

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

LARA REIS GOMES

Caracterização de cães com leptospirose, por meio de testes de diagnóstico sorológico, molecular e alterações clínicos-patológicas, e investigação do efeito antimicrobiano da nanopartícula ZnO:9Ag em cepas padrão de *Leptospira* spp.

UBERLÂNDIA

2022

LARA REIS GOMES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima

UBERLÂNDIA

2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

G633 2022	<p>Gomes, Lara Reis, 1987- Caracterização de cães com leptospirose, por meio de testes de diagnóstico sorológico, molecular e alterações clínicos-patológicas, e investigação do efeito antimicrobiano da nanopartícula ZnO:9Ag em cepas padrão de <i>Leptospira</i> spp. [recurso eletrônico] / Lara Reis Gomes. - 2022.</p> <p>Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima . Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.95 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Veterinária. I. , Anna Monteiro Correia Lima, 1973- , (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.</p> <p>CDU: 619</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias

BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	TESE DE DOUTORADO Nº PPGCVET/001/2022				
Data:	21 de fevereiro de 2022	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17:15
Matrícula do Discente:	11713VET004				
Nome do Discente:	LARA REIS GOMES				
Título do Trabalho:	Caracterização de cães com leptospirose, por meio de testes de diagnóstico sorológico, molecular e alterações clínicas-patológicas, e investigação do efeito antimicrobiano da nanopartícula ZnO:9Ag em cepas padrão de <i>Leptospira</i> spp.				
Área de concentração:	Saúde Animal				
Linha de pesquisa:	Investigação etiológica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Estudos de epidemiologia, de novas técnicas de diagnóstico e prevenção de doenças bacterianas em animais domésticos e selvagens				

Reuniu-se por Videoconferência (meio eletrônico), da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: **Antonio Vicente Mundim - UFU; Eliane Pereira Mendonça - UFU; Renata Ferreira dos Santos - UNIVAR; Pollyanna Mafra Soares - FAZU; Anna Monteiro Correia Lima** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Anna Monteiro Correia Lima, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

[A]provado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Anna Monteiro Correia Lima, Professor(a) do Magistério Superior**, em 21/02/2022, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eliane Pereira Mendonça, Professor(a) do Magistério Superior**, em 21/02/2022, às 17:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antônio Vicente Mundim, Professor(a) do Magistério Superior**, em 21/02/2022, às 17:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pollyanna Mafra Soares, Usuário Externo**, em 21/02/2022, às 17:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Ferreira dos Santos, Usuário Externo**, em 21/02/2022, às 17:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3364859** e o código CRC **F7FC25F0**.

DEDICATÓRIA

*A meus pais e ao meu esposo por
todo amor e incentivo à minha
formação profissional.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, porque ele é minha força e meu escudo, nele meu coração confia. Lembro exatamente como se fosse hoje, bem claro por sinal, perguntei ao meu Senhor Jesus, Seria da sua vontade entrar para o doutorado? E ele mais uma vez me surpreendeu, fui aprovada. Confesso, o caminho até aqui não foi nada fácil, mas ele me sustentou como sempre fez. “Em tudo dai graças, porque esta é a vontade de Deus”. *Tessalonicenses 5:18*

Aos meus pais, Meire e Arnaldo, que na medida do possível nunca mediram esforços para me dar uma educação de qualidade, pelo amor incondicional, e pelos princípios de moral e ética transmitidos, os quais eu levarei comigo em qualquer lugar que eu esteja.

Ao meu esposo Wesley, que me deu todo apoio possível, não somente neste período, mas também em toda minha jornada de estudos. Compartilhou comigo das tristezas e alegrias, sempre me encorajou, dizendo que eu era capaz, e me estendeu as mãos nos dias mais difíceis.

A profª Dra. Anna Lima, é um grande privilégio poder chamá-la de minha orientadora, muito obrigada pela amizade construída ao longo dos anos, por todos os ensinamentos, pelos conselhos, por sempre me encorajar a terminar, me incentivado a cada momento além disso, aceitou com disposição e boa vontade a me orientar na hora que mais precisei.

Agradeço a minha amiga Thais, com toda meiguice e prontidão, no momento crítico desta jornada, foi capaz de mostrar soluções e caminhos que poderíamos trilhar, com certeza sua presença me trouxe mais segurança e confiança para seguir em frente, eterna gratidão.

