



CULTIVO *IN VIVO* DE LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS EM MODELO ANIMAL SUSCETÍVEL À LEPTOSPIROSE

SEIXAS NETO, Amilton Clair Pinto; SILVA, Éverton Fagonde; FÉLIX, Samuel Rodrigues; DINIZ, Juliana Alcoforado; GRASSMANN, André Alex; DELLAGOSTIN, Odir Antonio.

*Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia – UFPEI;
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.
amiltonseixas@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de importância global, que é causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (Bharti et al., 2003), classificadas em 19 espécies com mais de 300 sorovares (Adler et al., 2009). Mundialmente, o número de casos humanos de leptospirose não é bem documentado, entretanto, durante epidemias em locais de alto risco, podem ocorrer mais de 100 casos por 100 mil indivíduos (WHO, 2003). Por esse e por outros fatores, a leptospirose é considerada uma doença tropical negligenciada (Hotez et al., 2009).

Haake et al. (1991) descreveram a mudança qualitativa e quantitativa que ocorre na superfície de leptospiros durante os sucessivos cultivos *in vitro*. Além disso, leptospiros derivadas de tecidos de ratos e camundongos experimentalmente infectados diferem na expressão de constituintes como lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas de membrana externa daquelas cultivadas paralelamente *in vitro* (Nally et al., 2004; Nally et al., 2007). Ao longo dos anos, isolados de leptospiros patogênicos tem sido utilizados para a padronização de modelos animais visando o teste de vacinas (Silva et al., 2008), e estudos de patogênese, incluindo a infecção experimental aguda (Nally et al., 2004) e a infecção experimental crônica (Monahan et al., 2008).

Em outra abordagem, pesquisadores utilizaram um modelo animal experimental para o cultivo *in vivo* de espiroquetas, da espécie *Borrelia burgdorferi*, dentro de membranas de diálise (Dialysis Membrane Chamber - DMC), através do implante no abdome de ratos. Este estudo evidenciou a ocorrência da expressão diferencial de lipoproteínas quando comparadas com aquelas cultivadas *in vitro*. Contudo, as bactérias foram recuperadas e mantiveram-se virulentas, propiciando assim, um melhor entendimento da relação agente e hospedeiro (Akins et al., 1998).

Tendo em vista a necessidade de novas metodologias para o estudo da patogênese da leptospirose, este trabalho objetivou avaliar a viabilidade da

técnica de implantes de DMC intraperitoneal em hamsters, um modelo suscetível à leptospirose.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas de *Leptospiras*. As cepas de *Leptospira* utilizadas nos experimentos foram: (a) *L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, cepa Fiocruz L1-130, isolada de um caso humano de leptospirose fatal na cidade de Salvador (BA); (b) *L. interrogans*, sorogrupo Canicola, cepa Kito, isolada de um canino com leptospirose fatal, na cidade de Pelotas (RS); e (c) *L. noguchii*, sorogrupo Autumnalis, cepa Bonito, isolada de um humano com leptospirose grave, na cidade de Pelotas (RS). Todas as cepas foram previamente caracterizadas quanto a sua virulência em hamster (Silva et al. 2008). As culturas foram mantidas em meio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Difco, laboratories) com 10% de EMJH suplemento (Difco, laboratories) em estufa bacteriológica a 29°C, como descrito previamente (Silva et al., 2008).

Cultivo *in vitro* e *in vivo*. Para o cultivo de leptospiras *in vitro* foi realizado um repique com 0,5 mL (10^4 leptospiras) de uma cultura com crescimento de 7 dias em 4,5 mL em EMJH (Faine et al 1999), sem o uso de antibióticos ou inibidores de crescimento. Para o cultivo *in vivo*, membranas de diálise (Spectrum Medical Industries Inc., Los Angeles, CA) foram esterilizadas e estocadas em temperatura ambiente até o uso. No momento do experimento, as membranas foram amarradas em uma das pontas, e cuidadosamente preenchidas com 4,5 mL de EMJH e 0,5 mL de cultura contendo 10^4 leptospiras, semelhante ao que foi realizado no procedimento *in vitro*. Após esta fase, a outra extremidade foi cuidadosamente amarrada e o excesso de membrana foi retirado de ambas às pontas. Após a retirada dos implantes, as culturas recuperadas das DMCs foram submetidas à microscopia de campo escuro para a visualização de leptospiras.

Animais, implantes e retirada de DMC. Foram utilizados nove hamsters (*Mesocricetus auratus*) adultos, fêmeas, pesando entre 150 e 180 gramas. Os nove animais foram separados em grupos de 3 animais para cada uma das cepas, sendo mantidos em microisoladores em estante ventilada no Biotério Central da UFPel. Em todos os experimentos, os animais foram anestesiados usando o seguinte protocolo: - aplicação intramuscular de Acepromazina (1 mg/kg) como medicação pré-anestésica, seguida da aplicação intramuscular da associação de Quetamina (50 mg/kg) e Xilazina (5 mg/kg) (Monahan et al., 2008). Além da anestesia geral, aplicou-se Cloridrato de Lidocaína no local da incisão. Para os implantes das DMCs, procedeu-se a laparotomia mediana, as quais foram alojadas na cavidade abdominal de cada animal. Após 7 dias, foi realizada a eutanásia dos animais e as DMCs foram retiradas assepticamente. O lado externo de cada membrana foi lavado com água estéril e o conteúdo do interior foi removido através de aspiração com seringa estéril, sendo transferido para um tubo de cultivo também estéril.

