fosse exposto individualmente à mesma quantidade de leptospiras. Desta forma, o pote anteriormente utilizado, foi substituído por um béquer de 1 litro, onde foi adicionado 10 ml da solução PBS contendo leptospiras, sendo este um volume suficiente para cobrir o fundo do recipiente. Em seguida cada hamster foi mantido individualmente dentro do béquer, onde mantiveram pelo menos patas traseiras em contato com a solução de leptospiras, por um período de cinco minutos. Para evitar que o animal saísse ou escalasse o béquer, utilizamos tampas plásticas perfuradas para cobrir o recipiente.

Durante o intervalo de tempo entre o aparecimento dos sintomas e o óbito, todos os animais foram pesados diariamente e monitorados para acompanhamento do peso pós infecção. Animais sobreviventes foram eutanasiados 28 dias após o desafio para a coleta de tecidos. A DL50 foi calculada pela fórmula de Reed e Muench (1938).

3.6 Avaliação da presença de leptospiras nos órgãos de hamsters infectados

A presença de leptospiras nos rins de animais infectados no experimento para determinação da DL50 para a via TC de infecção foi realizada por meio de isolamento de leptospiras por cultivo do macerado de rim em meio EMJH. Brevemente, o rim foi removido assepticamente durante a necropsia e macerado em 4,5 ml de meio EMJH líquido. Após 1 hora de incubação para liberação das bactérias no meio, 0,5 ml deste cultivo foi passado para outros 4,5ml de meio EMJH líquido. Este cultivo foi mantido à 28 °C e observado semanalmente para verificar o crescimento bacteriano, por até 12 semanas.

O teste de *imprint* foi realizado para quantificar as leptospiras nos tecidos de animais infectados pela via transcutânea no experimento Piloto 2, conforme descrito previamente (CHAGAS-JUNIOR et al., 2009; CHAGAS-JUNIOR et al., 2012). Brevemente, cortes dos tecidos (rim, fígado, e pulmão) foram pressionados diretamente nas lâminas previamente cobertas com poli-L-lisina. As lâminas secaram em temperatura ambiente e o material foi fixado em metanol gelado por dez minutos. As lâminas foram, então, incubadas por uma hora com anticorpos anti-*Leptospira* produzidos em coelhos, lavadas e incubadas por uma hora com anticorpos anti-coelho

conjugados à FITC (Isotiocianato de fluoresceína). Após uma outra lavagem e secagem à temperatura ambiente, foi adicionado Hoeschst 33258 para marcar o DNA presente, seguido de uma nova lavagem e secagem. Foi adicionado glicerol 90%, e as lâminas foram fechadas com lamínulas e seladas. A análise das lâminas foi então realizada em microscópio de fluorescência, em aumento de 100x.

4 Resultados

4.1 Experimento Piloto 1

Quatro grupos de animais foram expostos a concentrações decrescentes de leptospiras em meio líquido (10^8 , 10^6 , 10^4 , 10^2 leptospiras/ml), após sofrerem uma pequena lesão ou sem lesão provocada. De um total de quatro hamsters expostos à uma concentração de 10^8 leptospiras/ml após sofrerem uma pequena lesão por perfuração com agulha, dois animais morreram, um em 12 dias após a infecção e outro aos 19 dias (Figura 1A). Apesar de não sofrer nenhuma lesão provocada, um animal foi ao óbito (de um total de 4 animais) após exposição à mesma concentração de leptospiras em meio líquido (Figura 1B).

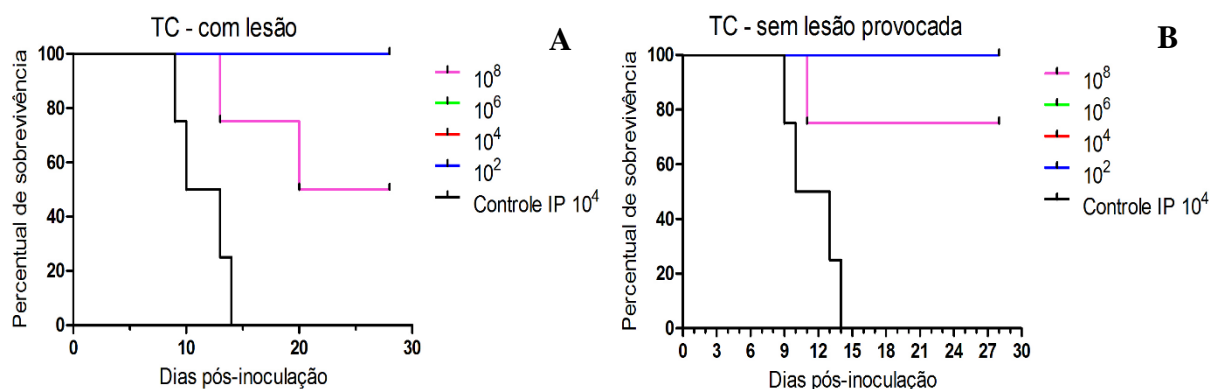


Figura 1 – Percentual de sobrevivência relacionado ao tempo de experimento (em dias), após a exposição às diferentes concentrações de leptospiras, sendo o grupo controle com 10^4 leptospiras inoculadas via intraperitoneal. Via transcutânea por perfuração (A) e via transcutânea sem lesão (B) com 10^8 , 10^6 , 10^4 e 10^2 leptospiras/ml de PBS.

Como pode ser observado na Figura 2, os três animais mortos por leptospirose perderam pelo menos 10% do peso em relação ao momento com maior peso observado (Figura 2A e 2E), enquanto os demais animais continuaram com ganho de peso até o final do experimento.