Não bastasse, Lucas surgiu com mais planos, se disponibilizou a ajudar, trouxe novas ideias as quais ainda não tínhamos imaginado, que com certeza iria enriquecer muito nosso trabalho, sempre otimista, um pesquisador nato, obrigada por tudo amigo.

Banner (Phellipe) com toda sua disponibilidade, animação não mediu esforços para nos ajudar e ensinar. A amizade com ele é natural, não tem quem não goste, nos alegra sempre, é nossa descontração diária, obrigada por tudo amigo.

Agradeço aos amigos que fizeram uma força tarefa para terminar o experimento com os embriões, Simone, Rogério, Cecília, Felipe Gonçalves, obrigada pela ajuda, pela paciência, por serem sempre solícitos. Tenho certeza de que vocês fizeram o melhor para me ajudar.

A prof^a Bia, obrigada pelo incentivo, desde que entrou para coordenação do laboratório, entendeu que a conclusão do doutorado seria muito importante para mim, sempre prestativa, além disso, contribuiu de forma significativa com a parte final do experimento. Muito obrigada.

Aos colegas do LADOC, residentes (Leticia e Lidianne), pós-graduandos, por compreenderem minha ausência neste período tão importante da minha vida.

A minha amiga Gabi Ribeiro, pela linda amizade construída, pela força diária, pelos conselhos, por me entender, sintonia pura. Obrigada de coração por compartilhar comigo dos momentos bons e ruins, sempre tendo um conselho e uma palavra amiga.

Por fim agradeço a amizade e parceria que construí ao longo desta caminhada de pós-graduação, mas que ainda permanece, firme e sólida, Gabriela Alves, Melissa, Fernanda, Dayane, Pollyanna, Andreia, Laís, Ana Buiatte.

Se eu não tivesse vocês, certamente o meu caminho seria muito mais árduo. Serei eternamente grata a cada um que contribuiu para que esse momento tão esperado e almejado chegasse.

A todos que participaram e contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

A minha eterna gratidão!

***“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais volta ao seu tamanho original”.***

Albert Einstein

RESUMO: A leptospirose é uma zoonose de importância mundial que causa mortes tanto em seres humanos como em animais. A infecção em cães e outras espécies ocorre pelo contato com urina ou água contaminada pela bactéria patogênica do gênero *Leptospira*. Objetivou-se avaliar dois testes diagnósticos na caracterização de cães com leptospirose, associar com as principais alterações clínicas-patológicas de cães suspeitos, além de investigar o efeito antimicrobiano da nanopartícula Óxido de Zinco dopado com prata (ZnO:9Ag) em cepas padrão de *Leptospira* spp. Foram selecionadas cinco espécies patogênicas de *Leptospira* (*L. interrogans*, *L. santarosai*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*), totalizando dez cepas padrão. A concentração inibitória mínima (CIM), viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico (MTT), teste de permeabilidade celular e liberação do conteúdo intracelular foram utilizados para verificar o efeito *in vitro* de estreptomicina, penicilina G, doxiciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag nas espécies de *Leptospira*. Analisou-se a segurança e toxicidade da ZnO:9Ag em modelo alternativo *in vivo*, embrião de galinha (EG). Dos 24 cães avaliados, 8 (33,3%) foram positivos para leptospirose, sendo 6 (25%) positivos no MAT, 2 (8,33%) positivos no qPCR e 1 (4,17%) positivo em ambos os testes. Os sorogrupos reativos predominantes foram Icterohaemorrhagiae (33,33%) e Djasiman (33,33%), seguido de Ballum (16,60%). A sensibilidade e especificidade da qPCR em relação teste padrão ouro (MAT) foi 16,7 % e 88,9%, respectivamente. Houve alterações nos níveis séricos de creatinina, ureia e FA no grupo positivo. Todos os tratamentos exibiram efeitos anti-*Leptospira*. Penicilina G apresentou menor CIM (<0,048), apesar da ZnO:9Ag apresentar maior CIM (6,25 a 50 µg/mL), também apresentou efeito inibitório, tornando uma boa opção terapêutica. Cinquenta por cento (50%) das cepas apresentaram menor viabilidade com ZnO:9Ag (100 µg/mL), sendo três na espécie *L. interrogans* e duas nas espécies *L. kirschneri* e *L. noguchii*. ZnO:9Ag foi o único que apresentou alteração significativa ($p < 0,05$) na permeabilidade em todas as espécies, e foi o tratamento que mais provocou extravasamento do conteúdo intracelular. O ensaio de toxicidade *in vivo* da ZnO:9Ag em embriões de galinha revelou diferença com o controle negativo ($p < 0,05$) apenas na enzima GGT. Conclui-se para o diagnóstico de leptospirose canina aguda, associar os dois testes diagnósticos MAT e qPCR e os achados clínicos-patológicos parece ser a melhor forma, no entanto os resultados sugerem que a nanopartícula (ZnO:9Ag) pode ser potencialmente usada como agente antibacteriano alternativo contra *Leptospira* spp., capaz de inibir seu crescimento, além ser seguro e pouco tóxico para o organismo.

