

AÇÃO DO DIAZEPAM® FRENTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Leptospira interrogans* SOROVAR POMONA EM HAMSTER (*Mesocricetus auratus*)

Helio Langoni¹
Víctor de Souza Monteiro Bastos¹
Vanessa Yuri de Lima²
Aristeu Vieira da Silva³
Rodrigo Costa da Silva¹

RESUMO

Os benzodiazepínicos, entre eles o diazepam, estão entre as drogas mais prescritas dentro da classe de psicotrópicos, e há evidências de seus efeitos imunossupressores. Este estudo teve como objetivo avaliar a ação imunossupressora deste fármaco na infecção leptospírica em hamsters. Foram utilizados 4 grupos de 10 animais, a saber: G1, tratado somente com 1 mL de meio de Fletcher e sacrificado após 86 horas; G2, inoculado com 1 mL de suspensão de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona em meio de Fletcher, contendo 10^6 microorganismos; G3, inoculado como o G2, e tratado com $1,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de diazepam no momento da inoculação, e G4, inoculado como G2, e tratado antes da inoculação com a mesma dose de diazepam durante 5 dias. Para o isolamento e quantificação de leptospiras a partir dos rins, as culturas foram realizadas em meio de Fletcher, nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 1:4, 1:16 e 1:64, respectivamente, em solução salina com antibiótico (SSA). Os animais do G2, G3 e G4 adoeceram e morreram em até 86 horas pós-inoculação (p.i.). Para a quantificação de leptospiras, nos animais do G2 obteve-se o seu isolamento até o 26º dia, sendo que nove animais (90%) foram positivos na diluição 1:64 e o restante na diluição 1:16. No G3 e G4 obteve-se o isolamento de leptospiras a partir do 18º dia p.i., sendo que estes resultados mantiveram-se por até 24 e 23 dias no G3 e G4, respectivamente. Quanto à recuperação das leptospiras no G2 o seu isolamento foi possível em 80% dos animais somente a partir do 26º dia p.i., enquanto que no G3 e G4 obteve-se em 40% e 20% deles, 24 e 23 dias p.i., respectivamente. Estes resultados mostram uma menor concentração de leptospiras nos grupos tratados com diazepam, bem como maior período de incubação “in vitro”. Não se notou diferença quanto ao período de incubação, entre os animais inoculados do G3 e G4. Portanto, o diazepam influenciou a resposta imune de hamsters infectados com *L. interrogans* sorovar Pomona, com baixa recuperação bacteriana nos rins, sugerindo outros mecanismos envolvidos na resposta imune não afetados pelo benzodiazepínico.

Palavras-chave: *Leptospira interrogans* sorovar Pomona, hamster, isolamento, diazepam®.

ACTION OF DIAZEPAM® FRONT TO EXPERIMENTAL INFECTION WITH *Leptospira interrogans* SOROVAR POMONA IN HAMSTER (*Mesocricetus auratus*)

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública.

² Faculdade de Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica, Campus de Toledo, PR, Brasil.

³ Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Campus de Feira de Santana, BA, Brasil.

* Autor correspondente: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Distrito de Rubião Júnior, s/n. 18618-970. Botucatu, SP. Brasil. Email: hlangoni@fmvz.unesp.br (H. Langoni)

ABSTRACT

Benzodiazepines, diazepam specifically, are the most indicated drugs from psychotropics, and there are evidences of its immunosuppressor effects. This study was aimed to evaluate the immunosuppression action of this drug in leptospiral infection in hamster. Four groups of 10 animals were used: G1, treated with 1 mL of Fletcher media and sacrificed after 86 hours; G2, inoculated with 1 mL *Leptospira interrogans* serovar Pomona suspension in Fletcher media, with 10^6 microorganisms; G3, inoculated as G2 and treated with 1.5 mg.Kg^{-1} of diazepam at the time of the inoculation, and G4, inoculated as G2 and treated before the inoculation with the same doses of diazepam during 5 days. For the isolation and quantification of leptospire from kidneys, the cultures were assayed in Fletcher media, in 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 1:4, 1:16 e 1:64 dilutions, respectively, in antibiotic saline solution (ASS). The animals from G2, G3 and G4 had been sick and dead until 86 hours post-inoculation (p.i.). For the quantification of leptospire in animals from G2, its isolation was identified until 26th day, but nine animals (90%) were positives in 1:64 dilution, and the others in 1:16 dilution. In G3 and G4 the isolation of leptospire was observed since 18th day p.i., but these results had been kept until 24 and 23 days in G3 and G4, respectively. The recovery of leptospire in G2 was possible in 80% animals only since the 26th day p.i., while in G3 and G4 it was observed in 40% and 20%, 24 and 23 days p.i., respectively. These results show lower leptospiral concentration in groups treated with diazepam, and higher “in vitro” incubation period. No difference in G3 and G4, based on the incubation period was observed. However, diazepam influenced the immune response of hamsters infected with *L. interrogans* serovar Pomona, with low bacterial recover in kidneys, suggesting other mechanisms involved in the immune response not affected by the benzodiazepines.