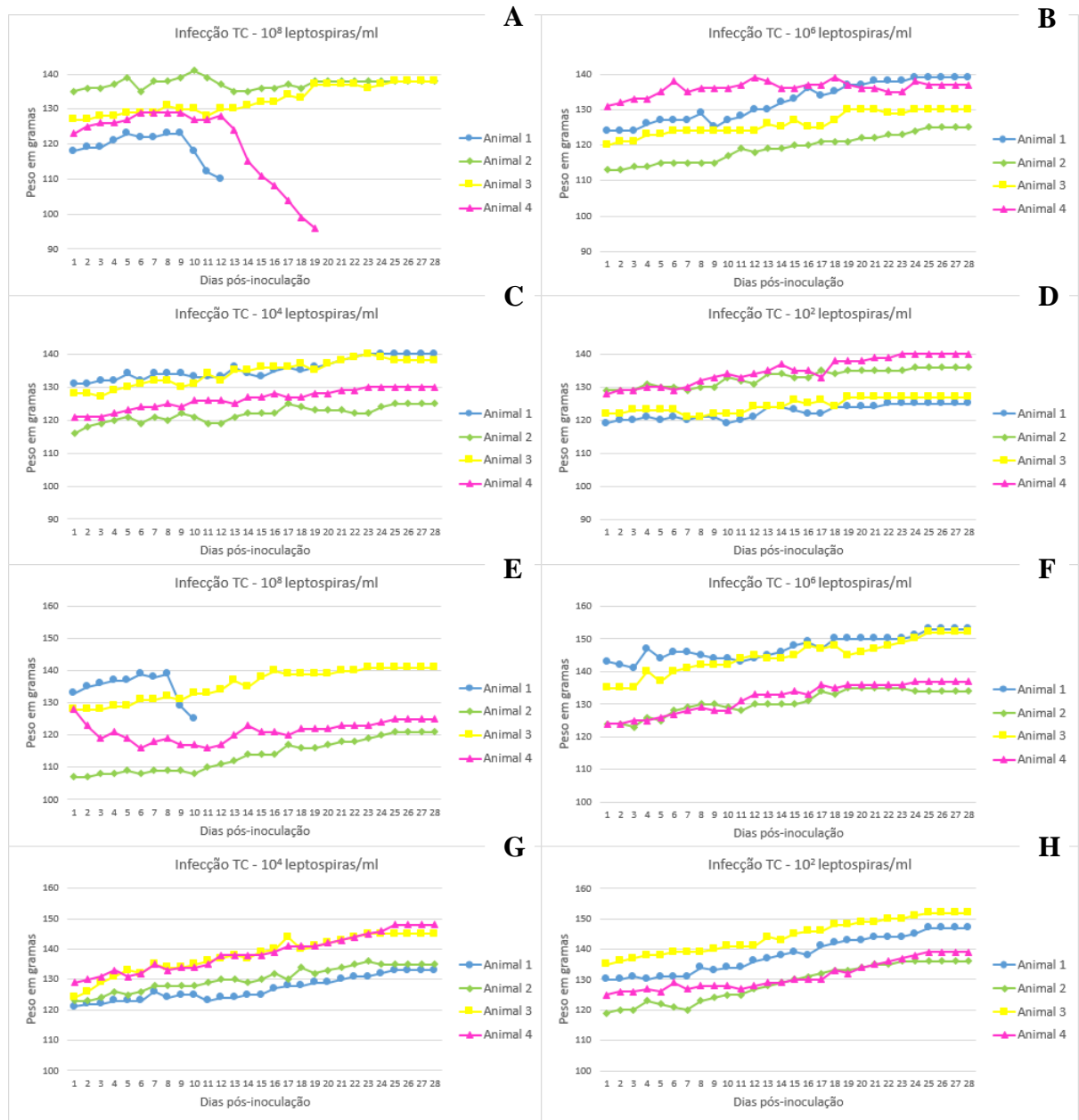


Figura 2 – Peso dos hamsters durante os 28 dias pós infecção com concentrações de 10^8 (A), 10^6 (B), 10^4 (C) e 10^2 (D) leptospiras/ml, do grupo com lesão por perfuração e em concentrações de 10^8 (E), 10^6 (F), 10^4 (G) e 10^2 (H) leptospiras/ml, referente ao do grupo sem lesão provocada durante 28 dias de experimentação.

4.2 Experimento Piloto 2

O segundo experimento piloto foi realizado para determinar qual a melhor estratégia para alterar a integridade cutânea do animal, facilitando a invasão pelas leptospiros. Foram testados além de um grupo sem lesão provocada, que desta vez não teve óbitos, três outros grupos: perfuração por agulha, raspagem com lâmina de bisturi e uma imersão prévia em água morna. Como pode ser observado na Figura 3, houve 75% de óbito nos animais cuja pata foi raspada imediatamente antes do contato com leptospiros virulentas em suspensão após 9, 10 e 11 dias de inoculação. Nos demais grupos, ocorreu 50% de óbito no grupo perfuração aos 10 e 18 dias pós exposição à leptospiros e apenas um óbito no grupo com imersão em água no dia 10 (Figura 3).

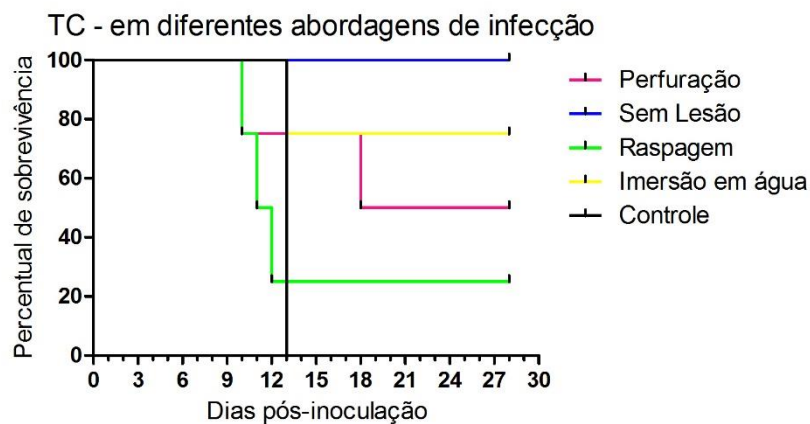


Figura 3 – Percentual de sobrevivência relacionado ao tempo de experimento (em dias), em diferentes vias de infecção: via intraperitoneal (10^4 leptospiros/ml) com dois animais por grupo e raspagem cutânea, perfuração, imersão em água e sem lesão (10^8 leptospiros/ml) com quatro animais por grupo.

Assim como no primeiro experimento piloto, todos os animais que vieram ao óbito por leptospirose perderam pelo menos 10% do peso em relação ao momento com seu maior peso. Os demais animais continuaram com ganho de peso ou o mantiveram até o final do experimento.