Palavras-chave: leptospirose canina; PCR; MAT; nanopartícula de prata; susceptibilidade antimicrobiana.

ABSTRACT: Leptospirosis is a zoonosis of worldwide importance that causes deaths in both humans and animals. Infection in dogs and other species occurs through contact with urine or water contaminated by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*. The objective was to evaluate two diagnostic tests in the characterization of dogs with leptospirosis, to associate them with the main clinical-pathological alterations of suspected dogs, in addition to investigating the antimicrobial effect of the silver-doped Zinc Oxide nanoparticle (ZnO:9Ag) in standard strains *Leptospira* spp. Five pathogenic species of *Leptospira* (*L. interrogans*, *L. santarosai*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*) were selected, totaling ten standard strains. Minimum inhibitory concentration (MIC), cell viability by colorimetric assay (MTT), cell permeability test and release of intracellular content were used to verify the in vitro effect of streptomycin, penicillin G, doxycycline, tetracycline and ZnO:9Ag in the species of *Leptospira*. The safety and toxicity of ZnO:9Ag were analyzed in an alternative in vivo model, chicken embryo (EG). Of the 24 dogs evaluated, 8 (33.3%) were positive for leptospirosis, being 6 (25%) positive in the MAT, 2 (8.33%) positive in the qPCR and 1 (4.17%) positive in both tests. The predominant reactive serogroups were Icterohaemorrhagiae (33.33%) and Djasiman (33.33%), followed by Ballum (16.60%). The sensitivity and specificity of qPCR in relation to the gold standard test (MAT) was 16.7% and 88.9%, respectively. There were changes in the serum levels of creatinine, urea and FA in the positive group. All treatments exhibited anti-*Leptospira* effects. Penicillin G had a lower MIC (<0.048), although ZnO:9Ag had a higher MIC (6.25 to 50 µg/mL), it also had an inhibitory effect, making it a good therapeutic option. Fifty percent (50%) of the strains showed lower viability with ZnO:9Ag (100 µg/mL), three in the species *L. interrogans* and two in the species *L. kirschneri* and *L. noguchii*. ZnO:9Ag was the only one that showed a significant change ($p < 0.05$) in permeability in all species, and it was the treatment that most caused extravasation of intracellular content. The in vivo toxicity assay of ZnO:9Ag in chicken embryos revealed a difference with the negative control ($p < 0.05$) only in the GGT enzyme. It is concluded for the diagnosis of acute canine leptospirosis, associating the two diagnostic tests MAT and qPCR and the clinical-pathological findings seems to be the best way, however the results suggest that the nanoparticle (ZnO:9Ag) can be potentially used as an agent alternative antibacterial against *Leptospira* spp., capable of inhibiting its growth, besides being safe and not very toxic to the organism.

Keywords: canine leptospirosis; PCR; MAT; silver nanoparticle; antimicrobial susceptibility.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Capítulo 1

Quadro 1: Classificação genotípica das espécies de <i>Leptospira</i> spp.	19
--	----

Capítulo 2

Tabela 1: Espécies, sorogrupos e sorovares utilizados no teste de aglutinação microscópica (MAT) para o diagnóstico de leptospirose canina no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia 2020.....	60
---	----

Tabela 2: Frequência de cães positivo para leptospirose utilizando a associação das técnicas de diagnóstico MAT e qPCR.....	61
---	----

Tabela 3: Sorogrupos e sorovares mais frequentes e respectivos títulos no teste de aglutinação microscópica (MAT) em cães com suspeita clínica de leptospirose atendidos no Hospital Veterinário da UFU, 2020.....	61
--	----