Keywords: *Leptospira interrogans* serovar Pomona, hamster, isolation, diazepam®.

ACCIÓN DEL DIAZEPAM® FRENTE A LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *Leptospira interrogans* SOROVAR POMONA EN HÁMSTER (*Mesocricetus auratus*)

RESUMEN

Los benzodiazepínicos, dentro ellos el diazepam, están entre las drogas más prescritas dentro de la clase de psicotrópicos, y hay evidencias de sus efectos inmunosupresores. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la acción inmunosupresora de este fármaco en la infección leptospírica en hámsteres. Fueron utilizados 4 grupos de 10 animales, a saber: G1, tratado solamente con 1 mL de medio de Fletcher y sacrificado después de 86 horas; G2, inoculado con 1 mL de suspensión de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona en medio de Fletcher, contiendo 10^6 microorganismos; G3, inoculado como el G2, y tratado con $1,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de diazepam en el momento de la inoculación, y G4, inoculado como G2, y tratado antes de la inoculación con la misma dosis de diazepam durante 5 días. Para el aislamiento y cuantificación de leptospiras a partir de los riñones, las culturas fueron realizadas en medio de Fletcher, en las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , y 1:4, 1:16, 1:64, respectivamente, en solución salina con antibiótico (SSA). Los animales del G2, G3 y G4 adolecieron y murieron en hasta 86 horas pos-inoculación (p.i.). Para la cuantificación de leptospiras en los animales de G2 fue obtenido su aislamiento hasta el 26 día, siendo que nueve animales (90%) fueron positivos en la dilución 1:64 y el resto en la dilución 1:16. En G3 y G4 fue obtenido el aislamiento de leptospiras desde el 18 día p.i., siendo que estos resultados fueron mantenidos por hasta 24 y 23 días en G3 y G4, respectivamente. Cuanto a la recuperación de leptospiras en G2, su

aislamiento fue posible en 80% de los animales solamente desde el 26° día p.i., en cuanto que en G3 y G4 fue obtenido en 40% y 20% de estos, 24 y 23 días p.i. de, respectivamente. Estos resultados muestran una menor concentración de leptospiras en los grupos tratados con diazepam, bien como mayor período de incubación “in vitro”. No fue notada diferencia cuanto al período de incubación entre los animales de G3 e G4. Por lo tanto, diazepam influenció la respuesta inmune de hámsteres infectados con *L. interrogans* sorovar Pomona, con baja recuperación bacteriana en los riñones, sugiriendo otros mecanismos envueltos en la respuesta inmune no afectados por el benzodiazepínico.

Palabras-clave: *Leptospira interrogans* sorovar Pomona, hámster, aislamiento, diazepam®.

INTRODUÇÃO

O Sistema Nervoso Central (SNC) e a competência imunológica interagem em duas direções, representando importante mecanismo homeostático do organismo. Estudos “in vitro” e “in vivo” tem reportado que estados emocionais, como estresse e ansiedade, assim como os benzodiazepínicos (1,2) apresentam marcante influência na imunidade de animais de laboratório.

Os benzodiazepínicos estão entre as drogas mais prescritas dentre os psicotrópicos no Brasil, EUA, Europa e, provavelmente, em todo o mundo (3,4). Dentre estes, o Diazepam® possui amplo emprego clínico como miorrelaxante, anticonvulsivante, ansiolítico e hipnótico. Atua ligando-se aos receptores GABA, presente no SNC, que integra o canal de cloreto. Há uma hiperpolarização dos neurônios, explicando os efeitos modulatórios dos benzodiazepínicos sobre esses receptores. Esse mecanismo, aliado a potencialização da ação do GABA, reduz os níveis de ansiedade, tensão muscular e convulsões (5-7).

O diazepam radioativo liga-se com alta afinidade a locais específicos do cérebro, com maior distribuição no córtex cerebral (8). Há receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR), descritos como sítios de ligação para o diazepam em ratos, com perfil farmacológico distante dos sítios associados aos receptores GABA centrais (9). A existência dos PBR foi detectada no timo, rins, fígado, coração e pulmões, além de linfócitos, macrófagos e outras células do sistema imune (2).

O tratamento de ratas prenhes com diazepam e outros benzodiazepínicos levou a depressão da resposta imune de filhotes (1,10). De acordo com Chang (11) o diazepam e o alprazolam, outro benzodiazepínico, diminuíram a formação de interleucina-2 e de seus receptores, concluindo que esta linfocina participa de forma direta, dos efeitos inibitórios dos benzodiazepínicos na proliferação induzida de linfócitos T e B.

Os PBR em linfócitos e macrófagos explicam os efeitos dos benzodiazepínicos na competência imunológica, pela interferência na produção e liberação de citocinas (12), que são células do sistema imune que tem inter-relação com células imunocompetentes. Ao se ligarem aos PBR, os benzodiazepínicos modificam a atividade metabólica e imunológica celular.