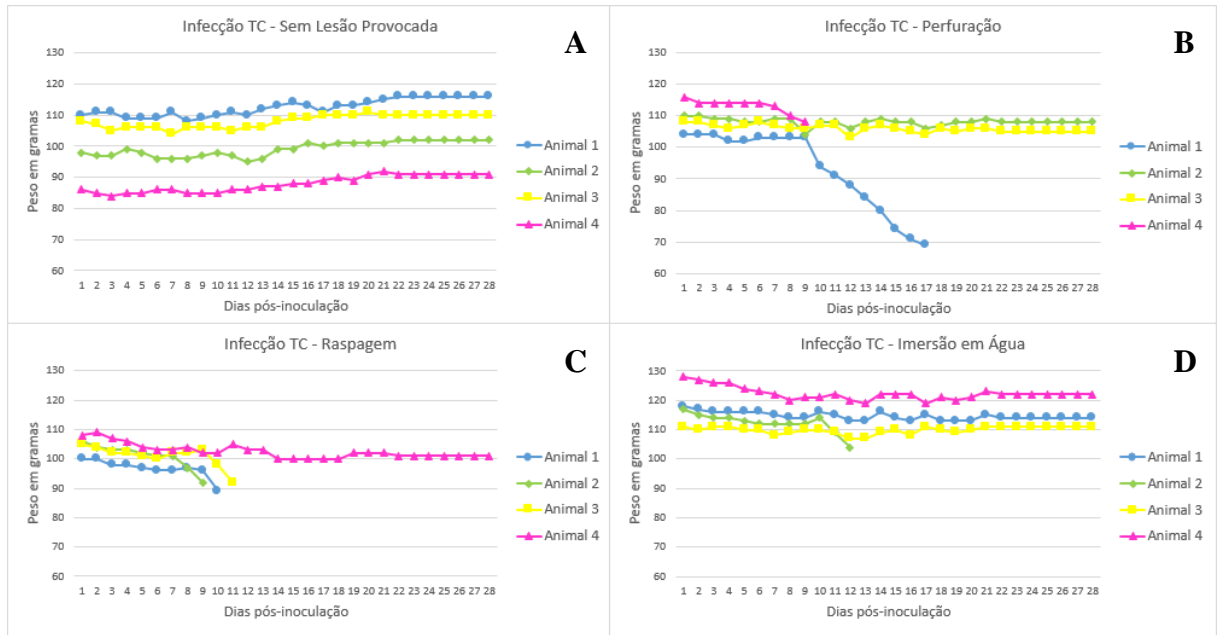


Figura 4 – Ganho de peso dos hamsters dos grupos com diferentes vias de inoculação: sem lesão provocada (A), perfuração (B), raspagem (C) e imersão em água (D), durante 28 dias de experimentação.

Todos estes animais foram avaliados quanto a presença de leptospiras nos rins, fígado e pulmão após a eutanásia ou morte, utilizando a técnica de imunofluorescência em *imprint* dos tecidos destes órgãos em lâminas de microscopia (Tabela 1). Em todos os grupos experimentais foram observadas leptospiras em pelo menos um dos órgãos dos animais, com exceção de um animal de cada grupo infectado pela via transcutânea. Os animais que não morreram em decorrência da leptospirose foram eutanasiados após 28 dias.

Tabela 1 – Análise da presença de leptospiras nos órgãos através de *imprint* para cada animal.

Grupo	Animal	Óbito	<i>Imprint</i>		
			Rim	Fígado	Pulmão
Perfuração	A1	17	+	+	+
	A2	28	-	-	-
	A3	28	+	+	+
	A4	10	+	+	+
Sem lesão	B1	28	-	+	-
	B2	28	+	-	+
	B3	28	+	-	+
	B4	28	-	-	-
Raspagem Cutânea	C1	11	+	+	+
	C2	10	+	-	+
	C3	12	-	+	-
	C4	28	-	-	-
Imersão em Água	D1	28	-	-	-
	D2	13	+	-	-
	D3	28	-	-	+
	D4	28	+	-	+
Intraperitoneal	E1	13	+	-	+
	E2	13	+	-	+

4.3 Determinação da dose letal 50% (DL50) de *L. interrogans* sorovar Copenhageni em hamsters infectados pela via intraperitoneal

Todos os animais infectados pela via intraperitoneal, com as doses de 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 leptospiras/ml vieram ao óbito entre o 8° e 13° dia pós-infecção (Figura 5).

A DL50 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 em hamsters machos com nove semanas de idade neste experimento é de 3 a 4 leptospiras (cálculo= 3,16).

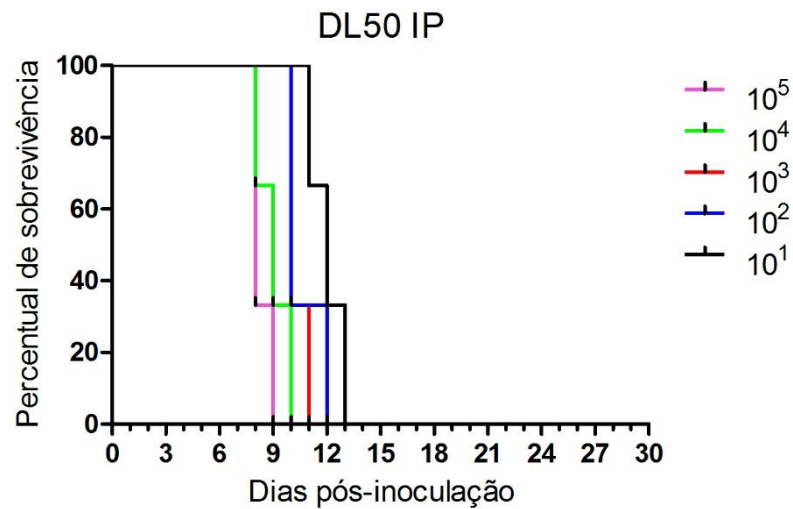


Figura 5 – Percentual de sobrevivência relacionado ao tempo de experimento (em dias), após a exposição às diferentes concentrações de leptospiras: 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 leptospiras/ml via IP em fêmeas.

Na Figura 6 podemos observar que, todos os animais vieram ao óbito por leptospirose perdendo pelo menos 10% do peso em relação ao momento com seu maior peso. Também podemos observar que os animais inoculados com as doses mais altas vieram ao óbito antes dos inoculados com doses menores.

