

Avaliação da função renal e hepática em hamsters infectados experimentalmente com *Leptospira interrogans***Evaluation of renal and hepatic function in hamsters experimentally infected with *Leptospira interrogans***

DOI:10.34117/bjdv6n9-670

Recebimento dos originais: 26/08/2020

Aceitação para publicação: 29/09/2020

Tanise Pacheco Fortes

Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil

E-mail: tanisefortes@gmail.com

Caroline Dewes

Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil

E-mail: caroldewesvet@hotmail.com

Gilmar Batista Machado

Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil

E-mail: gilmar.machado84@hotmail.com

Paula Soares Pacheco

Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil

E-mail: paulassoarespacheco@gmail.com

João Pedro Mello Silva

Discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil

E-mail: jptam97@gmail.com

Amilton Clair Pinto Seixas Neto

Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil

E-mail: amiltonseixas@gmail.com

Flávia Aleixo Vasconcellos

Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas
Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel
Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil
E-mail: aleixo.fv@gmail.com

Éverton Fagonde da Silva

Docente da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas
Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel
Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil
E-mail: fagondee@gmail.com

RESUMO

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) são amplamente usados como modelo animal experimental para o estudo da leptospirose. Apesar disso, informações sobre os parâmetros bioquímicos da função renal e hepática em animais menores de 6 semanas, assim como as alterações sofridas nesses níveis durante a infecção por leptospirosas patogênicas, são escassas na literatura. Neste trabalho avaliamos os níveis de bilirrubina total (BT), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina (CR) antes e depois da infecção por *Leptospira interrogans*. Em nosso estudo preliminar, descrevemos valores normais para parâmetros não encontrados em bibliografia. Porém, não foi encontrada nenhuma diferença estatística significativa entre os valores de BT, ALT e CR apresentados pelos grupos após a infecção.

Palavras-chave: hamsters, leptospirose, bioquímica, renal, hepática.

ABSTRACT

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) are widely used as an experimental animal model for the study of leptospirosis. Despite this, information about the biochemical parameters of renal and liver function in animals younger than 6 weeks, as well as changes in these levels during infection by pathogenic leptospires, are insufficient in literature. In this work, we evaluated the levels of total bilirubin (BT), alanine aminotransferase (ALT), and creatinine (CR) before and after *Leptospira interrogans* infection. In our preliminary study, we described parameters not found in the bibliography. However, no statistically significant difference was found between the values of BT, ALT, and CR presented by the groups after infection.

Keywords: hamsters, leptospirosis, biochemistry, renal, hepatic.

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose bacteriana de distribuição mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* [1]. Os humanos são considerados hospedeiros acidentais na cadeia epidemiológica da doença, se infectando através do contato direto ou indireto com urina, água ou solo contaminado com a bactéria [2-3]. Ao penetrarem no organismo, as leptospirosas se disseminam pela corrente sanguínea, se dirigindo a órgãos como o fígado, os pulmões e os rins

[4]. A lesão primária causada pela bactéria consiste em dano ao epitélio dos vasos sanguíneos, gerando isquemia localizada, necrose tubular renal, dano hepatocelular e pulmonar [5].

A icterícia é um sintoma comumente observado em pacientes com leptospirose. A causa primária é o dano hepatocelular aliado à desorganização na estrutura e funcionamento do fígado [1]. Essas lesões podem gerar aumento nos níveis de bilirrubina no soro, enquanto as aminotransferases frequentemente estão normais. Um nível elevado de bilirrubina sérica acompanhado de níveis normais de aminotransferases costuma ser altamente sugestivo de leptospirose. O comprometimento renal, por outro lado, costuma ser evidenciado pelo aumento nos níveis séricos de creatinina e ureia em outras espécies animais [6].

Em hamsters com idade variando entre 12 – 18 meses, os valores de referência para bilirrubina total (BT), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina (CR) estão bem estabelecidos [7]. Por outro lado, dados descrevendo os níveis desses marcadores em animais recém-desmamados, bem como as alterações sofridas durante a infecção experimental por leptospiros patogênicas, são escassos na literatura. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi descrever e analisar os níveis de BT, ALT e CR em hamsters vacinados e não vacinados, antes e depois da infecção com *Leptospira interrogans* virulenta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) fêmeas com idade entre 4 e 5 semanas, pesando entre 90 e 115 gramas, foram distribuídos em dois grupos (n=6 animais por grupo). Os animais foram mantidos em microisoladores e alojados em estantes ventiladas, com umidade e temperatura controladas. O fornecimento de água e alimento foi *ad libitum*. Após o desafio, os animais foram monitorados diariamente quanto ao comportamento e surgimento de sinais clínicos. Os animais foram classificados como doentes quando apresentavam sinais clínicos e/ou perda de peso corporal $\geq 10\%$ [8] e eutanasiados no mesmo dia. Os animais sobreviventes foram eutanasiados no dia 21 após o desafio.