Tabela 4: Valores de creatinina, ureia, ALT e FA de cães submetidos aos testes diagnósticos (MAT/qPCR) para leptospirose canina, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, 2020.....	61
---	----

Tabela 5: Média e desvio-padrão dos parâmetros hematológicos de cães com diagnóstico positivo para leptospirose, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, 2020.....	62
---	----

Capítulo 3

Quadro 1: Seleção de Espécies, sorogrupos e sorovares de <i>Leptospira</i> patogênicas para o experimento.....	68
--	----

Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM - $\mu\text{g/mL}$) de Penicilina G (U/mL), Estreptomicina, Doxíciclina, Tetraciclina e nanopartícula ZnO:9Ag, em cinco espécies selecionadas de bactérias do gênero <i>Leptospira</i>	73
---	----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2.

Figura 1. Frequência de sinais clínicos observados em cães com diagnóstico de leptospirose, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, 2020.....63

Capítulo 3.

Figura 1. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxiciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.....74

Figura 2. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxiciclina, tetraciclina. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.....75

Figura 3. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade de viabilidade), de células viáveis da *L. interrogans* sorovar Canicola, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxiciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.....76

Figura 4. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *L. interrogans* sorovar Hardjoprajitno, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxiciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.....77

Figura 5. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *L. interrogans* sorovar Wolffi, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxiciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.....78

Figura 6. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *L. interrogans* sorovar Bratislava, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxiciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.....79

Figura 7. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *L. santarosai* sorovar Guaricura, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxiciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.80

Figura 8. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *L.*

borgpeterseni sorovar Castellonis, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxiciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.....81

Figura 9. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *L. kirschneri* sorovar Grippytyphosa, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxiciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.....82

Figura 10. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *L. noguchii* sorovar Panama, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxiciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.....83

Figura 11. Comparação da viabilidade celular das cinco espécies de *Leptospira* em relação aos tratamentos (estreptomicina, penicilina G, doxiciclina, tetraciclina e ZnO:09Ag na concentração 100 µg/U/mL. A relação das cepas são *L. interrogans* sorovar: Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Hardjoprajitno, Wolffi, Bratislava; *L. santarosai* sorovar Guaricura; *L. borgpeterseni* sorovar Castellonis; *L. kirschneri* sorovar Grippytyphosa; *L. noguchii* sorovar Panama. Linha vermelha representa 20% de viabilidade celular.....84

Figura 12. Ensaio de permeabilidade celular. Influência do tratamento com doxiciclina, estreptomicina e nanopartícula ZnO:9Ag nas concentrações 25 a 100 µg/mL na permeabilidade de membrana celular de *L. interrogans* sorovar: Copenhageni (A), Icterohaemorrhagiae (B), Canicola (C), Hardjoprajitno (D), Wolffi (E), Bratislava (F). Dados mostram média ± desvio-

padrão, com intervalo de confiança de 95%. Teste análise de variância ANOVA, com pós teste de Tukey. *Indica diferença estatística com o controle (membrana íntegra), (p-valor <0,05). .85

Figura 13. Ensaio de permeabilidade celular. Influência do tratamento com doxiciclina, estreptomicina e nanopartícula ZnO:9Ag nas concentrações 25 a 100 µg/mL na permeabilidade de membrana celular de *L. borgpeterseni* sorovar Castellonis (A), *L. santarosai* sorovar Guaricura (B), *L. kirschneri* sorovar Grippytyphosa (C), *L. noguchii* sorovar Panama (D). Dados mostram média ± desvio-padrão, com intervalo de confiança de 95%. Teste análise de variância ANOVA, com pós teste de Tukey. * Indica diferença estatística com o controle, p-valor (p<0,05)86

Figura 14. Ensaio de liberação do conteúdo intracelular. Influência do tratamento com doxiciclina, estreptomicina e nanopartícula ZnO:9Ag nas concentrações 25 a 100 µg/mL na liberação do conteúdo intracelular de *L. interrogans* sorovar: Copenhageni (A), Icterohaemorrhagiae (B), Canicola (C), Hardjoprajitno (D), Wolffi (E), Bratislava (F). Leitura da densidade óptica 260nm. Dados mostram média das absorbâncias ± desvio-padrão, com intervalo de confiança de 95%. Teste análise de variância ANOVA, com pós teste de Tukey. * Indica diferença estatística com o controle, (p-valor <0,05)87

