

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

Camila Lovaglio Campos

Estudos alternativos: redução do uso de animais para manutenção e análises da virulência de *Leptospira* usando cultura celular tridimensional (3D)

São Paulo
2020

Camila Lovaglio Campos

Estudos alternativos: redução do uso de animais para manutenção e análises da virulência de *Leptospira* usando cultura celular tridimensional (3D)

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos.

Orientador (a): Josefa Bezerra da Silva

São Paulo

2020

Dados internacionais de catalogação na publicação

Campos, Camila

Estudos alternativos: redução do uso de animais para manutenção e análises da virulência de *Leptospira* usando cultura celular tridimensional (3D)./ Camila Lovaglio Campos ; orientador Josefa Bezerra da Silva. – São Paulo, 2020.

33 f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos.

1. Modelos alternativos 3D. 2. Leptospirose. 3. Patogenicidade. I. Da Silva, Josefa Bezerra. II. Instituto Butantan. III. Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

Esta monografia foi elaborada com base no **Guia prático para elaboração de trabalho acadêmico** desenvolvido pela Biblioteca do Instituto Butantan, de acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

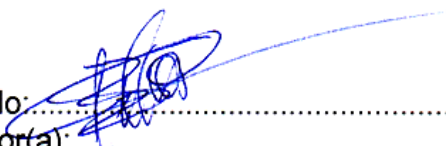
Eu, Camila Lovaglio Campos, aluno(a) do curso Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 27 de Fevereiro de 2020

Camila Lovaglio Campos
aluno(a)

De acordo: 
Orientador(a):

Dedico este trabalho a todos que mesmo em tempos de sucateamento da educação e pesquisa acreditam que essas são as bases para transformação social.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Josefa Bezerra da Silva pelos ensinamentos, paciência e apoio durante o estágio.

À Dra Renata M. A. da Costa, pela ideia inicial do projeto.

À Dra Luciana R. Gomes, por ensinar a técnica de cultura celular 3D..

Ao Laboratório de Biologia Celular, principalmente ao Alexander S. de Souza pelo auxílio na utilização do microscópio confocal. Sem isso não atingiríamos nossos resultados.

Ao Laboratório de Bacteriologia II pelo apoio e ensinamentos que obtive.

Ao Instituto Butantan e à Secretaria Estadual de Saúde pela oportunidade de realizar essa especialização.

Aos amigos do Instituto Butantan, principalmente a Clarissa e Janaína pelos agradáveis cafés da manhã que tivemos e por aguentarem todas as minhas reclamações.

À minha mãe, pai e irmã, pois sem o apoio deles jamais teria chegado até aqui.

Aos amigos que mesmo não estando presente sempre me apoiaram e acreditaram em meu potencial, principalmente à Bianca, ao Andrews e ao Rodrigo, pessoas importantíssimas nesse período.

Este trabalho teve apoio financeiro da FAPESP, processo 2017/20903-6.

"Precisamos especialmente de imaginação nas ciências. Nem tudo é matemática e nem tudo é lógica simples, é também um pouco de beleza e poesia"

Maria Montessori

RESUMO

CAMPOS, Camila. **Estudos alternativos: redução do uso de animais para manutenção e análises da virulência de *Leptospira* usando cultura celular tridimensional (3D)**. 2020. 31 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2020.

A leptospirose é uma doença causada por bactérias do gênero *Leptospira* e ocorre principalmente em países da zona tropical, afetando todos os mamíferos além de aves, anfíbios e répteis. A contaminação ocorre através do contato direto da pele ou mucosas com água ou solos infectados com urina de animais portadores. Quando patogênicas, essas bactérias podem afetar diversos órgãos, causando doença crônica e aguda. Aproximadamente um milhão de casos, e sessenta mil mortes são registrados no mundo. No Brasil, os casos registrados em 2018 ultrapassaram três mil com letalidade próxima a 10%. Para se compreender melhor a patogenicidade e manutenção da virulência, diversos modelos animais, susceptíveis são utilizados, entre eles, hamsters, porquinhos da Índia e gerbils. O uso desses animais continua sendo fundamental nos estudos de leptospirose, porém, são testes dispendiosos e de difícil manutenção. Com o intuito de diminuir a utilização de animais, estabelecemos um novo modelo que contribua na manutenção e nos estudos de virulência de *Leptospira*. Para isso, foi proposto o modelo celular tridimensional por se aproximar do padrão *in vivo* e auxiliar nos estudos de interação patógeno – hospedeiro. O modelo foi estabelecido com células epiteliais de pulmão humano, linhagem A549, cultivadas em meio DMEM, Matrigel® e Ágar e infectadas com dois tipos de sorovares: *L. interrogans* sv. Canicola e sv. Copenhageni. As células foram infectadas em diferentes concentrações (10^2 , 10^4 e 10^6). As culturas foram analisadas após 2, 24, 48, 72 horas e 5 dias. As células foram fixadas em paraformaldeído 4% e em seguida efetuadas as imunohistoquímicas, utilizando IgG conjugado a FITC, DAPI e azul de Evans, seguida de análises em microscopia confocal. Nossos resultados mostraram que a concentração inicial de bactérias é um parâmetro crucial para a infecção. Além disso, os dois sorovares apresentaram comportamento de invasão de maneira oposta nos períodos iniciais. Observamos Copenhageni dentro das células em poucas horas, diferentemente do sorovar

Canícula, onde foi visualizado um maior número de bactérias dentro das células nos períodos mais tardios. Os testes utilizando Agar e matrigel mostraram-se promissores e podem ser um modelo alternativo e econômico para estudos da virulência de *Leptospira*. Estudos mais detalhados são necessários a fim de tornar a técnica um modelo padrão nos estudos de virulência desse patógeno em cultura tridimensional.

Palavras-chave: Modelos alternativos 3D. Leptospirose. Patogenicidade.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Controle x Infectada	19
Figura 2 - Comparativo cultivo 2D e 3D	20
Figura 3 - Análise da concentração inicial de bactérias	21
Figura 4 - Interação dos sorovares com as células	22
Figura 5 - Células infectadas com <i>Leptospira interrogans</i> sv Canicola	22
Figura 6 - Células infectadas com <i>L. interrogans</i> sv Copenhageni	23
Figura 7- Análise do desenvolvimento de células de pulmão (A549) em cultura 3D utilizando Agar ou matrigel após infecção com <i>L. interrogans</i> sv Copenhageni e Canicola	24
Figura 8 - Análise da internalização celular do Cultivo em Agar com e sem matrigel infectado com sorovar Copenhageni e Canicola	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral	16
2.2 Específicos	16
3 METODOLOGIA	16
3.1 Cultura de bactérias	16
3.2 Cultura de células monocamada e tridimensional em Matrigel	17
3.3 Cultura celular tridimensional em Ágar Noble.....	17
3.4 Imunohistoquímica e análises por microscopia confocal.....	18
4 RESULTADOS.....	18
4.1 Cultura tridimensional usando matrigel.....	18
4.2 Cultura tridimensional usando Agar	23
5 DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

Estima-se mundialmente a cada ano por volta de um milhão de casos de leptospirose com aproximadamente 60000 mortes (COSTA et al., 2015), atingindo cerca de 0.1 a 1/100.000 habitantes de países de clima temperado. Em países de clima tropical esse número aumenta para aproximadamente 10 a cada 100.000 pessoas. Por ser uma doença de difícil diagnóstico com sintomas parecidos com outras enfermidades endêmicas, o número de casos reportados é baixo. Em países como o Havaí, nota-se o dobro de ocorrências registradas em relação aos dados mundiais. No Gabão, mais de 15% das pessoas que moram em comunidades mais pobres são infectadas por *Leptospira* (WHO, 2010).