A leptospirose é uma antroponose negligenciada causada pela bactéria, espiroqueta, do gênero *Leptospira*, constituindo importante problema de saúde pública em países em desenvolvimento (13-15). As espécies de leptospiras colonizam uma proporção mundial significativa de roedores, tornando estes portadores renais desta bactéria (16) e, portanto, sendo uma infecção que compromete a vida dos hospedeiros acidentais, como o homem (17). O hamster (*Mesocricetus auratus*) é considerado como modelo biológico de escolha na infecção leptospírica (18). O sorovar Pomona é considerado o mais virulento (19).

Com relação à leptospirose, não foi encontrada a associação dessa doença ao diazepam, ou a outros benzodiazepínicos. Por outro lado, há relatos da utilização de imunomoduladores.

Alves et al. (18) estudaram a influência do BCG frente a infecção experimental em hamsters por *Leptospira interrogans* sorovar Pomona. Todos os animais tratados com BCG resistiram à infecção, ao contrário dos outros animais inoculados somente com o agente.

O efeito imunossupressor do diazepam foi verificado por Silva e Palermo-Neto (20), que observaram diminuição da migração de macrófagos e da fagocitose, como resultado da exposição pré e pós-natal de ratas a este fármaco. Em hamsters, Ugaz et al. (21) estudaram o efeito do tratamento pré-natal do diazepam na infecção por *Mycobacterium bovis*, utilizando diferentes doses de benzodiazepínicos em diferentes grupos de animais. Os hamsters expostos no período pré-natal a dose 1,5mg.Kg⁻¹ apresentaram maior perda de peso, maior mortalidade, maiores áreas de granulomas no fígado, pulmões e baço, entre outras alterações. Os animais expostos no período pré-natal a dose de 1,0mg.Kg⁻¹ apresentaram as mesmas alterações, entretanto, em grau menor. Considerando-se os aspectos apresentados, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do diazepam em hamsters inoculados com *L. interrogans* sorovar Pomona.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

Utilizou-se experimento inteiramente aleatorizado. Foram selecionados 40 hamsters (*Mesocricetus auratus*) com peso entre 60 a 80g. Estes animais foram sorteados para compor quatro grupos experimentais, como segue: G1 (controle), 10 animais não tratados e nem infectados, inoculados somente com meio de cultura EMJH estéril, observados por 30 dias; G2, 10 animais inoculados somente com *Leptospira interrogans* sorovar Pomona; G3, 10 animais inoculados com *L. interrogans* sorovar Pomona e tratados com diazepam (dose 1,5mg.Kg⁻¹) somente no momento da inoculação; G4, 10 animais inoculados com *L. interrogans* sorovar Pomona e tratados com diazepam (dose 1,5mg.Kg⁻¹), durante cinco dias, previamente a inoculação. A proposta foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu-SP/Brasil, protocolo n.64/2006-CEEA.

Antígeno

A amostra de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Sílvio de Arruda Vasconcelos, FMVZ, USP, foi mantida a partir da inoculação intraperitoneal em hamster e, posteriormente, em meio de cultura EMJH líquido e Fletcher para a produção de inóculo para a infecção dos animais. Foram inoculados dois hamsters com idade de 30 dias com 0,5mL de EMJH líquido contendo 10⁶ leptospiras, via intraperitoneal, que foram sacrificados no estado agônico da doença cinco dias pós-inoculação (p.i.). Os rins foram coletados assepticamente e macerados em gral com pistilo, em capela de fluxo laminar, inoculando-se 0,5mL em meio EMJH líquido, realizando-se repiques semanais, para manutenção da amostra.

Infecção dos animais

Previamente à inoculação dos animais, obtiveram-se amostras de soro por coleta de sangue via seio retro-orbital, com posterior centrifugação a 1600 x g por 15 minutos, que foram submetidas à prova de soroaglutinação microscópica (SAM), para pesquisa de anticorpos frente ao sorovar utilizado, bem como para outros sorovares.

Para infecção dos animais do Grupo 2 utilizou-se 1,0mL de EMJH, contendo $1,45 \times 10^6$ leptospiras via intraperitoneal (22). A viabilidade do inoculo foi confirmada pela observação em microscópio de campo-escuro, previamente a inoculação. Para o cálculo da concentração de leptospiras determinou-se o fator do microscópio (FM) e os fatores de trabalho (FT), pela fórmula apresentada na Figura 1.

$$FM = \frac{\text{área da lamínula} \times 100}{\text{área do campo}} = \frac{22 \times 22 \times 100}{6,6018} = 7331,2783$$

Figura 1. Cálculo do Fator do Microscópio para determinação do Fator de Trabalho. Botucatu-SP, 2011.

De acordo com o número de campos examinados, os resultados de FT (Tabela 1), foram obtidos pela razão de FM pelo número de campos examinados. O número de leptospiras.mL⁻¹ foi calculado multiplicando-se o valor de FT pela diluição da contagem e pelo número de bactérias contadas em 10μL. Para a contagem e posterior inoculação, a amostra foi mantida em EMJH. Em microscópio de campo-escuro examinou-se 10μL da suspensão bacteriana diluída a 10⁻⁵, contando-se cinco campos. O resultado obtido foi 99 leptospiras. Então, segundo a fórmula utilizada: $99 \times 10^5 \times 1466,2556 = 1,451593 \times 10^{10}$ bactérias.mL⁻¹.