Figura 15. Ensaio de liberação do conteúdo intracelular. Influência do tratamento com doxiciclina, estreptomicina e nanopartícula ZnO:9Ag nas concentrações 25 a 100 µg/mL na liberação do conteúdo intracelular de *L. borgpeterseni* sorovar Castellonis (A), *L. santarosai* sorovar Guaricura (B), *L. kirschneri* sorovar Grippytyphosa (C), *L. noguchii* sorovar Panama (D). Leitura da densidade óptica 260nm. Dados mostram média das absorbâncias ± desvio-padrão, com intervalo de confiança de 95%. Teste análise de variância ANOVA, com pós teste de Tukey. * Indica diferença estatística com o controle, (p-valor <0,05).88

Figura 16. Peso (g) (A) e viabilidade (%) (B) de embriões de galinha - EG (modelo *in vivo*) ao teste de toxicidade de nanopartículas de prata (ZnO:9Ag) em diferentes concentrações. CN – controle negativo (água para injeção); D1 (10 mg/embrião); D2 (1 mg/embrião); D3 (100 µg/embrião); D4 (10 µg/embrião); D5 (1 µg/embrião); D6 (100 ng/embrião). Não houve diferença estatística entre os grupos pelo teste ANOVA com 5% de significância.....89

Figura 17. Níveis de Crea (creatinina) (**A**), AU (ácido úrico) (**B**), ALT (alanina aminotransferase) (**C**), AST (aspartato aminotransferase) (**D**), FA (fosfatase alcalina) (**E**), GGT (gama glutamiltransferase) (**F**), em soro sanguíneo de embriões de galinha (EG), após o tratamento com ZnO:9Ag. CN – controle negativo (água para injeção); D1 (10 mg/embrião); D3 (100 µg/embrião); D5 (1 µg/embrião). * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) e os valores são expressos em média \pm desvio-padrão. Teste estatístico ANOVA pós teste de Tukey com 5% de significância.....90

SUMÁRIO

Capítulo 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivos	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Taxonomia e Classificação de <i>Leptospira</i>	17
2.2 Epidemiologia, Ciclo de Transmissão e Patogenia	20
2.3 Leptospirose Canina: apresentações clínicas e laboratoriais	22
2.3.1 Diagnóstico sorológico e molecular	23
2.3.2 Tratamento da leptospirose	26
2.3.3 Concentração Inibitória Mínima (MIC)	28
2.4 Nanopartículas	31
2.5 Teste de toxicidade em modelo experimental <i>in vivo</i> : Embrião de galinha.....	33
REFERENCIAS	34
 Capítulo 2 – Artigo 1: Alterações clínico-patológicas, diagnóstico sorológico e molecular em cães com suspeita de leptospirose.....	 46
 Capítulo 3 – Artigo 2: Avaliação <i>in vitro</i> do efeito antimicrobiano da nanopartícula ZnO:9Ag e antibióticos em cepas padrão de <i>Leptospira</i> spp.	 64
 ANEXO A - Certificado da Comissão de ética na utilização de Animais – CEUA (nº A013/19)	 100
 ANEXO B - Certificado da Comissão de ética na utilização de Animais – CEUA (nº A022/21)	 101

Capítulo 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa grave, zoonótica, de distribuição global cujo diagnóstico permanece negligenciado (BARRAGAN et al., 2016; RODRIGUES, 2019; MARTINS; SPINK, 2020). É causada por bactérias espiroquetas da ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e do gênero *Leptospira* (MOHAMMED et al., 2011; SCHULLER et al., 2015).

A doença pode acometer animais domésticos, selvagens, bem como os seres humanos. A transmissão ocorre principalmente pela urina excretada de animais infectados com a bactéria (FAINE et al., 1999; MOHAMMED et al., 2011). Os principais sinais clínicos observados após a penetração da leptospira nas mucosas e pele integra são anorexia, vômitos, letargia, febre e icterícia. A sintomatologia é inespecífica com diferentes graus de severidade, podendo levar até a morte, pois há disseminação rápida da bactéria pela corrente sanguínea e todas as partes do corpo (SOUZA et al., 2014).

Devido a elevadas taxas de letalidade observadas tanto em cães como seres humanos (GREENE et al., 2006; MARTINS; SPINK, 2020), o diagnóstico e o tratamento precoces são fundamentais para prevenir as manifestações mais graves e potencialmente letais dos pacientes (KOBAYASHI, 2001). O diagnóstico é baseado nas características clínicas, nos achados laboratoriais e na situação epidemiológica (PICARDEU, 2013).