No Brasil, as regiões mais atingidas são a sul e sudeste, porém há registros em todo território chegando a uma letalidade média de 10% (SINAN, 2018). Em 2018, foi relatado um total de 3069 casos confirmados, onde 279 foram a óbito (SINAN, 2019). Homens com faixa etária entre 20 e 49 anos estão entre os mais atingidos, porém não há predisposição para a doença relacionada ao sexo e idade. Contudo, em relação à localidade, a maioria ocorre em áreas urbanas e ambientes domiciliares. Apesar de endêmica, em períodos chuvosos, torna-se epidêmica, principalmente nas capitais e regiões metropolitanas devido às enchentes, baixa condição de saneamento básico e alto número de roedores infectados presentes, sendo as populações de baixa renda as mais atingidas (SINAN, 2018).

A leptospirose é uma doença causada pelo gênero *Leptospira*, espiroquetas, encontradas em água e solo úmido. São bactérias finas, com formato helicoidal, móveis com aproximadamente 15µm de diâmetro e comprimento entre 10 a 20µm (PICARDEAU, 2017). Assemelham-se a bactérias Gram negativas, apresentam parede celular da membrana interna intimamente ligada ao peptidoglicano, sendo coberta por uma membrana externa que possui lipoproteínas e lipopolissacarídeos expostos à superfície (HAAKE; MATSUNAGA, 2010). Diferentemente de outras bactérias, sua motilidade em espiral permite melhor movimentação em ambientes mais viscosos como tecidos conectivos (CHARON et al., 1992).

As espécies de *Leptospira* são classificadas em diferentes sorovares, com aproximadamente 200 sorovares patogênicos definidos pela aglutinação após absorção cruzada de antissoro com antígeno heterólogo (KMETY; DIKKEN, 1993). Outra técnica utilizada nessa classificação é a hibridização DNA-DNA e análise

filogenética do rRNA 16S, dividindo esse gênero em 3 grandes grupos (saprófitas, patogênicas e intermediárias) com 22 espécies descritas. Contudo, novas técnicas de sequenciamento podem auxiliar a decifrar as bases genéticas da diversidade antigênica de LPS, permitindo o desenvolvimento de novos métodos moleculares na identificação de sorovares (PICARDEAU, 2017).

A identificação de sorovares é de extrema importância nos estudos epidemiológicos. No Brasil, os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni estão relacionados aos casos mais severos em humanos (BRASIL, 2019). Em Salvador aproximadamente 90% dos casos diagnosticados no ano de 1996 foram infectados com o sorovar Copenhageni (KO et al., 1999). Outro estudo realizado em São Paulo, durante o período de 1986 a 1989, mostrou que quase 80% das amostras avaliadas foram infectadas pelo sorovar Copenhageni e mais de 11% com o sorovar Canicola (SAKATA et al., 1992). O sorovar Canicola além da importância por infectar humanos, é também frequentemente relatado em infecções em cães, que por sua vez servem como fonte de disseminação para o ambiente (MORIKAWA et al., 2015).

A exposição ao patógeno pode ocorrer por contato direto ou indireto. A transmissão direta se dá através da urina, sangue ou tecidos de animais infectados (STENERODEN; HILL; SALMAN, 2011). Na indireta, a contaminação ocorre através da água e solo contaminados, sendo essa a forma mais comum de transmissão (LEVETT, 2001). Leptospiras podem entrar através de ferimentos ou abrasões na pele ou membranas mucosas da cavidade oral ou conjuntiva. Estudos mostram que a mucosa oral é uma porta de entrada importante devido ao fato de pessoas engolirem água contaminada durante atividades recreativas (CORWIN et al., 1990; LINGAPPA et al., 2004; STERN et al., 2010). As formas patogênicas percorrem a corrente sanguínea e permanecem no sangue durante a fase precoce da doença (ARBER, 1977), em poucas horas atingem pulmão, fígado e rim, principais órgãos afetados na leptospirose. Os principais sintomas da doença são febre, dor de cabeça e dor pelo corpo, principalmente panturrilha, podendo ocorrer vômitos, diarreia e tosse. Em casos mais graves ocorre icterícia, sangramento e alterações urinárias (SINAN, 2018).

Nos casos mais graves de leptospirose, Síndrome Hemorrágica do Pulmão e doença de Weil ocorre em média 70% e 10% das mortes, respectivamente. O desenvolvimento da doença depende de condições epidemiológicas, suscetibilidade do hospedeiro e virulência do patógeno (HAAKE; LEVETT, 2015). A Síndrome

Hemorrágica do Pulmão tem como causa sangramento e lesão pulmonar aguda, já a doença de Weil está geralmente associada ao quadro de icterícia (SINAN, 2018).

Animais como camundongos e ratos são hospedeiros assintomáticos e são utilizados em estudos de colonização do rim (GOMES-SOLECKI; SANTECCHIA; WERTS, 2017). Entretanto camundongos jovens da linhagem C3H/HeJ, deficientes do receptor Toll-Like 4, são mais susceptíveis, servindo como um bom modelo nos estudos da doença (VIRIYAKOSOL et al., 2006; DA SILVA et al., 2012; RICHER et al., 2015). Por serem mais propensos à essa patologia, hamsters, porquinhos da índia e gerbils são os modelos mais utilizados nos estudos de leptospirose aguda, principalmente na manutenção da virulência da bactéria (GOMES-SOLECKI; SANTECCHIA; WERTS, 2017).

A manutenção da virulência é realizada através da inoculação da bactéria na região intraperitoneal, sendo os hamsters amplamente utilizados como modelo e em geral desenvolvem a fase aguda da doença em torno de 5 dias (GIUDICESSI, JOHN R.; ACKERMAN, 2008). Neste período, as bactérias são isoladas do rim, pulmão e fígado, em meio de cultura apropriado. O gênero *Leptospira* são microrganismos de difícil crescimento e perdem facilmente a virulência após poucas passagens *in vitro*. A virulência pode ser restaurada antes da perda total após inoculação em animais susceptíveis (FAINE, 1994).

Com o intuito de diminuir o uso de animais na manutenção da virulência buscamos um modelo que se aproximasse melhor das condições *in vivo*. Para isso, foi escolhido o modelo celular tridimensional (3D). A cultura celular em monocamada (2D) já é amplamente utilizadas em diversos estudos, porém pesquisas mais recentes tem utilizado a cultura 3D para estudos com outros patógenos (DUVAL et al., 2017).

O cultivo de células 2D favoreceu o entendimento da fisiologia celular e sobre como as células funcionam e respondem a estímulos (CUKIERMAN et al., 2001). Apesar disso, no cultivo em monocamada, componentes da matriz extracelular, interações célula-célula e célula-matriz, importantes para diferenciação, proliferação e funções celulares *in vivo*, são perdidas nos cultivos em monocamadas (MAZZOLENI; DI LORENZO; STEIMBERG, 2009).