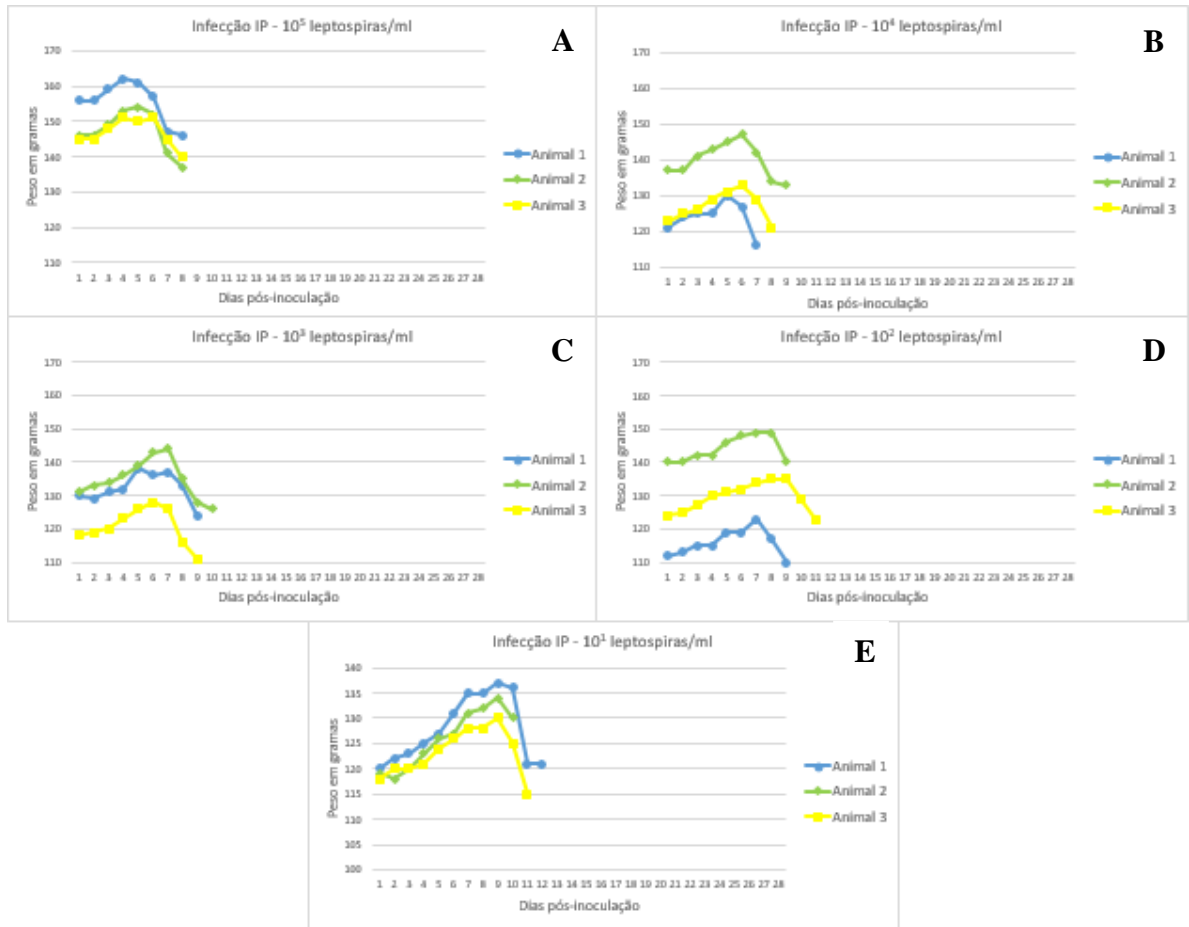


Figura 6 – Peso dos hamsters dos grupos IP com diferentes doses de inoculação: 10⁵ (A), 10⁴ (B), 10³ (C), 10² (D) e 10¹ (E) leptospiras/ml, durante 28 dias de experimentação.

4.4 Determinação da dose letal 50% (DL50) de *L. interrogans* sorovar Copenhageni em hamsters infectados pela via transcutânea

Quatro hamsters machos e quatro fêmeas por grupo foram expostos a leptospiras virulentas em cinco diferentes concentrações: 10⁹, 10⁸, 10⁷, 10⁶ e 10⁵ leptospiras/ml.

Neste experimento, observamos óbito de todos os animais do grupo 10⁹leptospiras/ml, para machos e fêmeas (Figura 7), no grupo 10⁸ leptospiras/ml, 100% dos machos e 75% das fêmeas vieram ao óbito. No grupo 10⁷ leptospiras/ml, observamos 50% de óbitos somente no grupo de fêmeas. Nenhum óbito foi registrado nas exposições às demais densidades de leptospiras. Desta forma, a DL50 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 calculada para machos foi de 3,16×10⁷ leptospiras/ml para infecção e para fêmeas 1,7×10⁷ leptospiras/ml.

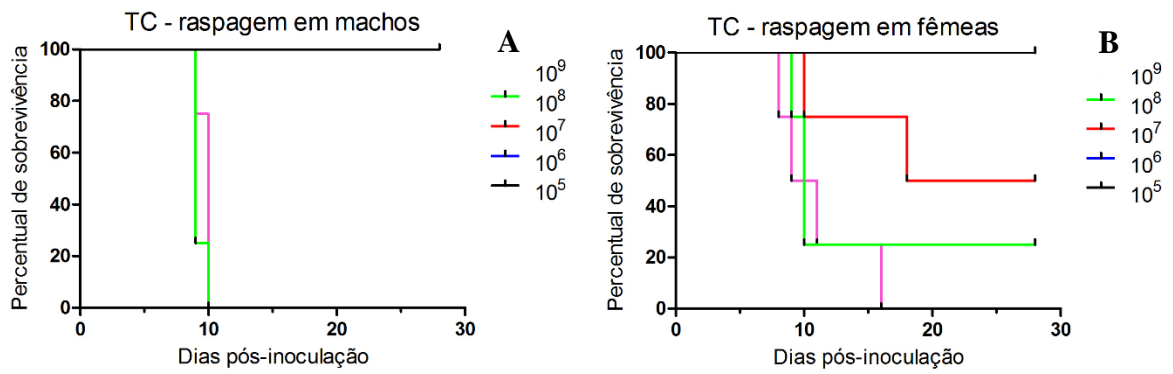


Figura 7 – Percentual de sobrevivência relacionado ao tempo de experimento (em dias), após a exposição às diferentes concentrações de leptospiros: 10⁹, 10⁸, 10⁷, 10⁶ e 10⁵ leptospiros/ml via TC em machos (A) e fêmeas (B).