Para atingir a concentração próxima a 10⁶ leptospiras.mL⁻¹ para a inoculação, 1mL da suspensão bacteriana contendo $1,45 \times 10^{10}$ leptospiras.mL⁻¹ foi diluída em 9mL de meio EMJH líquido. Após homogeneização, transferiu-se 1mL para outro tubo contendo 9mL de meio EMJH, e assim sucessivamente, até obtenção de $1,45 \times 10^6$ leptospiras.mL⁻¹.

Tabela 1. Resultados obtidos para Fator de Trabalho (FT) de acordo com o número de campos examinados ao microscópio. Botucatu-SP, 2011.

Número de campos examinados	Fator de Trabalho
5	1466,2556
10	733,1278
15	488,7519
20	366,5639
25	293,2511
30	244,3759

Observação dos animais e coleta de material

Os animais foram observados diariamente por um período de 30 dias, sendo anotadas em fichas protocolares as alterações clínicas observadas. Foram coletadas amostras de sangue do seio retro-orbital para obtenção de soro e detecção de anticorpos para *Leptospira* spp., previamente, e aos quatro, sete, 11, 14, 21 e 30 dias p.i. Após o período de observação, os animais foram sacrificados para retirada asséptica dos rins. A partir de 86 horas p.i., os animais começaram a apresentar sinais clínicos e, alguns deles vieram a óbito. Destes, retirou-se os rins em condições assépticas.

Sorologia

A prova de soroaglutinação microscópica (SAM) foi realizada segundo normas do Ministério da Saúde (23). Inicialmente procedeu-se a triagem das amostras a 1:100. As amostras reagentes foram tituladas procedendo-se diluições seriadas em razão 2.

Cultivo renal

Após retirada asséptica dos rins em capela de fluxo laminar, macerou-se um deles na proporção 1:10 (p/v) em solução salina de antibióticos (SSA) contendo neomicina (2mg.mL^{-1}) e nitrofurazona (50mg.mL^{-1}). Foram realizadas diluições seriadas nas concentrações 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , incubando-se em duplicata em meio de Fletcher a 28°C por 30 dias, observando-se o isolamento do agente, revelado pelo anel de opalescência (zona de Dinger), bem como pela visualização de leptospiros sob microscopia de campo-escuro.

Quantificação de Leptospiras spp. [adaptado de Zenner et al. (24)]

O outro rim foi pesado e macerado em gral com pistilo, adicionando-se 4mL de SSA. Foram realizadas diluições seriadas na razão 4 em SSA, inoculando-se $100\mu\text{L}$ de cada diluição em três tubos, contendo 5mL de meio Fletcher, incubando-se à 28°C por 30 dias, com avaliação do crescimento bacteriano, como anteriormente. O resultado final foi estabelecido como a última diluição em que se isolou o agente em pelo menos dois dos três tubos inoculados. A concentração de leptospiros por grama de rim foi calculada como segue: $Q = \text{recíproca do título no cultivo peso}^{-1}$. Para efeito de cálculo, a estimativa do número de leptospiros foi expressa como a média do $\log(Q) \pm \text{erro padrão}$.

Análise estatística

A comparação da concentração de leptospiros obtidas nos diferentes grupos foi realizada pela análise de variância seguida da comparação dos grupos pelo teste de Tukey. A mediana de sobrevivência dos animais em cada grupo foi comparada pelo teste de Kruskal-Wallis (25).

RESULTADOS

O G1 não apresentou alterações clínicas, sobrevivendo até o final do experimento. À necropsia, não mostraram alterações macroscópicas nos órgãos. Os do G2, G3 e G4 adoeceram, com prostração e morte no período de 86 horas p.i. Durante a maior parte do período de observação, não apresentaram sinais clínicos. Ao exame necroscópico, os animais dos três grupos apresentavam intensa icterícia nos órgãos da cavidade abdominal, sem outras alterações.

Sorologia

Os animais do G1 não reagiram a SAM (Figura 2). Os títulos de anticorpos dos animais do G2 estão apresentados na Tabela 2. Aos 7 dias p.i. um animal já apresentava título 100 à SAM. A partir do 11º dia p.i., todos apresentavam títulos variando de 100 a 400, sendo na maioria de até 6400. Os animais dos quatro grupos estavam negativos antes da inoculação.