Diversos estudos realizados com cultivo celular 3D mostraram novos horizontes nos estudos dos mecanismos de tumorigênese, representando um componente importante em estudos sobre câncer (MUTHUSWAMY, 2011). Além

desses estudos, o modelo celular tridimensional também vem sendo utilizado em pesquisas sobre a interação patógeno – hospedeiro. Esse modelo possui um grande potencial em conciliar descobertas nos estudos com células e modelos animais relacionados a investigação dessa interação, além da progressão de doenças humanas, desenvolvimento de novas drogas e terapias (BARRILA et al., 2010). Dessa forma, o modelo de cultura celular 3D pode nos auxiliar a compreender melhor a interação entre a *Leptospira* e seus hospedeiros, principalmente fatores relacionados à virulência do patógeno.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estabelecer um modelo alternativo com a finalidade de reduzir o número de animais utilizados na manutenção e estudos de virulência de *Leptospira sp.*

2.2 Específicos

Analisar a interação de diferentes sorovares patogênicos de *Leptospira* com as células em cultura tridimensional.

Analisar os diferentes períodos e quando ocorre maior internalização das bactérias pelas células.

Avaliar o uso de novas técnicas de cultivo celular tridimensional, reduzindo custos, a fim de viabilizar os estudos de virulência de *Leptospira*.

3 METODOLOGIA

3.1 Cultura de bactérias

Nesse estudo foram utilizadas cepas patogênicas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (cepa ATCC® BAA-1198™) e *L. interrogans* sorovar Canicola (cepa LO4), cedida gentilmente pelo Professor Silvio Vasconcellos do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Universidade de São Paulo. Ambas as cepas foram mantidas em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), suplementado com BSA para ambos

sorovares, e adição de peptona e extrato de carne apenas para o cultivo do sorovar Canicola. As culturas foram mantidas a temperatura de 30°C em condições aeróbias. Após 4 dias de crescimento, as bactérias foram contadas em câmara de Petroff-Hausser e utilizadas na infecção de células de pulmão A549, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ

3.2 Cultura de células monocamada e tridimensional em Matrigel

Células de pulmão A549 foram cultivadas em meio DMEM High glicose (LCG Biotecnologia) por duas semanas em garrafa T-75, com troca do meio a cada dois dias. Após o crescimento, as células foram contadas em câmara de Neubauer, e 100µl, contendo $2,6 \times 10^4$ de células por poço foram semeadas em câmaras de quatro poços (Corning® BioCoat™ Culture Slides). O cultivo tridimensional foi colocado sobre uma fina camada de Matrigel®. Após aproximadamente 30 min em estufa à 37°C e 5% CO₂ foi adicionado a cada poço 200 µL de uma mistura de DMEM 2,5% soro fetal bovino (SFB) e matrigel a 10%, além dos 100 µL contendo as células. Paralelamente foi efetuado o cultivo em monocamada, sendo que neste as células foram colocadas diretamente nos poços com adição de 200 µL de meio DMEM 2,5% SFB. Após 5 dias de crescimento, as lâminas contendo as células foram divididas em dois grupos: infectadas e controle. A cultura em monocamada foi coletada após 2 horas e 5 dias de infecção. A cultura tridimensional foi coletada após os períodos de 2, 24, 48, 72 horas e 5 dias. Previamente a coleta, as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas em paraformaldeído 4% por 30 min a temperatura ambiente, lavadas e mantidas em geladeira por no máximo 4 dias, e efetuados os procedimentos de imunohistoquímica.

3.3 Cultura celular tridimensional em Ágar Noble

Além do matrigel, foi realizada a cultura em Ágar Noble (BD Difco™). As células foram depositadas sobre uma camada estéril de Ágar 0,5%. As lâminas também foram divididas em 2 grupos: controle e infectadas. Nesse experimento, em metade dos poços das lâminas foi colocada a mistura de meio DMEM 2,5% SFB e matrigel 10% e a outra metade apenas o meio DMEM 2,5% SFB. Após 5 dias de crescimento as células infectadas e controles foram lavadas com PBS e fixadas em paraformaldeído 4% por 30 min em temperatura ambiente.

3.4 Imunohistoquímica e análises por microscopia confocal

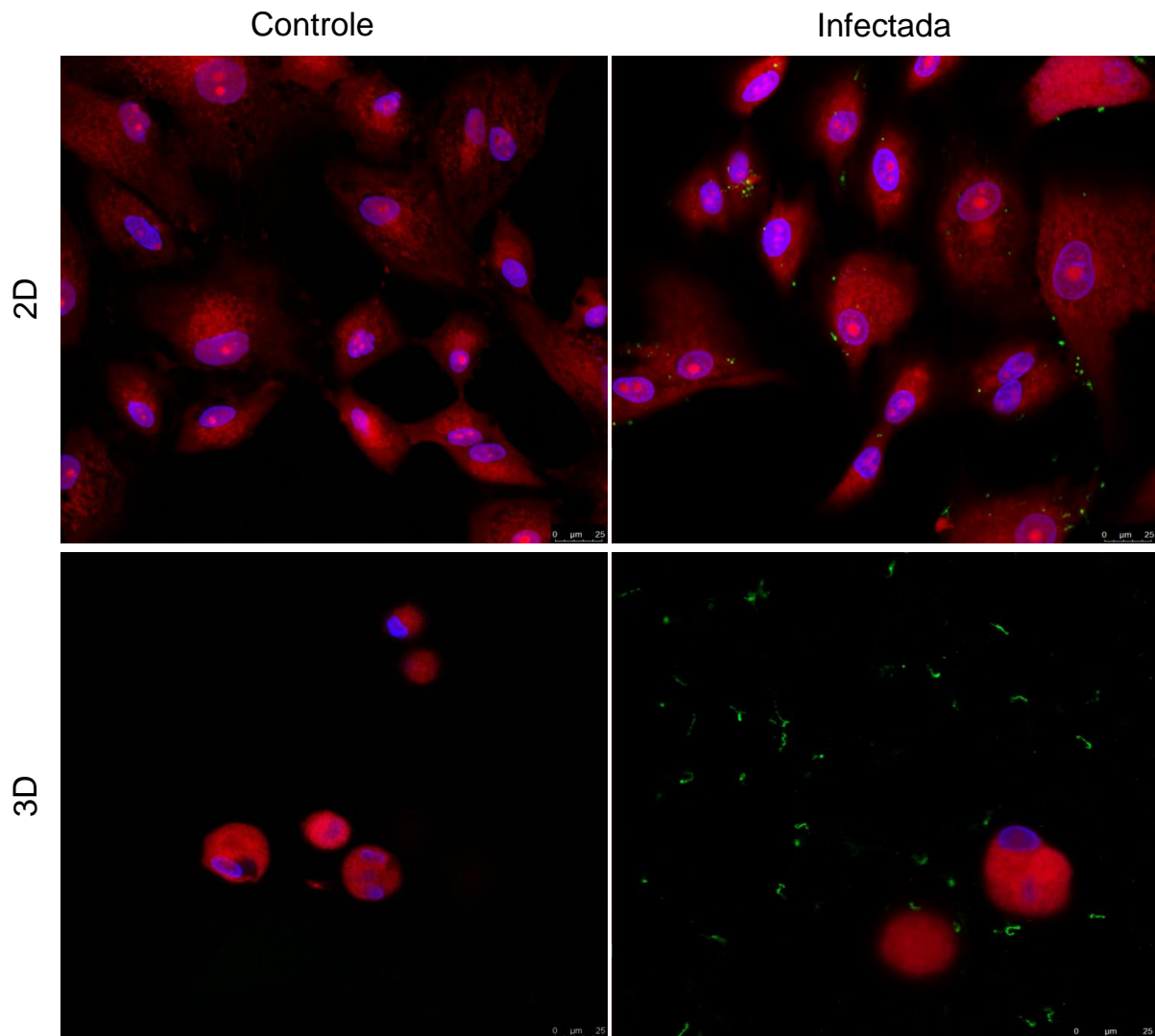
As células fixadas foram permeabilizadas com 0,3% Triton X-100, facilitando a marcação pelos anticorpos no interior das células. O anticorpo primário utilizado foi anti-Canícola e anti-Copenhageni produzidos em coelho, gentilmente cedido pelo Prof. Silvio Vasconcellos (Universidade de São Paulo). O anticorpo secundário utilizado para a marcação de *Leptospira* foi anti-rabbit conjugado a FITC (Alexa flúor 488-goat Anti-Rabbit IgG (H + L) Life Technology). O citoplasma celular foi corado utilizando Azul de EVAN (Sigma) e o núcleo foi corado com DAPI. Foi usado o VectaShield (Fermentas Life Sciences) para preservação dos fluoróforos. As lâminas foram observadas em microscópio confocal (Leica TCS SP8 - Germany).