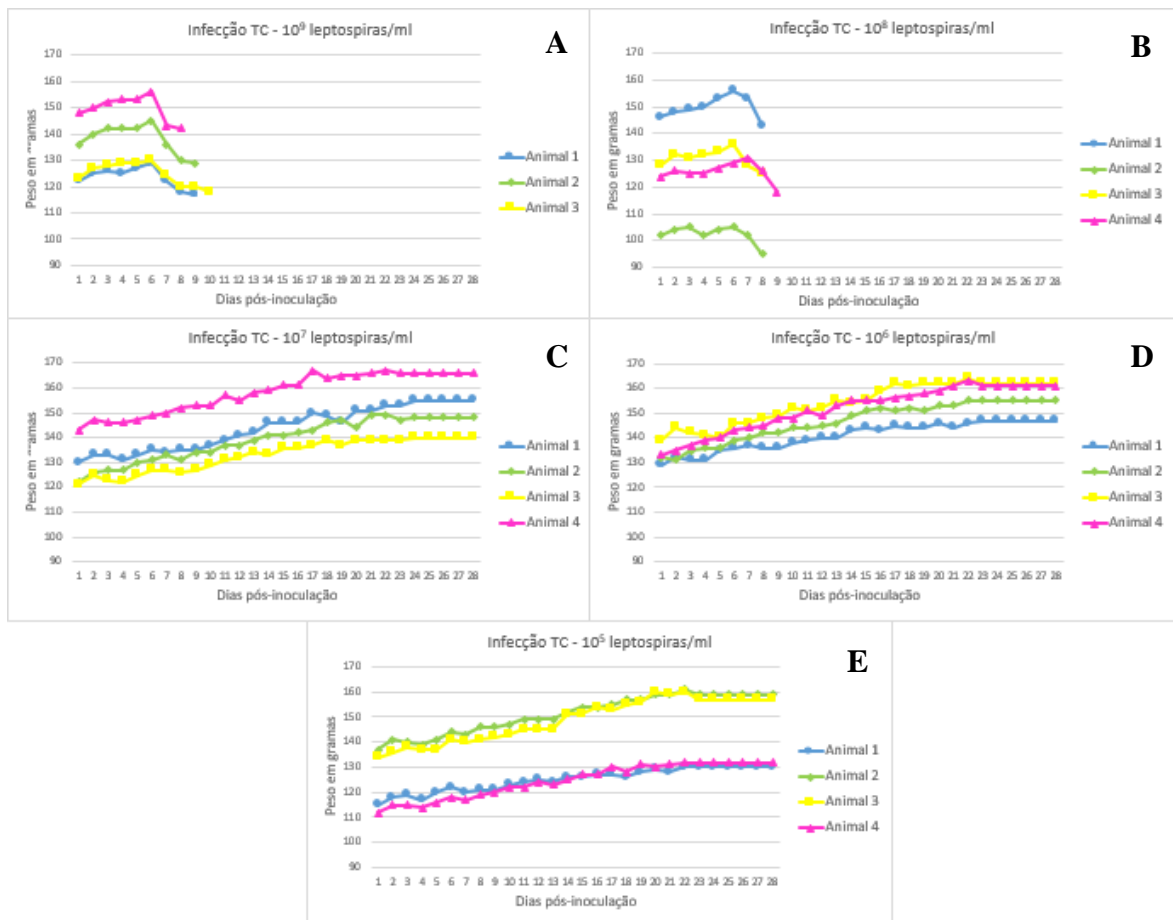


Figura 8 – Ganho de peso dos hamsters dos grupos TC com diferentes doses de inoculação: 10⁹ (A), 10⁸ (B), 10⁷ (C), 10⁶ (D), e 10⁵ (E) leptospiros/ml em machos durante 28 dias de experimentação.

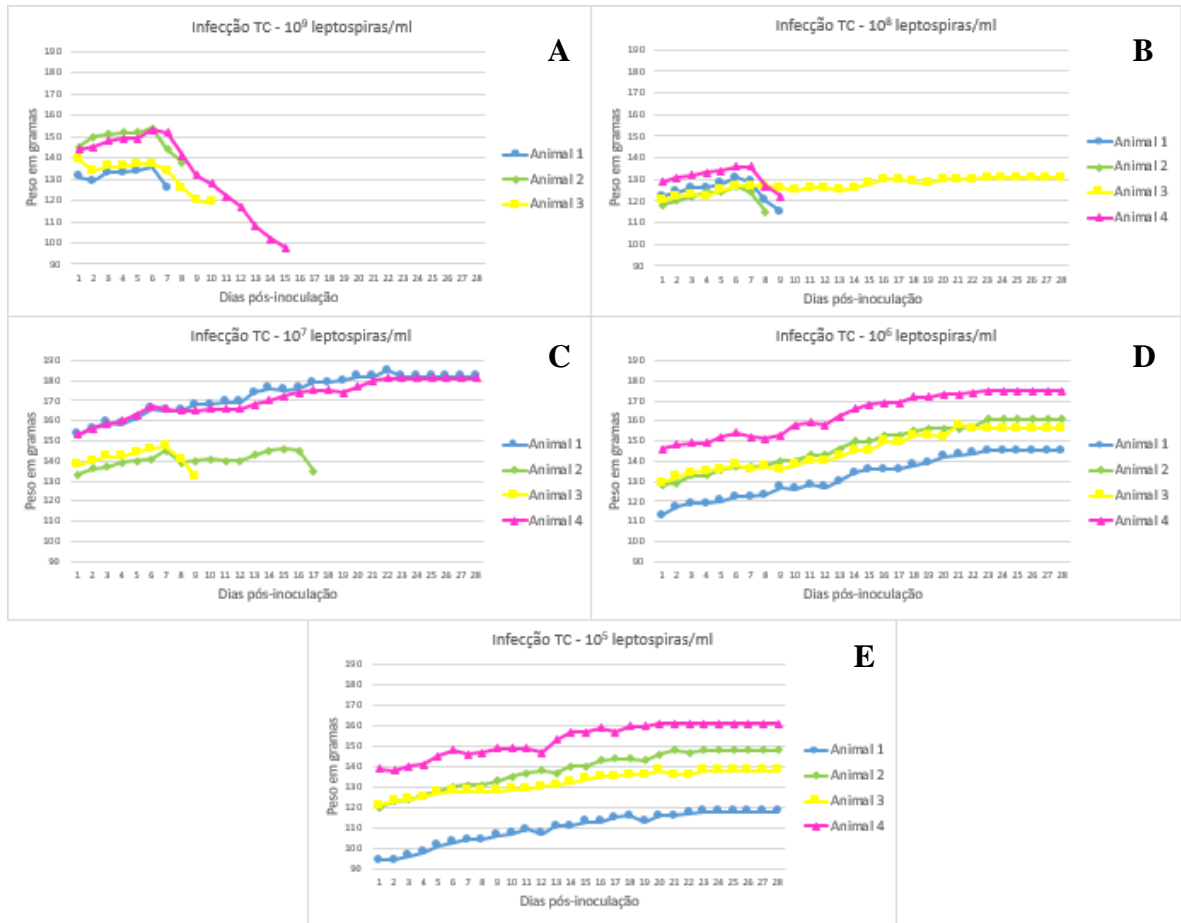


Figura 9 – Ganho de peso dos hamsters dos grupos TC com diferentes doses de inoculação: 10⁹ (A), 10⁸ (B), 10⁷ (C), 10⁶ (D), e 10⁵ (E) leptospiras/ml em machos durante 28 dias de experimentação.