O exame sorológico padrão ouro recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (2003) para o diagnóstico confirmatório da doença é o teste de aglutinação microscópica (MAT). Porém, apresenta limitações em estágios iniciais da doença devido à falta de soroconversão, sendo, portanto, necessário uma segunda amostra na fase convalescente, o que na maioria das vezes não é possível pois o animal vai a óbito. Por isso a reação em cadeia da polimerase (PCR) torna-se uma opção de ferramenta diagnóstica, sendo capaz de detectar o DNA da bactéria em amostras de urina (ZAKERI et al., 2010) de forma precoce, antes mesmo do aparecimento de anticorpos na circulação.

O tratamento ideal para a leptospirose ainda é desconhecido, porém segundo o Consenso de Pequenos Animais ACVIM 2010 (SYKES et al., 2011), recomendou-se a administração de doxiciclina na leptospirose canina. As penicilinas ou doxiciclinas têm sido tradicionalmente os antimicrobianos de escolha para o tratamento de humanos e cães com leptospirose. Sabendo do

aparecimento de cepas multirresistentes, a duração e dose da terapia antimicrobiana preconizada ainda requer mais investigações.

Neste contexto, a nanotecnologia mostra-se como uma alternativa importante frente aos tratamentos tradicionais (FREIRE, et al., 2018), pois possuem propriedades antimicrobianas amplamente conhecidas, como nanopartículas de prata (AgNPs). As AgNPs apresentam ação contra bactérias (VIANA et al., 2021), vírus (SINGH et al., 2017), fungos (MANJUMEENA et al., 2014) e protozoários (HENDIGER et al., 2020), além da sua utilização na indústria de alimentos agricultura, indústria médica e farmacêutica. Diante disso, as nanopartículas de prata tornam-se uma opção como potencial agente antibacteriano capaz de inibir o crescimento de *Leptospira*.

1.1 Objetivos

- Avaliar dois testes diagnósticos na caracterização de cães com leptospirose e associar com as principais alterações clínicas-patológicas de cães suspeitos.
- Verificar o efeito antimicrobiano da nanopartícula Óxido de Zinco dopado com prata em cepas padrão de *Leptospira* spp. e sua comparação a antibióticos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Taxonomia e Classificação de *Leptospira*

Leptospira são bactérias, espiroquetas, Gram negativas que pertencem a ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e gênero *Leptospira*. São microrganismos móveis, aeróbicos obrigatórios e sua temperatura ótima de multiplicação é entre 28 a 30°C. Possuem cerca de 0,1µm de diâmetro e 6 a 20µm de comprimento, são visualizadas em microscopia de campo escuro. Por possuírem parede celular muito fina, não se coram pelas colorações usuais como de Gram e sim em preparações impregnadas por sais de prata (FAINE et al., 1999; HAAKE et al., 2000; LEVETT, 2001; QUINN et al., 2005).

Possuem estruturas de superfície comum tanto de bactérias Gram-positivas quanto de Gram-negativas. A parede celular desta bactéria é composta por uma membrana interna, peptidoglicano, dois flagelos periplasmáticos e membrana externa. Dentro da membrana

externa dupla está o lipopolissacarídeo (LPS) principal antígeno de superfície, característica comum de bactérias Gram-negativas (ADLER, 2015). O gênero *Leptospira* foi dividido antes de 1989 em duas espécies com base em sua virulência, *L. interrogans* e *L. biflexa*. A primeira compreendia as cepas patogênicas, e a segunda, as cepas saprofíticas isoladas do ambiente (LEVETT, 2001). Tanto *L. interrogans* quanto *L. biflexa* são divididas sorologicamente em vários sorogrupos e sorovares (FAINE et al., 1999; PAES, 2016).

A classificação fenotípica tem como base a expressão do LPS exposto na superfície bacteriana. Os LPSs de membrana são altamente imunogênicos e dependendo da heterogeneidade dos carboidratos que os compõem, são responsáveis pela diversidade antigênica entre os sorovares (LEVETT, 2001; CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009). Sorovares antigenicamente relacionados pelo teste de adsorção de aglutinação cruzada compõem os sorogrupos, que representam atualmente mais 320 sorovares subdivididos em 28 sorogrupos (SOARES et al., 2020; ALTHEIMER et al., 2020), classificação considerada importante para estudos epidemiológicos.