4 RESULTADOS

4.1 Cultura tridimensional usando matrigel

Os nossos resultados demonstraram que o cultivo de *Leptospira* em cultura tridimensional é uma técnica promissora para uso nos estudos de virulência e manutenção da bactéria. O crescimento dos diferentes sorovares foi observado tanto no modelo em monocamada quanto no modelo 3D, conforme representado na figura 1.

Figura 1 - Controle x Infectada

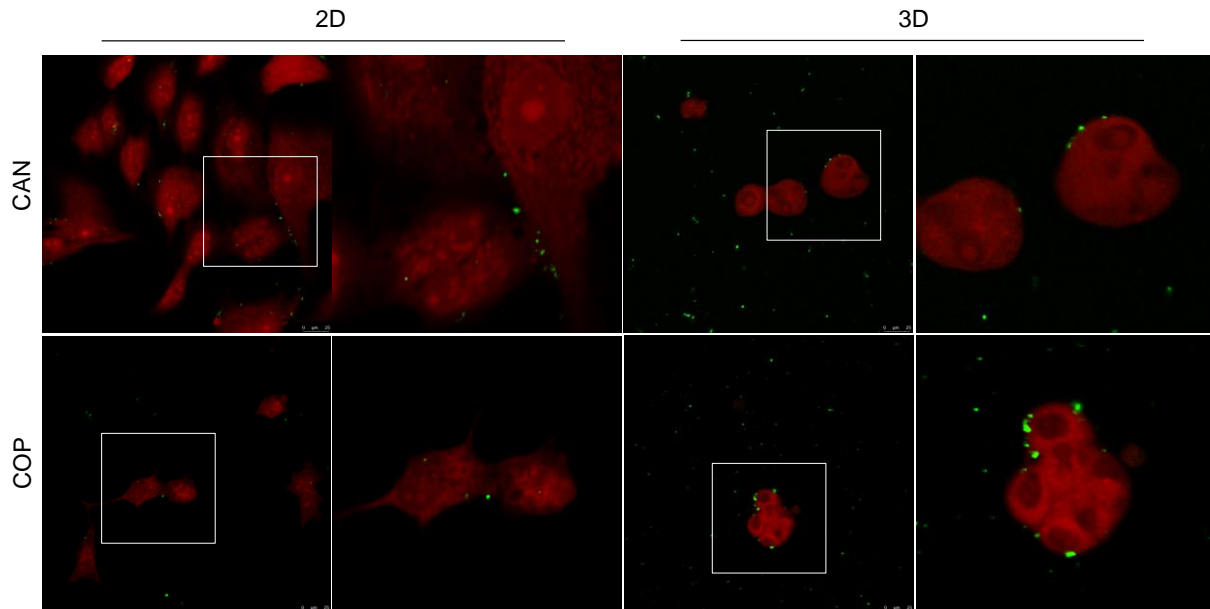


Fonte: Próprio autor

Comparação entre células controle e infectadas com o sorovar Canicola. As células foram coradas com FITC (bactérias), DAPI (núcleo) e Azul de Evans (citoplasma).

Quando comparamos o modelo 2D com o 3D, nota-se uma quantidade maior de bactérias ligadas na superfície ou dentro das células no modelo monocamada quando comparado com o modelo tridimensional nos períodos mais tardios (Figura 2).