Aspectos éticos e de biossegurança. Os animais que foram utilizados neste estudo foram tratados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

(<http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>). Além disso, o laboratório detém o Certificado de Qualidade em Biossegurança, registro: 0081/98 de 22/12/98.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os nove implantes foram realizados com sucesso (Figura 1). Todos os animais recuperaram-se da anestesia em um período máximo de 4 h, não apresentando modificação no seu comportamento durante o período pós-cirúrgico. Ao final de sete dias pós-implante, todos os animais sobreviveram e o monitoramento diário revelou que nenhum animal apresentou sinais clínicos característico de uma infecção por leptospiras. Entretanto, durante a retirada das DMCs, percebeu-se o encapsulamento das mesmas, fibrose no local do implante e diminuição do volume do seu conteúdo.

Na microscopia de campo escuro observou-se a contaminação de 8 dos 9 cultivos, não sendo possível a análise das mesmas. Porém, no cultivo positivo, inoculado com a cepa Bonito de *L. noguchii* observou-se a presença de um número elevado de espiroquetas vivas. O cultivo foi repicado (procedimento *in vitro*) e centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min. O sedimento obtido foi congelado a -20 °C.

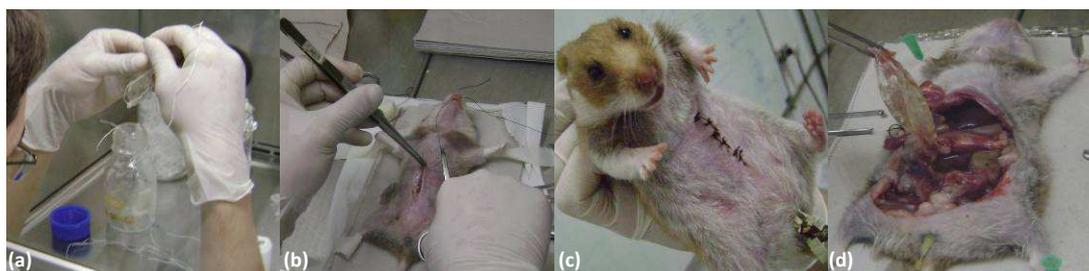


Figura 1. Procedimento para os implantes de DMCs. (a) Preparo do cultivo nas DMCs, (b) Implante na cavidade abdominal, (c) Evolução durante o período pós-cirúrgico (7 dias), (d) retirada das DMCs.

O percentual (11%) de culturas recuperadas após o cultivo *in vivo* foi um fator negativo em nosso estudo. Embora os cultivos *in vitro* não contaminem com outros microorganismos quando realizados com cuidadosa assepsia, esse fato não foi observado com a metodologia dos implantes. Para os experimentos futuros, nosso grupo viabilizará a utilização de um inibidor de crescimento, o 5-Fluoracil (Faine et al. 1999), reagente que não interfere no crescimento de leptospiras virulentas.

Por outro lado, este trabalho demonstra que é possível usar o hamster, um modelo suscetível à leptospirose, para cultivo *in vivo* dessas bactérias. Nossos resultados são promissores e a otimização da técnica utilizada propiciará a realização de estudos posteriores, objetivando a análise comparativa do perfil proteômico de cepas cultivadas *in vitro* e *in vivo*. Além disso, esse estudo relata, de forma inédita, o cultivo *in vivo* de leptospiras em hamsters, um modelo animal suscetível para leptospirose.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B.; de la PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**.
- AKINS, D.R.; BOURELL, K.W.; CAIMANO, M.J.; NORGDARD, M.V.; RADOLF, J.D. A new animal model for studying Lyme disease spirochetes in a mammalian host-adapted state. **Journal of Clinical Investigation**, v.101, n.10, p. 2240-2250, 1998.
- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v.3, n.12, p.757-771, 2003.
- FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. MediSci: Melbourne, Australia, 272p., 1999
- HAAKE, D. A.; WALKER, E. M.; BLANCO, D. R.; BOLIN, C. A.; MILLER, M. N.; HOTEZ, P.J.; BROWN, A.S. Neglected tropical disease vaccines. **Biologicals**, v.37, n.3, p.160-164, 2009.
- LOVETT, M. A. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar Grippityphosa during in vitro cultivation. **Infection and Immunity**, v.59, p.1131-1140. 1991.
- MONAHAN, A.M.; CALLANAN, J.J.; NALLY, J.E. Proteomic analysis of *Leptospira interrogans* shed in urine of chronically infected hosts. **Infection and Immunity**, v.76, n.11, p.4952-4958, 2008
- NALLY, J.E.; CHANTRANUWAT, C.; WU, X.Y.; FISHBEIN, M.C.; PEREIRA, M.M.; Da SILVA, J.J.; BLANCO, D.R.; LOVETT, M.A. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. **American Journal of Pathology**. v.164, n.3, p.1115-1127, 2004.
- NALLY, J.E.; WHITELEGGE, J.P.; BASSILIAN, S.; BLANCO, D.R.; LOVETT, M.A. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. **Infection and Immunity**, v. 75, n.2, p.766-773, 2007.
- SILVA, É.F.; SANTOS, C.S.; ATHANAZIO, D.A.; SEYFFERT, N.; SEIXAS, F.K.; CERQUEIRA, G.M.; FAGUNDES, M.Q.; BROD, C.S.; REIS, M.G.; DELLAGOSTIN, O.A.; KO, A.I. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. **Vaccine**, v.26, n.31, p.3892-3896, 2008.
- WHO. World Health Organization. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2003