A classificação recente tem como base as análises filogenéticas dos genes RNAs ribossomais 16S, que considera o genótipo e não o fenótipo, chamada de genomospécies. A classificação genotípica dividiu as espécies de *Leptospira* em três grupos: leptospira patogênicas, leptospira intermediárias e leptospira saprófitas. Recentemente foi disponibilizado pela List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN), o registro de 68 espécies de *Leptospira* e nenhuma subespécie (PARTE et al. 2020). As últimas espécies inseridas à lista encontram-se nos estudos publicados por Vicent et al. (2019).

Das 68 espécies disponíveis, 19 são leptospirosas patogênicas, 21 intermediárias e 28 saprófitas, (Quadro 1). É importante ressaltar que as classificações sorológicas e genéticas não estão associadas, e diferentes sorovares podem pertencer à mesma genomoespécie (LEVETT, 2015; Di AZEVEDO; LILEMBUAM, 2021). O novo sistema genômico de classificação revelou que espécies patogênicas, podem conter sorovares patogênicos e não patogênicos, bem como intermediários (LEVETT, 2015).

Soares et al. (2020) também verificaram esta dualidade de classificação em que sorovares de *Leptospira* baseada em regiões genômicas muitas vezes não correspondem à sua classificação na análise sorológica.

Leptospirosas patogênicas tem potencial de causar doenças em animais e humanos, possuem estratégias de invasão, disseminação e permanência no hospedeiro. Porém, as leptospirosas saprófitas são de vida livre e geralmente não são consideradas causadoras de doenças. Ocasionalmente são encontradas em culturas de materiais clínicos, embora o

significado da sua presença seja incerto (MOHAMMED, et al., 2011). As espécies intermediárias apresentam patogenicidade moderada em seres humanos e animais, podendo gerar manifestações clínicas mais brandas, uma vez que compartilham características comuns com espécies patogênicas (VICENT et al., 2019).

Quadro 1: Classificação genotípica das espécies de *Leptospira* spp.

Leptospira Patogênica (19)	Leptospira Intermediária (21)	Leptospira Saprófita (28)
<i>Leptospira adleri</i>	<i>Leptospira andrefontaineae</i>	<i>Leptospira bandrabouensis</i>
<i>Leptospira alexanderi</i>	<i>Leptospira broomii</i>	<i>Leptospira biflexa</i>
<i>Leptospira alstonii</i>	<i>Leptospira dzoumogneensis</i>	<i>Leptospira bourretii</i>
<i>Leptospira barantonii</i>	<i>Leptospira fainei</i>	<i>Leptospira bouyouniensis</i>
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	<i>Leptospira fletcheri</i>	<i>Leptospira brenneri</i>
<i>Leptospira dzianensis</i>	<i>Leptospira fluminis</i>	<i>Leptospira congkakensis</i>
<i>Leptospira ellisii</i>	<i>Leptospira haakeii</i>	<i>Leptospira ellinghausenii</i>
<i>Leptospira gomenensis</i>	<i>Leptospira hartskeerlii</i>	<i>Leptospira ellinghausenii</i>
<i>Leptospira interrogans</i>	<i>Leptospira inadai</i>	<i>Leptospira harrisiae</i>
<i>Leptospira kirschneri</i>	<i>Leptospira johnsonii</i>	<i>Leptospira idonii</i>
<i>Leptospira kmetyi</i>	<i>Leptospira koniambonensis</i>	<i>Leptospira ilyithenensis</i>
<i>Leptospira mayottensis</i>	<i>Leptospira langatensis</i>	<i>Leptospira jelokensis</i>
<i>Leptospira noguchii</i>	<i>Leptospira licerasiae</i>	<i>Leptospira kanakyensis</i>
<i>Leptospira putramalaysiae</i>	<i>Leptospira neocaledonica</i>	<i>Leptospira kemamanensis</i>
<i>Leptospira santarosai</i>	<i>Leptospira perolatii</i>	<i>Leptospira kobayashii</i>
<i>Leptospira stimsonii</i>	<i>Leptospira saintgironisae</i>	<i>Leptospira levettii</i>
<i>Leptospira tipperaryensis</i>	<i>Leptospira sarikeiensis</i>	<i>Leptospira macculloughii</i>
<i>Leptospira weilii</i>	<i>Leptospira selangorensis</i>	<i>Leptospira meyeri</i>
<i>Leptospira yasudae</i>	<i>Leptospira semungkisensis</i>	<i>Leptospira montravelensis</i>
	<i>Leptospira venezuelensis</i>	<i>Leptospira mtsangambouensis</i>
	<i>Leptospira wolffii</i>	<i>Leptospira noumeaensis</i>
		<i>Leptospira ognonensis</i>
		<i>Leptospira perdikensis</i>
		<i>Leptospira ryugenii</i>
		<i>Leptospira terpstrae</i>