Figura 2 - Comparativo cultivo 2D e 3D

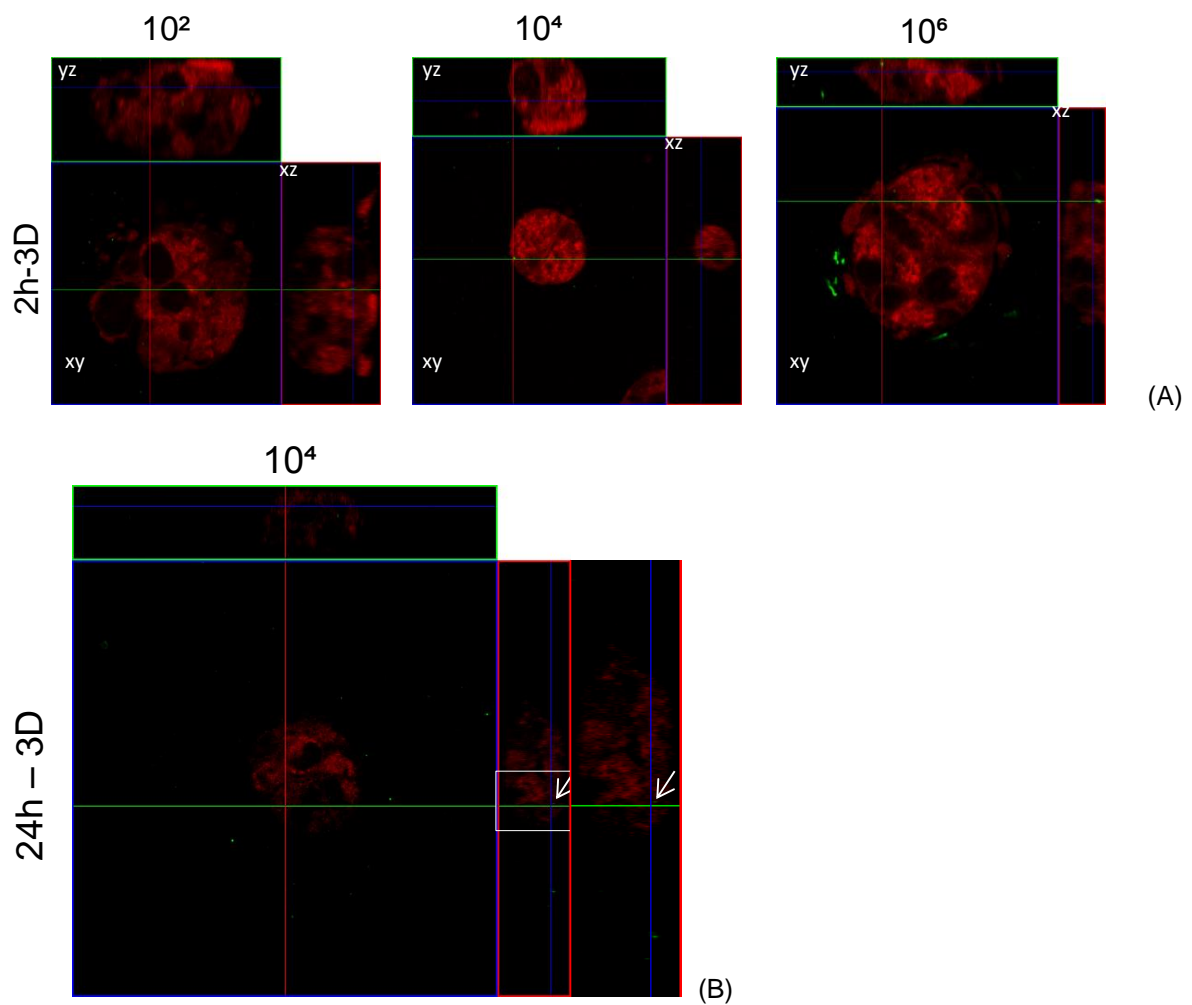


Fonte: Próprio autor

Comparativo entre a quantidade de *L. interrogans* sv Canicola (CAN) e *L. interrogans* sv Copenhageni (COP) ligadas as células no cultivo monocamada (2D) e tridimensional (3D).

Resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo para determinação da melhor concentração de bactérias demonstraram que as leptospiros são melhores detectadas por volta de 10^6 bactérias/poço. Notou-se que após 24 horas as concentrações abaixo de 10^6 são de difícil visualização (Figura 3).

Figura 3 - Análise da concentração inicial de bactérias

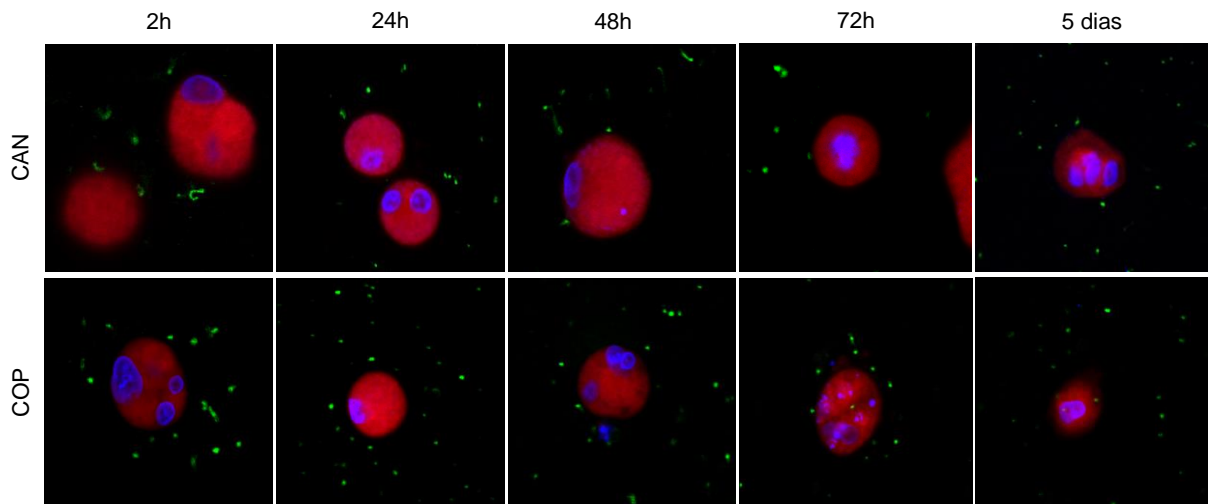


Fonte: Josefa Bezerra da Silva (não publicado)

Cultura 3D – (A) Células A549 infectadas com *L. interrogans* sv Copenhageni. É possível detectar bactérias internalizadas nos esferóides 2 horas após a infecção. (B) Em concentrações menores não foi possível identificar bactérias 24 horas após a infecção.

Com a concentração de bactérias estabelecidas, avaliamos como se daria a interação e internalização das bactérias nos esferóides durante os cinco períodos. Quando analisamos a relação das bactérias com as células, nota-se uma maior quantidade do sorovar Copenhageni (COP) na periferia dos esferóides quando comparado com Canicola (CAN) (Figura 4).

Figura 4 - Interação dos sorovares com as células

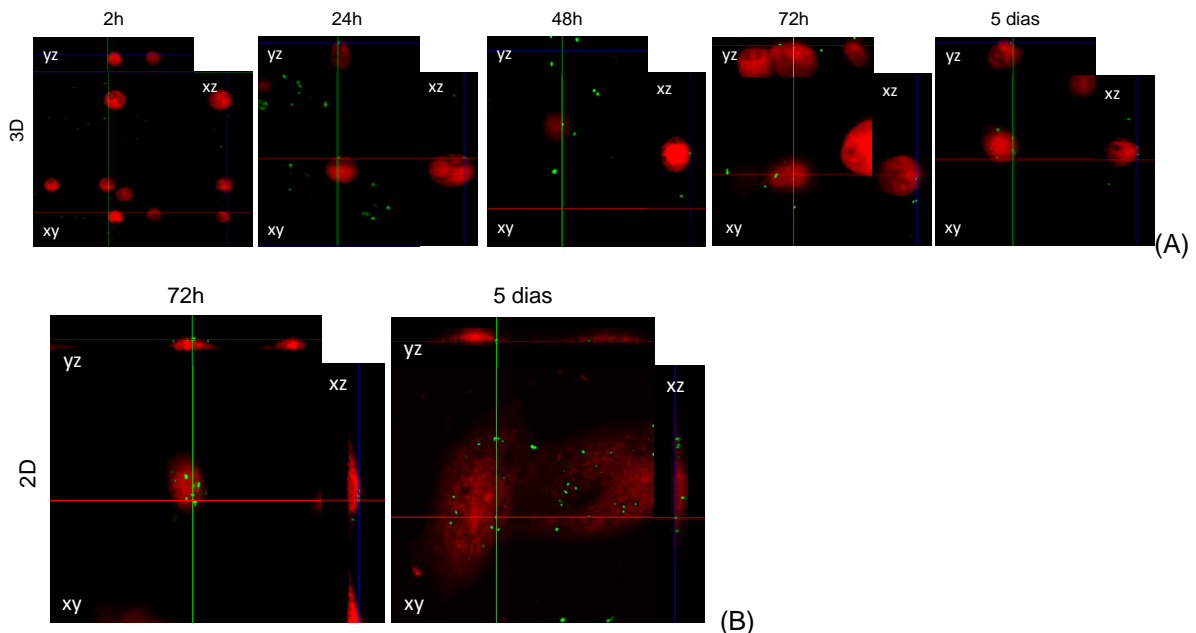


Fonte: Próprio autor

Interação entre os sorovares de *Leptospira*. O sorovar Copenhageni (COP) parece ter maior tropismo com as células quando comparado com o sv Canicola (CAN).

Em relação ao sorovar Canicola (CAN), a internalização ocorre em períodos mais tardios (Figura 5). Enquanto o sorovar Copenhageni (COP) se estabelece dentro das células em poucas horas após a infecção (Figura 6).