A presença de leptospiras nos rins dos animais utilizados para determinação da DL50 para a via transcutânea de infecção foi avaliada por cultivo de macerado de rim. Todos os animais que foram à óbito tiveram cultura de macerado de rim positiva para leptospiras. Todos os demais animais, sobreviventes até o final do experimento, não possuíam leptospiras nos rins.

Tabela 2 – Análise da presença de leptospiras crescidas em meio EMJH, a partir do reisolamento de macerado de rim.

Grupo	Presença de leptospiras nos rins	
	Positivos	
	Machos	Fêmeas
10 ⁹	4/4	4/4
10 ⁸	4/4	3/4
10 ⁷	0/4	2/4
10 ⁶	0/4	0/4
10 ⁵	0/4	0/4

5 Discussão

A inoculação IP de leptospiras virulentas é utilizada como via padrão para o estabelecimento de infecção e desenvolvimento de leptospirose experimental, desde os primeiros experimentos visando o desenvolvimento de vacinas (NOGUCHI, 1918) e o estudo da infecção por *Leptospira* (NOGUCHI, 1919). Os primeiros estudos foram realizados utilizando *guinea pigs* como modelo animal, mas tão logo os hamsters foram adotados como modelo padrão, a mesma via IP continuou a ser empregada (GRASSMANN et al., 2012; SEIXAS et al., 2007; SILVA et al., 2008). Neste modelo, após a inoculação IP de leptospiras é possível observar uma rápida disseminação para os tecidos via corrente sanguínea, da qual a infecção é estabelecida e quando uma dose letal é utilizada, a morte é observada em poucos dias. A relativa facilidade de execução e a repetitividade dos resultados de infecção utilizando esta via, tornaram o padrão para indução da doença e teste de eficácia para vacinas, sejam bacterinas (VERMA, 2013) ou vacinas recombinantes (DELLAGOSTIN et al., 2011). Todavia, esta via de inoculação não reproduz o fenômeno natural de entrada de leptospiras patogênicas no hospedeiro, a qual ocorre através de mucosas ou da pele. Acredita-se que as leptospiras não sejam capazes de entrar no hospedeiro através da pele íntegra (WU S.R.; SI-TU, R. R., 2005), uma vez que esta é uma barreira muito eficiente para entrada de microrganismos e até o momento, nenhum mecanismo específico para penetrar a pele íntegra foi identificado em leptospiras. Porém, ainda que nenhum experimento tenha sido conduzido para confirmação, acredita-se que as leptospiras entrem no hospedeiro através de pequenas lesões (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; FAINE et al., 1999), muitas vezes imperceptíveis, normalmente presentes em algum local da pele do hospedeiro. Portanto, a via IP para inoculação de leptospiras deposita artificialmente estas bactérias no interior do hospedeiro, ignorando a provável e previsível participação de diversos mecanismos de adesão e invasão inicial que as leptospiras utilizam para atravessar a pele lesada ou mucosa do hospedeiro, antes de estabelecer a colonização.

Alguns poucos estudos foram conduzidos visando o desenvolvimento de vias alternativas para inoculação de leptospiras e desenvolvimento de leptospirose experimental. As vias mais estudadas foram a inoculação subcutânea e a conjuntival (LOURDAULT et al., 2009). Na primeira, as leptospiras eram depositadas abaixo da pele, de onde imediatamente espalham-se pela corrente sanguínea (LOURDAULT et al., 2009; MACEDO et al., 2004; TRUCCOLLO et al., 2002), enquanto na segunda, as leptospiras são depositadas sobre a membrana conjuntival do animal, em um volume pequeno (normalmente 10 µl), de onde precisam invadir a mucosa ocular, antes de espalharem-se para os demais órgãos (LOURDAULT et al., 2009). Claramente, a via conjuntival é mais desafiadora à *Leptospira*, e conseqüentemente, mais próxima ao que ocorre naturalmente. A subcutânea parece diferir muito pouco da intraperitoneal, já que as leptospiras não precisam atravessar nenhuma barreira natural para entrar no hospedeiro, inclusive possuem DL50 muito semelhantes para a mesma cepa (LOURDAULT et al., 2009; MACEDO et al., 2004). A grande limitação da via conjuntival é a prática, já que envolve a concentração de uma grande quantidade de leptospiras em um volume pequeno, que precisa ser cuidadosamente depositado sobre o olho do animal, elevando a possibilidade de perda de grande quantidade de bactérias se qualquer volume for deslocado do local de aplicação. Ainda assim, ambas as vias mostraram-se relativamente efetivas, ainda que apresentem uma grande variação entre experimentos e estudos (LOURDAULT et al., 2009; MACEDO et al., 2004; TRUCCOLLO et al., 2002). Até o momento, a via mais fidedigna àquela observada na transmissão natural foi descrita por Zhang et al. (2012), onde as leptospiras eram depositadas em animais anestesiados, num ponto único de inoculação, sobre a pele intacta ou abrasada, de onde as leptospiras invadiam o hospedeiro. Neste estudo, foi observado infecção apenas em animais onde a pele foi previamente abrasada, e ainda assim, com algumas limitações, como a ausência de repetitividade dos experimentos e de observação de leptospirose letal. Além disso, todos estes estudos foram realizados em modelo *guinea pig*, quando o hamster é o modelo animal de preferência para estudos da patogênese e testes de vacinas experimentais para leptospirose.