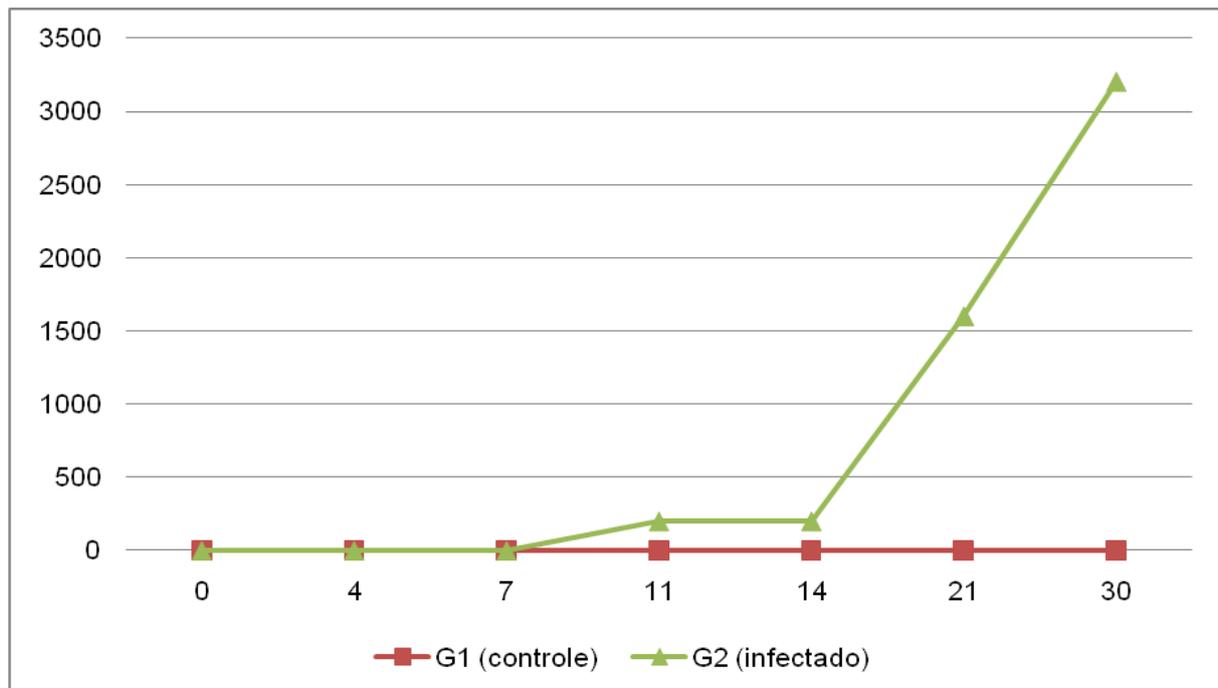


Figura 2. Mediana dos títulos sorológicos à SAM de hamsters inoculados com 1mL de meio EMJH líquido puro (G1) e suspensão de $1,45 \times 10^6$ leptospiras em meio EMJH líquido (G2), segundo o dia de colheita das amostras de sangue. Botucatu-SP, 2011.

Tabela 2. Título sorológico na SAM para *L. interrogans* sorovar Pomona em hamsters inoculados com suspensão de $1,45 \times 10^6$ leptospiras em meio EMJH líquido, segundo o dia de colheita das amostras de sangue. Botucatu-SP, 2011.

Animal	Dia da colheita de amostra de sangue						
	0	4	7	11	14	21	30
1	NR	NR	NR	100	400	1600	3200
2	NR	NR	NR	200	100	3200	6400
3	NR	NR	NR	200	100	1600	800
4	NR	NR	NR	200	200	1600	400
5	NR	NR	NR	200	800	1600	6400
6	NR	NR	NR	NR	400	400	6400
7	NR	NR	NR	200	200	1600	1600
8	NR	NR	NR	400	200	1600	3200
9	NR	NR	100	200	800	1600	6400
10	NR	NR	NR	200	200	400	1600
Mediana	0	0	0	200	200	1600	3200

Legenda: NR = não reagente

Cultivo renal

Nos animais do G2, G3 e G4 verificou-se maior número de culturas positivas no G2, em relação ao G3 e G4, cujos animais foram medicados com diazepam. Entre o G3 e G4 observou-se que, no tratamento com diazepam no momento da inoculação (G3), somente uma cultura foi positiva na diluição 10^{-3} em relação ao G4, que não mostrou positividade nesta diluição (Tabela 3). Considerando-se o tempo de crescimento bacteriano, observou-se menor período de incubação nos tubos de cultura dos animais do G2, em comparação com G3 e G4, cujo período variou entre 23 e 31 dias (Tabela 4).

Tabela 3. Resultado da cultura de rins dos animais do G2, G3 e G4 em meio Fletcher nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Botucatu-SP, 2011.

Animal	Diluições por grupos								
	G2			G3			G4		
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
1	-	+	-	+	+	+	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	-	+	+	-	+	-	-
4	+	+	+	-	-	-	+	-	-
5	+	-	-	+	-	-	-	+	-
6	-	-	-	-	-	-	+	+	-
7	+	+	-	+	-	-	-	-	-
8	+	+	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	+	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Legenda: G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; +: resultado positivo; -: resultado negativo

Quantificação de *Leptospira* spp.

O isolamento foi menor nas culturas dos animais do G2 e G4 em comparação com o G3 (Tabela 5). O tempo para o isolamento nas diluições 1:4, 1:16 e 1:64, nos animais do G3 e G4, foi variável em relação às culturas dos animais do G2. O período de incubação nas culturas de rim do G4 também foi maior em relação ao G3 (Tabela 6).

Tabela 4. Período mínimo (em dias) para a observação de crescimento nas culturas de rim de cada animal do G2, G3 e G4 nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Botucatu-SP, 2011.