2.2 CEPA DE *LEPTOSPIRA*, DESENHO EXPERIMENTAL E DESAFIO

Leptospira interrogans sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi utilizada neste estudo. As bactérias foram cultivadas em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) e mantidas a 29°C em estufa bacteriológica. Quando a cepa atingiu uma concentração de 10^8 bactérias/ml, foi diluída até a dose utilizada nos desafios. Os animais foram distribuídos em

dois grupos: (I) inoculados com PBS estéril (placebo); e (II) vacinados com bacterina (10^8 bactérias inativadas). As preparações foram administradas em duas doses com volume total de 300 μ l, no músculo quadríceps, nos dias 0 (zero) e 14 (catorze). Os animais foram desafiados no dia 28 pela via intraperitoneal, com 1000 leptospiros da cepa Fiocruz L1-130, referente a 20 vezes a DL50% [9].

2.3 AMOSTRAS

As amostras de sangue foram coletadas através de punção do plexo venoso retro orbital, no dia 0 (antes da vacina/placebo) e depois do desafio com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 (no dia do óbito ou no dia da eutanásia). Os soros foram obtidos através da centrifugação do sangue a 3.000 rpm por um período de cinco minutos e enviados, sob refrigeração, para o laboratório onde as análises bioquímicas foram realizadas. Os níveis de bilirrubina total (BT), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina (CR) foram avaliados.

2.4 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos foram realizados com os conforme as diretrizes do CONCEA. Este projeto está cadastrado no COCEPE/UFPel e possui parecer favorável para a execução (CEEA 5237).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas e os gráficos de sobrevivência foram realizados no programa *GraphPad Prisma 7 for Windows versão 7.02*. O teste *T de Student* foi realizado para comparar os resultados obtidos nos exames dos animais após a infecção experimental. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Leptospira interrogans sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 mostrou-se altamente virulenta quando inoculada em hamsters pela via intraperitoneal. A inoculação das espiroquetas patogênicas causou a morte de todos os animais do grupo I (inoculados com PBS estéril) entre 5 e 6 dias após o desafio, enquanto os animais vacinados com bacterina sobreviveram até o final do experimento. A avaliação macroscópica dos órgãos durante a necropsia revelou áreas distintas de hemorragia na superfície dos pulmões e congestão do fígado.

Os testes laboratoriais de dosagem bioquímica, escolhidos para avaliar o fígado dos animais foram BT e ALT, enquanto que para avaliar a função renal dos mesmos, a dosagem de creatinina (CR) foi utilizada. Em humanos, o aumento da bilirrubina conjugada sugere ou lesão hepatocelular ou lesão colestática. Os testes de funcionalidade do hepatócito incluem as transaminases, sendo a ALT mais específica do fígado, enquanto a AST pode ser encontrada no fígado e em outros tecidos como o miocárdio, musculoesquelético, rins e cérebro. O aumento das transaminases indica lesão hepática. As enzimas hepáticas normais sugerem que a icterícia não é devido à lesão hepática e do trato biliar. Na lesão hepatocelular ocorre aumento de 8 a 10 vezes do valor normal das transaminases. Já o teste de creatinina foi escolhido por ser usado na avaliação da função dos rins, ela é um resíduo produzido pela quebra de uma proteína chamada creatina fosfato, o que pode indicar condições como insuficiência renal, infecção nos rins [10].

Os valores de referência destes testes de bioquímica sérica para hamsters fêmeas, com idade entre 12 e 18 meses, são descritos como: - Creatinina 0,3-0,6mg/dL; - Bilirrubina total 0,2-0,4mg/dL; e - Alanina Aminotransferase (ALT) 19-43 UI/L [10]. Porém, valores de referência para hamsters com idade menor que 12 meses ainda não estão bem estabelecidos. Dessa maneira, o primeiro intuito desse experimento consistiu na coleta de amostras dos animais antes que qualquer intervenção fosse realizada, obtendo os valores fisiológicos para o grupo estudado.

No dia cinco (5) após o desafio, dois animais do grupo I apresentaram sinais clínicos compatíveis com leptospirose e perda de peso acima do critério adotado (perda de peso >10%) e foram eutanasiados. No sexto dia, todos os animais apresentaram-se doentes e também foram eutanasiados. Os valores obtidos nas duas coletas podem ser visualizados na Tabela 1.

Um nível elevado de bilirrubina sérica acompanhado de níveis normais de aminotransferases costuma ser altamente sugestivo de leptospirose. O comprometimento renal, por outro lado, costuma ser evidenciado pelo aumento nos níveis séricos de creatinina em outras espécies animais [6]. Porém, em nosso estudo, apesar das evidências numéricas nas dosagens que sustentam tais constatações, não foi encontrada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) nos níveis de BT, ALT e CR entre os hamsters que desenvolveram leptospirose aguda e fatal e os hamsters sobreviventes vacinados com bacterina. Isso pode ser explicado pelo curto período entre o desafio e a morte dos animais, sugerindo que os principais danos ocasionados pela bactéria ocorrem antes que possam ser detectados por análises bioquímicas.