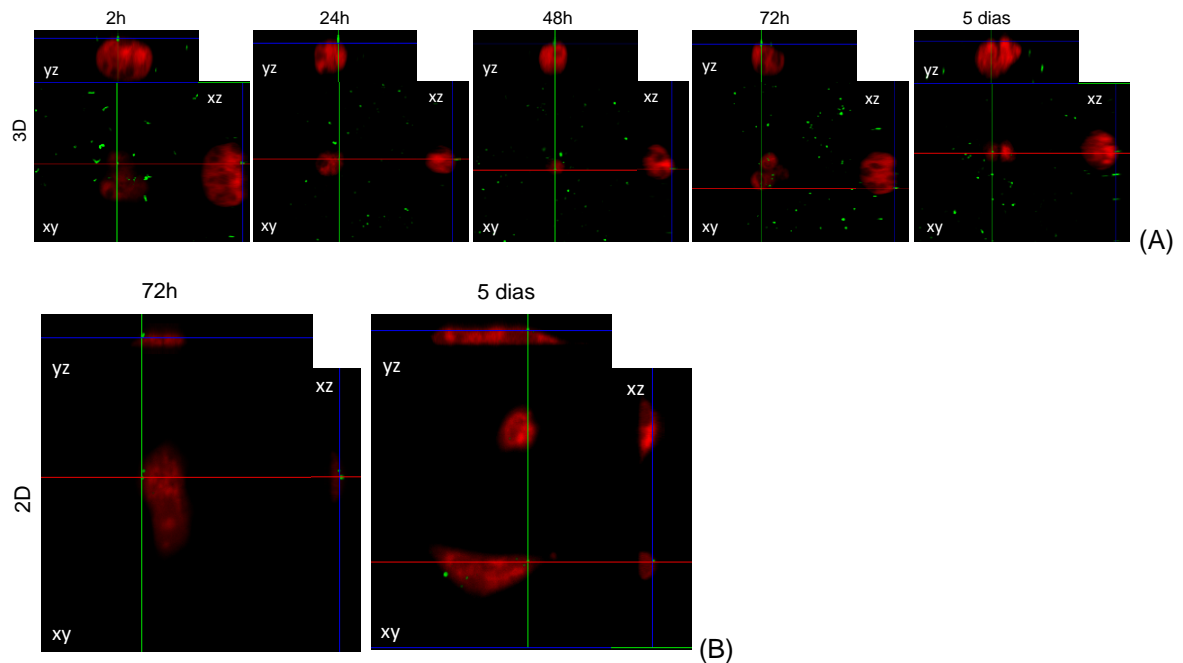
Figura 5 - Células infectadas com *L. interrogans* sv Canicola



Fonte: Próprio autor

(A) Cultura 3D – Imagens ortogonais de células A549 infectadas com *L. interrogans* sv Canicola (10^6 bactérias). É possível visualizar a bactéria infectando as células nos diferentes períodos. A maior internalização da bactéria ocorre principalmente nos período mais tardios. (B) Cultura 2D - Imagens ortogonais de células A549 infectadas com *L. interrogans* sv Canicola (10^6 bactérias). É possível visualizar a bactéria infectando as células nos diferentes períodos.

Figura 6 - Células infectadas com *L. interrogans* sv *Copenhageni*



Fonte: Próprio autor

(A) Cultura 3D – Imagens ortogonais de células A549 infectadas com *L. interrogans* sv *Copenhageni* (10^6 bactérias). É possível visualizar a bactéria infectando as células nos diferentes períodos. Nota-se a infecção após 2 horas da inoculação. (B) Cultura 2D - Imagens ortogonais de células A549 infectadas com *L. interrogans* sv *Copenhageni* (10^6 bactérias). É possível visualizar a bactéria infectando as células nos diferentes períodos analisados.

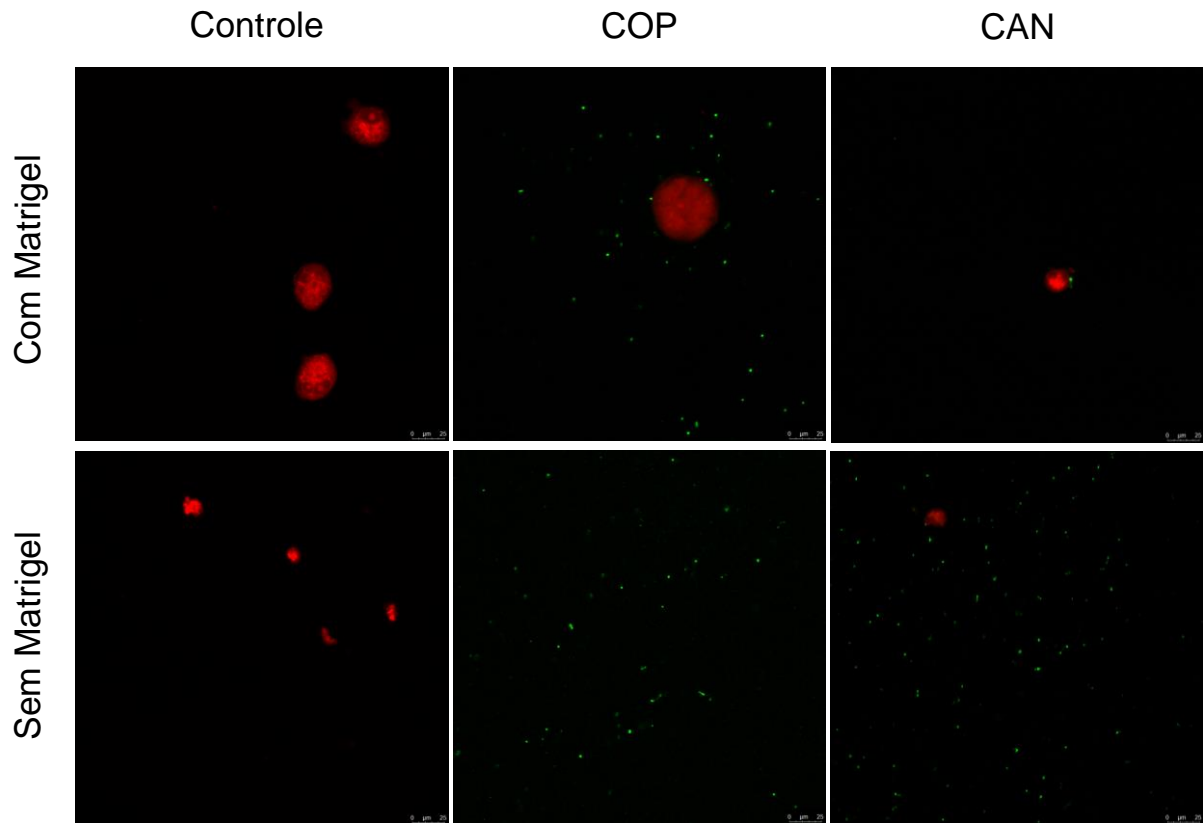
4.2 Cultura tridimensional usando Agar

Os resultados da cultura tridimensional mostrados anteriormente, foram realizados em matrigel, material que possui componentes que se aproximam da nossa matriz extracelular, porém seu custo é alto. Com o intuito de buscar alternativas mais econômicas, foi realizado um teste preliminar em Agar. Como esse material não possui componentes semelhantes aos do matrigel, foram analisadas lâminas com Agar na parte inferior. Na parte superior, após semear as células, (A549) foi efetuada dois testes: um contendo meio DMEM 2,5% SFB com 10% de matrigel e outro contendo só meio DMEM 2,5% SFB.