Animal	Diluições por grupos								
	G2			G3			G4		
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
1	0	26	0	24	24	31	0	0	0
2	19	0	0	0	0	0	0	0	0
3	10	34	0	24	24	0	30	0	0
4	19	34	26	0	0	0	30	0	0
5	26	0	0	24	0	0	0	23	0
6	0	0	0	0	0	0	23	23	0
7	34	34	0	24	0	0	0	0	0
8	19	19	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	26	0	0	0	0	0	0
10	19	19	10	0	0	0	0	0	0
Mediana	19	22,5	0						

Legenda: G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; +: resultado positivo; -: resultado negativo

DISCUSSÃO

O hamster é o modelo biológico indicado para a infecção experimental na leptospirose (16,18,19,26,27). A via intraperitoneal é a mais indicada para a inoculação (28).

A doença aguda nos hamsters do G2, G3 e G4 foi confirmada pela recuperação bacteriana em cultura e pela sintomatologia clínica, como prostração e taquipnéia (29). A morte de animais em 86 horas é uma característica de infecção aguda (19,26). Um fator que deve ser considerado nas infecções experimentais é a virulência do agente infectante e, em

relação ao sorovar Pomona, a sua virulência foi avaliada previamente por Oliva et al. (19) e Nagy (26).

Tabela 5. Peso do rim, título sorológico final e quantificação de leptospiras (Q) nos grupos G2, G3 e G4. Botucatu-SP, 2011.

Animal	G2			G3			G4		
	Peso (g)	Título	Q	Peso (g)	Título	Q	Peso (g)	Título	Q
1	0,870	64	1,870	0,661	0	0,000	0,586	0	0,000
2	0,818	64	1,890	0,649	0	0,000	0,864	4	0,660
3	0,695	64	1,960	0,674	0	0,000	0,906	4	0,640
4	0,891	64	1,850	0,565	0	0,000	1,010	4	0,590
5	0,805	64	1,900	0,717	4	0,740	0,837	0	0,000
6	0,810	64	1,890	0,907	4	0,640	0,731	4	0,730
7	0,731	64	1,940	0,556	0	0,000	0,898	4	0,640
8	0,865	64	1,860	0,722	0	0,000	0,816	16	1,290
9	0,810	64	1,890	0,878	0	0,000	0,869	0	0,000
10	0,809	16	1,290	0,831	0	0,000	1,140	4	0,540
Média*	0,810	–	1,834±0,06 ^A	0,716	–	0,138±0,09 ^C	0,866	–	0,509±0,120 ^B
Mediana	0,810	64	1,890	0,696	0	0,000	0,867	4	

Tabela 6. Período mínimo (em dias) para observação do crescimento de leptospiras nas culturas de rim de animais do G2, G3 e G4. Botucatu-SP, 2011.

Animal	Tempo de isolamento (em dias)		
	G2	G3	G4
1	10	–	–
2	10	–	30
3	10	–	30
4	10	–	16
5	19	18	–
6	10	18	16
7	10	–	30
8	10	–	30
9	10	–	–
10	10	–	30
Mediana	10^A	18^{AB}	30^B

Estadística: KW = 13,193; $P < 0,0001$; valores medianos do número de dias para o isolamento seguidos de letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,01$)

O rim é um dos órgãos nos quais as leptospiras se alojam e os animais infectados podem se tornar portadores renais por períodos variáveis de tempo dependendo da espécie animal. Desta forma, o rim tem sido utilizado como um dos órgãos de eleição para a recuperação bacteriana na infecção leptospírica (30,31). A icterícia é um achado frequente tanto nos órgãos como cavidades, o que foi constatado na presente pesquisa e está de acordo com Camargo et al. (29). Nos hospedeiros acidentais, como o homem, a doença renal aguda é comum com nefrite intersticial aguda e necrose tubular (32).

A recuperação bacteriana em meio de Fletcher a partir do macerado renal foi obtida com êxito, principalmente no G2, o que está de acordo com Sitprija et al. (30) e Camargo et al. (29). A resposta sorológica nos animais deste grupo foi detectada a partir do 7º dia p.i., sendo crescente até o 30º dia p.i., alcançando títulos 6400. Cox e Twigg (33) verificaram que animais sacrificados com maior período de infecção apresentaram também títulos de anticorpos mais elevados, evidenciando-se que a resposta imune humoral é importante na infecção leptospírica (34).

L. interrogans se liga às células endoteliais e quebram a função de barreira endotelial, podendo promover a disseminação da bactéria e contribuir para as manifestações da doença severa. Esta quebra pode ser devido a ação de drogas protetoras do endotélio ao diminuir os danos na leptospirose (35). Quanto a resposta imune celular na leptospirose, Yamashiro-Kanashiro et al. (36) verificaram que no homem com leptospirose aguda ocorreu diminuição de linfócitos T-CD₃ e T-CD₄⁺, com aumento de linfócitos B, que não se diferenciavam. Merián et al. (37) relataram a localização intracelular de leptospiras virulentas, e correlacionaram este fato a redução da apoptose de macrófagos à patogenicidade do sorovar, e à contribuição para sua sobrevivência no hospedeiro com capacidade de escape da resposta imune. Associado a estes resultados, Toma et al. (38) observaram em camundongos que somente *L. interrogans*, não *L. biflexa*, rompem as células infectadas, ganhando o meio extracelular. Este fato sugere que as leptospiras patogênicas são capazes de sobreviver, replicar e sair dos macrófagos, se disseminando para os órgãos alvo. Porém, ao estudar a infectividade de duas cepas virulentas de *L. interrogans*, Li et al. (39) observaram que a virulência das leptospiras não está relacionada a morte do macrófago. Cepas com alta virulência induzem principalmente necrose em fibroblastos, enquanto que as de baixa virulência induzem mais apoptose.