Tabela 1. Valores médios (+/-DP) dos níveis bioquímicos encontrados em hamsters fêmeas com 4 a 5 semanas de idade, vacinados ou não, antes e após o desafio.

Parâmetro	Grupo I (PBS)		Grupo II (Vacinados)	
	Dia 0	Dia do óbito	Dia 0	Dia do óbito
BT (mg/dL)	0,25 (0,10)	1,66 (1,25)	0,13 (0,05)	0,30 (0,12)
ALT (UI/L)	60,33 (7,37)	73,67 (21,7)	78,00 (22,8)	78,67 (27,06)
CR (mg/dL)	0,27 (0,06)	0,70 (0,58)	0,25 (0,03)	0,32 (0,06)

Em hamsters, os agravos gerados pela infecção por *Leptospira* nos rins e fígado parecem estar relacionados com o grande número de bactérias e fatores citotóxicos presentes nos tecidos [11]. Em outras espécies animais, como por exemplo, o que ocorre nos caninos, o comprometimento renal visualizado pela alteração nos níveis de creatinina, ocorre em consequência da diminuição na perfusão renal e pela diminuição da taxa de filtração glomerular associadas à destruição das células do epitélio renal por toxinas e componentes da membrana das leptospiros [12]. Durante o experimento, não houve diferença estatística significativa entre os valores de CR após desafio para os animais do grupo I quando comparados aos do grupo II, sugerindo que apesar da severidade do quadro clínico apresentando, alterações bioquímicas significativas ainda não haviam se estabelecido.

De acordo com os resultados mostrados, podemos evidenciar uma contribuição importante para o conhecimento científico em relação a alguns parâmetros bioquímicos normais de hamsters com idade entre seis e onze semanas, estudados aqui através de BT, ALT e CR. Além disso, demonstramos através deste experimento que a análise dos níveis de BT, ALT e CR em hamsters vacinados e não vacinados, antes e depois da infecção com *Leptospira interrogans* virulenta, poderão ser utilizados em futuros experimentos. Porém, outros estudos devem ser realizados durante o processo de infecção, para demonstrarmos com maior clareza os picos e normalidade dos analitos em questão, e mais precisamente os níveis de alteração renal e hepática durante a infecção em animais experimentalmente infectados. Outros parâmetros sistêmicos devem ser também descritos a fim de servirem de referência para novos estudos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e a FAPERGS pelas bolsas de estudo e pelos demais auxílios financeiros para a execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- [1] FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and leptospirosis. 2 ed. Melbourne: Medisci, 1999. 272p.
- [2] KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era. *Nature Reviews Microbiology*, v.7, p.736-747, 2009.
- [3] MURRAY, G. L. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Veterinary Microbiology*, v.162, p.305-314, 2013.
- [4] FERNANDES, L. G.; SIQUEIRA, G. H.; TEIXEIRA, A. R. F.; SILVA, L. P.; FIGUEREDO, J. M.; COSATE, M. R.; VIEIRA, M. L.; NASCIMENTO, A. L. T. *Leptospira* spp.: novel insights into host-pathogen interactions. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.176, p.50-57, 2016.
- [5] ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*, v.140, n.3, p.287-296, 2010.
- [6] LILENBAUM, W.; CAVALCANTE, M. H.; RIBEIRO, E. R.; DANIEL, C. Dosagem de ureia sanguínea em cães com leptospirose. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, v.19, n.6, p.233-237, 1997.
- [7] WOLFORD, S. T.; SCHROER, R. A.; GOHS, F. X.; GALLO, P. P.; BRODECK, M.; FALK, H. B.; RUHREN, R. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, v.18, n.2, p.161-188, 1986.
- [8] COUTINHO, M. L.; CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; MATSUNAGA, J.; BABITT, J. T.; LEWIS, M. S.; ALEIXO, J. A.; HAAKE, D. A. A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.5, n.12, 2011.
- [9] SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; McBRIDE, A. J.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine*, v.25, n.33, p.6277-6286, 2007.
- [10] VIDYASAGAR, R.; GURUPRASAD, P. Jaundice: applying lessons from physiology Hepatopancreatobiliary I. *Surgery*, v.27, n.1, 2008.
- [11] ALVES, V. A.; GAYOTTO, L. C.; DE BRITO, T.; SANTOS, T. M.; WAKAMATSU, M. R.; VIANNA, M. R.; SAKATA E. E. Leptospiral antigens in the liver of experimentally infected guinea pig and their relation to the morphogenesis of liver damage. *Exp Toxicol Pathol*, v.44, p.425-434, 1992.
- [12] GREENE, C. E. *Infectious diseases of the dog and cat*. Athens: Saunders, 2006. 934p.