Os testes preliminares mostraram que quando utilizado o meio Agar com matrigel, o crescimento celular ocorre de maneira muito próxima aos já observados quando usando somente o matrigel, tanto no grupo controle como no infectado, independentemente do sorovar utilizado. Nos poços sem matrigel, o número de células visualizadas nas lâminas foi insatisfatório. No grupo controle, os esferóides se apresentaram com tamanho e formato bem diferente aos observados na cultura em que foi utilizado o matrigel. No grupo infectado, o número de células encontradas

foi muito baixo, chegando a zero no poço que continha o sorovar Copenhageni (Figura 7).

Figura 7- Análise do desenvolvimento de células de pulmão (A549) em cultura 3D utilizando Agar ou matrigel após infecção com *L. interrogans* sv Copenhageni e Canicola

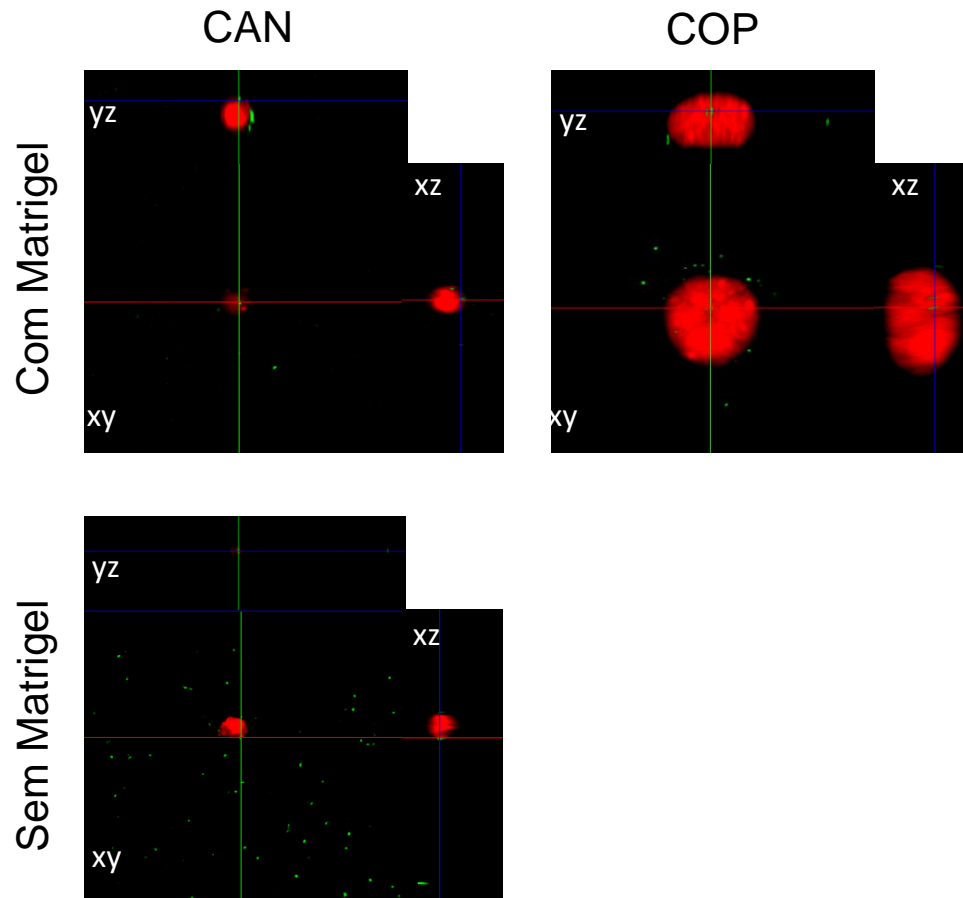


Fonte: Próprio autor

Comparação do cultivo em Agar com e sem matrigel no desenvolvimento de células de pulmão (A549) e após infecção com os sorovares Copenhageni (COP) e Canicola (CAN).

Em relação a internalização das bactérias nos esferóides, ela se deu da mesma forma que no matrigel. Foi possível detectar bactérias próximas, ligadas ou dentro dessas células (Figura 8). Apesar dos esferóides não terem sobrevivido nos poços sem matrigel, contendo apenas Agar, as leptospiras se mostraram persistentes neste material.

Figura 8 - Análise da internalização celular do Cultivo em Agar com e sem matrigel infectado com sorovar Copenhageni e Canicola



Fonte: Próprio autor

Imagem ortogonal mostrando a infecção dos diferentes sorovares na presença e ausência de matrigel.

5 DISCUSSÃO

A cultura celular em monocamada tem auxiliado na compreensão de diversos estudos relacionados a processos infecciosos, sistema imunológico do hospedeiro, mecanismos fisiológicos contra patógenos virais, fúngicos, parasitários e virulência bacteriana (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997; IMLER; HOFFMANN, 2001; HURLEY; MCCORMICK, 2003; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; KABELITZ; MEDZHITOV, 2007), porém não se aproxima das condições *in vivo* como a cultura tridimensional (CUKIERMAN et al., 2001).

Ao analisarmos os dois tipos de cultura podemos notar diferenças no perfil de bactérias presentes fora das células na cultura 3D em relação aos encontrados fora da célula na cultura 2D. Essa diferença possivelmente ocorre pela presença de

matrigel que possui componentes favoráveis a ligação das leptospiros ao reagente. Corroborando nossos resultados, estudos realizados com *Pseudomona aeruginosa*, mostraram maior quantidade da bactéria infectando células de pulmão quando cultivada em monocamada e comparada com a cultura tridimensional (CARTERSON et al. 2005).

Os resultados demonstraram que a concentração inicial do número de bactérias é um fator importante para o estabelecimento da infecção no modelo proposto, com difícil detecção nas baixas concentrações. A dificuldade na detecção pode estar relacionada ao fato de que o gênero *Leptospira* alberga bactérias extremamente fastidiosas, além de períodos prolongados para adaptação e multiplicação, dificultando a sobrevivência desse patógeno em concentrações mais baixas no estudo *in vitro*. Além disso, os fatores de defesa da célula hospedeira também contribuem para a eliminação da bactéria quando em concentrações mais baixas. Como apontado na literatura, o local da infecção e dose de bactérias é fundamental na letalidade do animal. Em hamsters, infectados com *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130 através da pele intacta, a letalidade ocorre em concentrações acima de 10^8 , mostrando que é uma barreira importante na infecção (GOSTIC et al., 2019).

Com o intuito de analisar essa interação, escolhemos dois sorovares, epidemiologicamente importantes, Copenhageni e Canicola. O sorovar Canicola, apesar de ocasionar a morte prematura em hamster, é internalizado pelos esferóides em períodos mais tardios, principalmente após 72 horas. Enquanto o sorovar Copenhageni já é internalizado pelas células em 2 horas, apesar de ser mais lenta ao causar a morte do animal. Isso nos mostrou que o sorovar Copenhageni talvez possua maior tropismo por esse tipo de célula.

Estudo realizado com o sorovar Icterohaemorrhagiae mostra que esse é internalizado por células Vero, 20 minutos após infecção, além disso, induz apoptose em macrófagos. Os autores concluem que a invasão de células epiteliais e a indução de apoptose em macrófagos pode estar relacionada à patogenicidade da *Leptospira* e pode contribuir com sua capacidade de sobreviver ao hospedeiro e a resposta imune (MERIEN; BARANTON; PEROLAT, 1997). Fato também relatado por Silva e colaboradores (2019).