Schlumpf et al. (12) observaram redução da produção de IL-1 e IL-2 em linhagens de ratos tratados com Diazepam durante a prenhes. Por outro lado, Schreiber et al. (40) verificaram diminuição de IL-6 em ratos tratados com diazepam no período pré-natal, e Massoco et al. (41) relataram diminuição da migração de macrófagos e fagocitose ao avaliar o seu efeito em camundongos da linhagem Balb/c, sugerindo diminuição da resposta imune celular pela ação do diazepam.

Marinho et al. (42) estudaram a resposta imune na infecção leptospírica e encontraram um perfil de resposta de células B com maior produção de anticorpos em camundongos de linhagem de alta produção de anticorpos, enquanto que nos de linhagem de baixa produção de anticorpos verificou-se um perfil T de resposta imunológica, com menor recuperação bacteriana em órgãos, pela intensa atividade de macrófagos no início da infecção.

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que o diazepam influenciou a resposta imune de hamsters infectados com *L. interrogans* sorovar Pomona, com baixa recuperação bacteriana nos rins, sugerindo outros mecanismos envolvidos na resposta imune, não afetados pelo benzodiazepínico, bem como de novos estudos com diferentes doses e períodos de aplicação deste fármaco.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

1. Schlumpf M, Parmar R, Ramseier HR, Lichtensteiger W. Prenatal diazepam induced immunosuppression: possible involvement of peripheral benzodiazepine site. *Dev Pharmacol Ther.* 1990;15:178-85.
2. Schlumpf M, Parmar R, Schreiber A, Ramseier HR, Bütikofer E, Abriel H. Nervous and immune systems as targets for developmental effects of benzodiazepines. A review of recent studies. *Dev Pharmacol Ther.* 1992;18:145-58.

3. Ruiz I, Offermans J, Lanctoc KI, Busto U. Comparative study on benzodiazepine use in Canada and Chile. *J Clin Pharmacol*. 1993;33:124-9.
4. Musshoff F, Stamer UM, Madea B. Pharmacogenetics and forensic toxicology. *Forensic Sci Int*. 2010;203:53-62.
5. Haefely W. Benzodiazepine receptor ligands: structural and functional differences. In: Hindmarch I, Beaumont G, Brandon S, Leonard BE, editors. *Benzodiazepines: current concepts*. Chichester: John Wiley and Sons Ltda; 1990. p.1-18.
6. Möhler H, Malherbe P, Draguhn A, Richards JG. GABA_A-receptors: structural requirements and sites of gene expression in Mammalian brain. *Neurochem Res*. 1990;15:199-207.
7. Talarek S, Listos J, Fidecka S. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on benzodiazepine withdrawal in mice and rats. *Pharmacol Rep*. 2011;63:680-9.
8. Young WS, Kuhar MJ. Radiohistochemical localization of benzodiazepine receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 1980;212:337-46.
9. Kozikowski AP, Ma D, Brewer J, Sun S, Costa E, Romeo E, et al. Chemistry, binding affinities, and behavioral properties of a new class of “antineophobic” mitochondrial DBI receptor complex (mDRC) ligands. *J Med Chem*. 1993;36:2908-20.
10. Schlumpf M, Ramseier HR, Lichtensteiger W. Prenatal diazepam induced persisting depression of cellular immune response. *Life Sci*. 1989;44:493-501.
11. Chang MP, Castle SC, Norman VC. Suppressive effects of alprazolam on the immune response of mice. *Int J Immunopharmacol*. 1991;13:259-66.
12. Schlumpf M, Lichtensteiger W, Ramseier H. Diazepam treatment of pregnant rats differentially affects interleukin-1 and interleukin-2 secretion in their offspring during different phases of postnatal development. *Pharmacol Toxicol*. 1993;73:335-40.
13. Acha PN, Szyfres B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3^a ed. Washington D.C.: Organización Panamericana de la Salud, Publicación Científica; 2003.
14. Adler B, Moctezuma AP. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*. 2010;140:287-96.
15. Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol*. 2011;73:408-19.
16. Cinco M. New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences. *New Microbiol*. 2010;33:283-92.
17. Nascimento A, Ko AI, Martins EAL, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol*. 2004;186:2164-72.