Neste estudo, nós propomos uma via transcutânea para estabelecimento de leptospirose letal em hamsters, simulando ao máximo o que acreditamos ocorrer durante uma infecção natural. Os hamsters com a pele abrasada (por raspagem) são expostos naturalmente à leptospiras em suspensão, as quais podem ativamente

invadir o organismo hospedeiro. Apesar de não termos dados suficientes para suportar uma conclusão estatisticamente significativa, observamos indícios de que a raspagem de uma das patas posteriores, no mínimo facilita a entrada de leptospiros, aumentando a quantidade de animais colonizados. Estes dados precisam ser confirmados por novos experimentos, com uma amostra experimental suficientemente grande para esclarecer qual a capacidade de *L. interrogans* de invadir o hospedeiro através da pele intacta.

Ainda assim, demonstramos que a infecção natural por meio de abrasão não só é possível, como muito coerente com o que se espera de uma metodologia para ser aplicada a estudos subsequentes. Isto é, calculamos uma DL50 para a infecção via TC para machos de $3,16 \times 10^7$ leptospiros/ml para infecção e para fêmeas $1,7 \times 10^7$ leptospiros/ml no meio em que o animal é exposto. Além disso, observamos que tanto para hamsters machos quanto para fêmeas, a dose letal de leptospiros é de 10^8 a 10^9 leptospiros/ml. Considerando que 10^8 leptospiros/ml de cultura é uma densidade celular que indica uma fase intermediária da fase log de crescimento celular *in vitro*, enquanto 10^9 é o final da mesma fase (dados não mostrados), acreditamos que é possível utilizar uma dose letal de leptospiros para toda uma população de hamsters que utilize células viáveis e saudáveis (doses acima de 10^9 leptospiros/ml envolveria concentração por centrifugação ou utilização de células em fase estacionária). Já era esperado que o valor de DL50 fosse maior para a infecção via TC em comparação à via IP, uma vez que nesta via as espiroquetas terão que atravessar todas as barreiras de defesa do organismo até atingir o órgão de eleição, sendo que nem todas encontrarão o animal ou terão sucesso na invasão. Já pela via IP elas são depositadas diretamente no organismo do hospedeiro, garantindo que toda a concentração inoculada já esteja no interior do mesmo. A via IP é invasiva ao organismo do animal, está propícia a provocar danos aos órgãos internos se não realizada com destreza, não simula uma via natural de infecção, e ainda utiliza uma dose muito mais alta do que o que ocorre na natureza.

O segundo experimento piloto foi avaliado quanto a presença de leptospiros nos rins dos animais infectados pela via TC, e mesmo em situações onde a dose utilizada não foi letal, puderam ser observadas leptospiros nos rins, fígado e pulmão de vários animais. Isso demonstra que a técnica de infecção TC pode induzir uma colonização sub-letal nos hamsters.

O presente trabalho possui algumas limitações. A maior delas é a ausência de repetição dos diferentes experimentos, ainda assim, em todos eles foram observados a ocorrência de leptospirose letal e em grupos com um número suficiente de animais.

Além disso, os óbitos observados após infecção objetivando a determinação da DL50 para *L. interrogans* pela via TC foram todos em doses mais altas. É verdade que nos experimentos piloto nem todos os animais infectados pela exposição à 10^8 leptospiras/ml foram ao óbito e nós acreditamos que no mínimo um de dois fatores tenham influenciado. Primeiramente, a ausência de raspagem em dois grupos destes pilotos, e mais importante, a padronização do ambiente para exposição do hamster às leptospiras realizada a partir do experimento para determinação da DL50. Acreditamos que expor individualmente um animal por vez (dentro de um béquer) à mesma dose de leptospiras no meio líquido proporciona uma taxa regular de entrada de leptospiras, resultando em taxa de infecção (observada como ocorrência de morte) condizente com a dose e mostrando repetitividade.

A raspagem ainda carece de maiores estudos. Faltam estudos para comprovar estatisticamente a eficiência desta abordagem em relação a exposição sem lesão provocada. Da mesma forma, apesar de padronizado o número e a posição de raspagem, ainda é necessário um estudo histológico para determinar o grau de lesão provocado por ela, bem como qual o nível de lesão que a *Leptospira* spp. necessita para a invasão do hospedeiro, ou ainda, o quão dispensável é a mesma.

De todos os sinais clínicos observados nestes experimentos a perda de peso é um dos sinais mais evidentes. Coutinho et al. (2011) já havia demonstrado que não há sobrevivência de hamsters infectados por *L. interrogans* sorovar Copenhageni quando os mesmos perdem 10% do peso em relação ao maior peso observado. Observamos o mesmo fenômeno em nossos estudos, portanto estes corroboram a ideia de que perda de 10% do peso pode ser utilizado como ponto de parada para um fim mais humanitário ao animal, através de eutanásia e não por morte natural.

6 Conclusão

Em conclusão, demonstramos que a via de infecção TC é possível, e apresenta uma DL50 para *L. interrogans* sorovar Copenhageni de $1,7 \times 10^7$ e $3,16 \times 10^7$ leptospiros/ml de solução utilizada para infecção para fêmeas e machos, respectivamente. Uma leve raspagem de uma das patas posteriores parece contribuir para infecção e será melhor estudada. Esta metodologia para infecção será agora avaliada em estudos de proteção induzida por vacina contra leptospirose e dinâmica da infecção, envolvendo a dispersão destas espiroquetas por diferentes órgãos. Acreditamos que a técnica descrita neste trabalho tem potencial para substituir a infecção via IP, proporcionando a revisão de estudos de vacinas, buscando novas características protetoras em antígenos já desafiados IP e apontar novos antígenos relacionados com a invasão inicial do hospedeiro, bem como possível utilização destes em vacinas.

Referências

ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.

ATHANAZIO, D. A.; SILVA, E. F.; SANTO, C. S.; ROCHA, G. M.; VANNIERSANTOS, M. A.; MCBRIDE, A. J.; KO, A. I.; REIS, M. G. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Tropica**, v. 105, n. 2, p. 176-180, 2008

BARTHI, 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. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 757-771, 2003.

BOLIN, C. A.; ALT, D. P. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 995-1000, 2001.

BOURHY, B.; COLLET, L.; BRISSE, S.; PICARDEAU, M. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic *Leptospira* species isolated from humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, p. 1-18, 2014.

BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P. A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D. P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; DAVIES, J. K.; ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 14560-14565, 2006.