A fim de estabelecer um modelo que se aproximasse das condições *in vivo*, utilizamos o matrigel, devido sua semelhança com a matriz extracelular, porém é um

material de custo alto. Assim, com o intuito de baratear o processo, testamos o Agar por ser um material de custo inferior, entretanto quando o mesmo foi utilizado juntamente com o meio DMEM, na ausência do matrigel, foi observado redução na taxa de sobrevivência das células epiteliais de pulmão (A549). Quando utilizado o meio celular com 10% de matrigel, obtivemos um resultado positivo em relação a sobrevivência das células e internalização das bactérias, aproximando-se ao observado quando utilizado o matrigel na camada inferior das lâminas.

Em acordo com os nossos resultados, Gao e colaboradores (2018), demonstraram que é possível estabelecer o cultivo celular 3D em Agar quando comparado com outros métodos já utilizados como o matrigel. Comprovando que os componentes utilizados para o crescimento celular nesse tipo de cultivo são importante, possibilitando assim a sobrevivência das células, mas que também podem ser usados como modelos alternativos similares e mais econômicos.

6 CONCLUSÕES

Nossos resultados preliminares revelam que o cultivo 3D pode ser um modelo promissor para manutenção e estudos de virulência de *Leptospira* devido sua proximidade com o modelo in vivo. Em relação à internalização das bactérias, observamos que seu aumento é gradual durante os períodos analisados, entretanto o sorovar Copenhageni parece ter um maior tropismo pelas células, sendo internalizadas nos períodos iniciais.

Já no cultivo em Agar, observamos que quando efetuado em condições adequadas (utilizando matrigel), os resultados são próximos aos obtidos no cultivo padronizado, utilizando somente o matrigel, e assim podendo ser um modelo alternativo mais barato que os mais comumente utilizados.

Dessa forma, o modelo alternativo proposto, representa uma oportunidade de reduzir a utilização de animais na manutenção e nos estudos de virulência de *Leptospira*. Estudos mais detalhados são necessários a fim de utilizar esta técnica na manutenção da virulência desse patógeno.

REFERÊNCIAS¹

- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.
- ARBER, W. et al. Current Topics in Microbiology and Immunology. In: **Leptospira and Leptospirosis**. Clayton: Springer, 1977. p. 207–213.
- BARRILA, J. et al. Organotypic 3D cell culture models: Using the rotating wall vessel to study host-pathogen interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 791–801, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2423>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Leptospirose. In: **Guia de Vigilância em Saúde**: volume único. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf. Acesso em: 13 fev. 2020.
- CARTERSON, A. J. et al. A549 lung epithelial cells grown as three-dimensional aggregates: Alternative tissue culture model for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1129–1140, 2005.
- CHARON, N. W. et al. Spirochete chemotaxis, motility, and the structure of the spirochetal periplasmic flagella. **Research in Microbiology**, v. 143, n. 6, p. 597–603, 1992.
- CORWIN, A. et al. A waterborne outbreak of leptospirosis among United States military personnel in Okinawa, Japan. **International Journal of Epidemiology**, v. 19, n. 3, p. 743–748, set. 1990.
- COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 0–1, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>.
- CUKIERMAN, E. et al. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1708–1712, 23 nov. 2001.
- DA SILVA, J. B. et al. Induction of TNF- α and CXCL-2 mRNAs in different organs of mice infected with pathogenic *Leptospira*. **Microbial Pathogenesis**, v. 52, n. 4, p. 206–216, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2012.01.002>.
- DUVAL, K. et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 266–277, 2017.
- FAINE, S. **Leptospira and leptospirosis**. Boca Raton: CRC Press Inc., 1994.
- GIUDICESSI, JOHN R.; ACKERMAN, M. J. Hamster Model of Leptospirosis David. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

- GOMES-SOLECKI, M.; SANTECCHIA, I.; WERTS, C. Animal models of leptospirosis: Of mice and hamsters. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.
- GOSTIC, K. M. et al. Mechanistic dose-response modelling of animal challenge data shows that intact skin is a crucial barrier to leptospiral infection. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 374, n. 1782, 2019.
- HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 65–97, 2015.
- HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Leptospira: A spirochaete with a hybrid outer membrane. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 805–814, 2010.
- HURLEY, B. P.; MCCORMICK, B. A. Translating tissue culture results into animal models: The case of Salmonella typhimurium. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 562–569, 2003.
- IMLER, J. L.; HOFFMANN, J. A. Toll receptors in innate immunity. **Trends in Cell Biology**, v. 11, n. 7, p. 304–311, 1 jul. 2001.
- KABELITZ, D.; MEDZHITOV, R. Innate immunity - cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 1, p. 1–3, fev. 2007.
- KMETY, E.; DIKKEN, H. Arrangement of serogroups and serovars. In: **Classification of the species - Leptospira interrogans and history of its serovars**. Groningen: University Press Groningen, 1993. p. 7–8.
- KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 820–825, 4 set. 1999.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 1 abr. 2001. Disponível em: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>. Acesso em: 1 out. 2019.
- LINGAPPA, J. et al. HLA-DQ6 and ingestion of contaminated water: possible gene-environment interaction in an outbreak of Leptospirosis. **Genes and Immunity**, v. 5, p. 197–202, 2004. Disponível em: www.nature.com/gene. Acesso em: 1 out. 2019.
- MAZZOLENI, G.; DI LORENZO, D.; STEIMBERG, N. Modelling tissues in 3D: The next future of pharmaco-toxicology and food research? **Genes and Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 13–22, mar. 2009.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Innate immunity: Impact on the adaptive immune response. **Current Opinion in Immunology**, v. 9, n. 1, p. 4–9, 1997.
- MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic Leptospira interrogans are correlated with virulence. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 729–738, 1997.
- MORIKAWA, V. M. et al. Seroprevalence and seroincidence of Leptospira infection in dogs during a one-year period in an endemic urban area in Southern Brazil. **Revista**

da **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 50–55, 2015.

MUTHUSWAMY, S. K. 3D culture reveals a signaling network. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 1, p. 103–104, 27 jan. 2011.

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 297–307, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>.

RICHER, L. et al. Mouse model for sublethal *Leptospira interrogans* infection. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 12, p. 4693–4700, 2015.

SAKATA, E. E. et al. Sorovares de *Leptospira interrogans* isolados de casos de leptospirose humana em São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 3, p. 217–221, 1992.

SILVA, P. L. D. et al. Phagocytosis of *Leptospira* by leukocytes from mice with different susceptibility to leptospirosis and possible role of chemokines. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2019.

SINAN. - Sistema de Informação de Agravos de Notificação: Leptospirose. Brasília: Ministério da Saúde. DATASUS, 2018.

SINAN. - Sistema de Informação de Agravos de Notificação: Casos confirmados de Leptospirose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2019. Brasília: Ministério da Saúde. DATASUS, 2019.

STENERODEN, K. K.; HILL, A. E.; SALMAN, M. D. Zoonotic Disease Awareness in Animal Shelter Workers and Volunteers and the Effect of Training. **Zoonoses and Public Health**, v. 58, n. 7, p. 449–453, 2011.

STERN, E. J. et al. Outbreak of Leptospirosis among Adventure Race Participants in Florida, 2005. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 843–849, 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/50/6/843/418018>. Acesso em: 1 out. 2019.

VIRIYAKOSOL, S. et al. Toll-like receptor 4 protects against lethal *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection and contributes to in vivo control of leptospiral burden. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 887–895, fev. 2006.

WHO. Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group (LERG). 2010. Disponível em: <https://www.who.int/zoonoses/diseases/lerg/en/index2.html>. Acesso em: 1 out. 2019.