18. Alves CJ, Vasconcelos SA, Camargo CRA, Macedo NA, Morais ZM, Nürmberger Junior R, et al. Influência da estimulação inespecífica com o BCG sobre a suscetibilidade do hamster à infecção experimental por *Leptospira interrogans* serovar Pomona. Braz J Vet Res Anim Sci. 1992;29:193-9.
19. Oliva R, Infante JF, Perez V, Pérez V, Sifontes S, Marrero O, et al. Pathologic-clinical characterization of leptospirosis in a golden Syrian hamster model. Arch Med Res. 1994;25:165-70.
20. Silva FR, Palermo-Neto J. Developmental, neuro and immunotoxic effects of perinatal diazepam treatment in rats. Immunopharmacol Toxicol. 1999;21:247-65.
21. Ugaz EM, Pinheiro SR, Guerra JL, Parmo-Neto J. Effects of prenatal diazepam treatment on *Mycobacterium bovis*-infected infection in hamsters. Immunopharmacology. 1999;41:209-17.
22. Siddique JH, Shah SM. Evaluation of polyvalente leptospiral vaccine in hamsters. Indian Vet J. 1990;67:1006-10.
23. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Manual de leptospirose. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 1995.
24. Zenner L, Darcy F, Capron A, Cesbron-Delauw MF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. Exp Parasitol. 1998;90:86-94.
25. Triola MF. Introdução à estatística. 9ª ed. Rio de Janeiro: LTC; 2005.
26. Nagy G. Comparative pathogenicity study of *Leptospira interrogans* serovar Pomona strains. Acta Vet Hung. 1993;41:315-24.
27. Anderson JF, Miller PA, Post JE, Johnson RC, Magnarelli LA, Andreadis TG. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar Grippotyphosa from the skin of a dog. J Am Vet Med Assoc. 1993;203:1550-1.
28. Macedo NA, Morais ZM, Camargo CRA, Alves CJ, Azevedo SS, Nürmberger Jr R, et al. Influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e a evolução da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* serovar Pomona. Braz J Vet Res Anim Sci. 2004;41:194-200.
29. Camargo CRA, Vasconcellos SA, Nürmberger R Jr, Passos EC, Morais ZM, Visintin JA. Investigação sobre a presença de leptospiros nos ovários de hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo Pomona. Braz J Vet Res Anim Sci. 1993;30:129-35.
30. Sitprija V, Pipatanagul V, Mertowidjojo K, Boonpucknavig V, Boonpucknavig S. Pathogenesis of renal disease in leptospirosis: clinical and experimental studies. Kidney Int. 1980;17:827-36.
31. Ellis WA, O'Brien JJ, Neill SD, Ferguson HW, Hanna J. Bovine leptospirosis: microbiological and serological findings in aborted fetuses. Vet Rec. 1982;110:147-50.

32. Daher EF, Abreu KL, Silva Jr GB. Leptospirosis-associated acute kidney injury. *J Bras Nefrol.* 2010;32:400-7.
33. Cox PJ, Twigg GI. Observations on kidney damage in hamsters following a non-icterohaemorrhagic form of disease resulting from infection by *Leptospira interrogans* serotype Icterohaemorrhagiae. *J Comp Pathol.* 1981;91:153-7.
34. Mitchison M, Bulach DM, Vinh T, Rajakumar K, Faine S, Adleret B. Identification and characterization of the dTDP-rhaminose biosynthesis and transfer genes of the lipopolysaccharide related *rfb locus* in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *J Bacteriol.* 1997;179:1262-7.
35. Martinez-Lopez DG, Fahey M, Coburn J. Responses of human endothelial cells to pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(12):e918. doi:10.1371/journal.pntd.0000918.
36. Yamashiro-Kanashiro EH, Benard G, Sato MN, Seguro AC, Duarte AJ. Cellular immune responses analysis of patients with leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45:138-45.
37. Merián F, Baranton G, Perolat P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect. Immun.* 1997;65:729-38.
38. Toma C, Okura N, Takayama C, Suzuki T. Characteristic features of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. *Cell Microbiol.* 2011;13:1783-92.
39. Li L, Ojcius DM, Yan J. Comparison of invasion of fibroblasts and macrophages by high- and low-virulence *Leptospira* strains: colonization of the host-cell nucleus and induction of necrosis by the virulent strain. *Arch Microbiol.* 2007;188:591-8.
40. Schreiber AA, Frei K, Lichtensteiger W, Schlumpf M. Alterations in interleukin-6 production by LPS- and Con A-stimulated mixed splenocytes, spleen macrophages and lymphocytes in prenatally-diazepam-exposed rats. *Agents Actions.* 1993;39:166-73.
41. Massoco CO, Palermo-Neto J. Diazepam effects on peritoneal macrophage activity and corticosterone serum levels in Balb/c mice. *Life Sci.* 1999;65:2157-65.
42. Marinho M, Langoni H, Oliveira SL, Carreira R, Perri SHV, Luvizoto MC. Resposta humoral, recuperação bacteriana e lesões histológicas em camundongos geneticamente selecionados para bons e maus produtores de anticorpos e Balb/c, frente à infecção por *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. *Pesqui Vet Bras.* 2003;23:5-12.

Recebido em: 25/05/11

Aceito em: 20/10/11