COUTINHO, M. L.; CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; MATSUNAGA, J.; BABBITT, J. T.; LEWIS, M. S.; ALEIXO J. A. G.; HAAKE, D. A. A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, p. 1-10, 2011.

CHAGAS-JUNIOR, A. D.; DA SILVA, C. L.; SOARES, L. M.; SANTOS, C. S.; SILVA, C. D. M.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; MCBRIDE, F. W. C.; MCBRIDE, A. J. Detection and quantification of *Leptospira interrogans* in hamster and rat kidney samples: immunofluorescent imprint versus real-time PCR. **PLoS One**, v. 7, n. 2, 2012.

CHAGAS-JUNIOR, A. D.; MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; FIGUEIRA, C. P.; MEDEIROS, M. A.; REIS, M. G.; KO, A. I.; MCBRIDE, F. W. C. An imprint method for detecting leptospirosis in hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 1632-1637, 2009.

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FÉLIX, S. R.; SILVA, E. F.; MCBRIDE, A. J. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Human Vaccines**, v. 7, n. 11, 2011.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2 ed. Melbourne: MediSci, 1999. 272p.

GRASSMANN, A. A.; FELIX, S. R.; SANTOS, C. X.; AMARAL, M. G.; SEIXAS NETO, A. C. P.; FAGUNDES, M. Q.; SEIXAS, F. K.; SILVA, E. F.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or co-administered with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 5, p.740-745, 2012.

GOUVEIA E. L.; METCALFE, J.; DE CARVALHO, A. L. F.; AIRES, T. S. F.; VILLASBOASBISNETO, J. C.; QUEIRROZ, A.; SANTOS, A. C.; SALGADO, K.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 505-508, 2008.

HAAKE, David. Hamster model of leptospirosis. **Current Protocols in Microbiology**, Cap. 12, 2006.

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

LEVETT, Paul. Leptospirosis. **Clinical Microbiology reviews**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

LOURDAULT, K.; AVIAT, F.; PICARDEAU, M. Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 648-655, 2009.

LOURDAULT, K.; WANG, L.; VIEIRA, A.; MATSUNAGA, J.; MELO, R. LEWIS, M. S.; HAAKE, D. A.; GOMES-SOLECKIE, M. Oral immunization with *Escherichia coli* expressing a lipidated form of LigA protects hamsters against challenge with *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 2, p. 893-902, 2014.

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.

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 376-386, 2005.

NALLY, J. E.; FISHBEIN, M. C.; BLANCO, D. R.; LOVETT, M. A. Lethal infection of C3H/HeJ and C3H/SCID mice with an isolate of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 7014-7017, 2005.

NASCIMENTO, A. L. T. O.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; SLUYS, M. A. V.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E. A.; DIGIAMPIETRI, L. A.; HARSTKEERL, R. A.; HO, P. L.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; HAAKE, D. A.; MARTINS, E. A. L. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 459-478, 2004.

NOGUCHI, Hideyo. A comparative study of experimental prophylactic inoculation against *Leptospira icterohaemorrhagiae*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 28, n. 5, p. 561-570, 1918.

NOGUCHI, Hideyo. Etiology of yellow fever. **Journal of Experimental Medicine**, v. 29, n. 6, p. 561-570, 1919.

OLIVEIRA, F. C. S.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; BATISTA, C. S. A.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; GONÇALVES, A. P.; VASCONCELLOS, S. A. Fatores de risco para leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 398-402, 2010.

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MÉDIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS One**, v. 3, n. 2, p. 1-9, 2008.

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. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.78, n.1, p. 1-8. 2014.

RANDALL, R.; COOPER, H. K. The Golden Hamster (*Cricetus Auratus*) as a Test Animal for the Diagnosis of Leptospirosis. **Science**, v. 100, p. 133-134, 1944.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938.

REN, S; FU, G.; JIANG, X.; ZENG, R.; MIAO, Y.; XU, H.; ZHANG, Y.; XIONG, H.; LU, G.; LU, L.; JIANG, H.; JIA, J.; TU, Y.; JIANG, J.; GU, W.; ZHANG, Y.; ZHU, G.; WAN, M.; HUANG, H.; QIAN, Z.; WANG, S.; MA, W.; YAO, Z.; SHEN, Y.; QIANG, B; XIA, Q.; GUO, X.; DANCHIN, A.; GIRONS, I. S.; SOMERVILLE, R. L.; WEN, Y.; SHI, M.; CHEN, Z.; XU, J.; ZHAO, G. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 422, n. 24, p. 888-893, 2003.

RUBY, K. W.; SRINIVAS, G. B. Development of *in vitro* assays for measuring the relative potency of leptospiral bacterins containing serogroups canicola, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae, and Pomona. **Biologicals**, p. 1-7, 2013.

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

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

SRNIVAS, G. B.; WALKER, A.; RIPPKE, B. USDA regulatory guidelines and practices for veterinary *Leptospira* vaccine potency testing. **Biologicals**, p.1-5, 2013.

TRUCCOLO, J.; CHARAVAY, F.; MERIEN, F.; PEROLAT, P. Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 848-853, 2002.

VARNI, V.; RUYBAL, P.; LAUTHIER, J. J.; TOMASINI, N. BRIHUEGA, B.; KOVAL, A.; CAIMI, K. Reassessment of MLST schemes for *Leptospira* spp. typing worldwide. **Infection, Genetics and Evolution**, p. 1-7, 2013.

VERMA, R.; KHANNA, P.; CHAWLA, S. Whole-cell inactivated leptospirosis vaccine: future prospects. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 9, n. 4, p. 763-765, 2013

VIEIRA, M. L.; ALVAREZ-FLORES, M. P.; KIRCHGATTER, K.; ROMERO, E. C.; ALVES, I. J.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Interaction of *Leptospira interrogans* with human proteolytic systems enhances dissemination through endothelial cells and protease levels. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 5, p. 1764-1774, 2013.

World Health Organization. **Report of the second meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group**. Geneva, Switzerland: WHO, 2011. 37p.

WU S.R.; SI-TU, R. R. Investigation on a Leptospirosis Case in Kaiping in 2005. **Preventive Medicine**, v. 12, n. 5, p. 532–533, 2005.

ZHANG, Y.; LOU, X. L.; YANG, H. L.; GUO, X. K.; ZHANG, X. Y.; HE, P.; JIANG, X. C. Establishment of a leptospirosis model in guinea pigs using an epicutaneous inoculations route. **BMC Infectious Diseases**. v. 12, n. 20, p. 1-10, 2012.