		<i>Leptospira vanthielii</i> <i>Leptospira wolbachii</i> <i>Leptospira yanagawae</i>
--	--	--

Fonte: PARTE et al. 2020, adaptado.

2.2 Epidemiologia, Ciclo de Transmissão e Patogenia

A leptospirose é uma zoonose emergente de incidência mundial e tem sido considerada um problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010), mas também ocorre de forma rara em países desenvolvidos e normalmente está relacionado a atividades recreativas (caiaque, canoagem, natação) (VIJAYACHARI et al., 2008; LE TURNIER; EPELBOIN, 2019). Ocorre principalmente em locais de clima tropical, por propiciar condições ambientais favoráveis à transmissão da doença, tais como altas taxas de precipitação pluviométrica, inundações, desastres naturais, e condições sanitárias precárias (MARTINS; LILENBAUM, 2017; VITALE et al., 2018).

A transmissão pode ocorrer entre os animais pelo contato direto com o sangue, tecidos de órgãos ou urina contaminados com a bactéria e entre os animais e o homem, principalmente de forma indireta, através da água, solo úmido e alimentos contaminados com a urina (LEVETT, 2001). O hospedeiro mais frequente descrito para *Leptospira* spp. é o rato (*Rattus norvegicus*), sendo considerado o reservatório universal dessa zoonose (FAINE, 1999). Porém quase todas as espécies domésticas de mamíferos (bovino, suíno, equino, canino) e a grande parte de animais silvestres podem ser reservatórios naturais, transportar e excretar na urina *Leptospira* ao ambiente (MORENO et al., 2016; LE TURNIER; EPELBOIN, 2019).

Leptospira patogênicas mais comuns em cães são *L. interrogans* pertencente aos sorogrupos Canicola (sorovar Canicola), Icterohemorrhagiae (sorovar Icterohaemorrhagiae), Pomona (sorovar Pomona), e *L. kirschneri* sorogrupo Grippotyphosa. Os sorovares pertencentes ao sorogrupo Canicola e Icterohaemorrhagiae são as cepas patogênicas primárias associadas à doença em cães (GREENE, et al., 2006; XU et al., 2014). Uma das formas de transmissão do sorovar Canicola, entre cães saudáveis e portadores assintomáticos, é devido ao comportamento comum da espécie em demarcar o território com a urina (ROHILLA, et al. 2020).

A eliminação de leptospiras é considerada intermitente e cada sorovar pode ter predileção por um ou mais hospedeiros (FORNAZARI et al., 2012; HAMOND et al., 2012),

dependendo do nível de adaptação dos hospedeiros aos sorovares, estes podem apresentar sintomas leves a graves, ou apenas serem assintomáticos (portadores renais) (GARCÍA-VÁZQUEZ et al., 2010). O ciclo biológico da *Leptospira* patogênica é complexo, inclui ambiente natural, reservatório assintomático e hospedeiros suscetíveis (VASCONCELLOS, 1993).

Vale ressaltar que cada sorovar tem preferência por um hospedeiro animal (hospedeiro de manutenção), porém não é espécie-específica, e pode acometer outras espécies (hospedeiro incidental) (QUINN, 2005). A *Leptospira* spp., nos animais infectados, localiza-se e pode permanecer de forma persistente nos rins e no trato genital tanto de machos como de fêmeas. Desta forma, animais infectados cronicamente podem ser portadores durante vários anos e atuarem como reservatórios e fontes de infecção para outros animais, inclusive para os seres humanos (OIE, 2006).

As bactérias rompem as barreiras teciduais penetrando em mucosas e lesões cutâneas, podendo atingir a corrente sanguínea, onde ocorre a multiplicação e disseminação para vários órgãos (fígado, baço e rins), caracterizando um quadro agudo, septicêmico, com diversas manifestações clínicas. Esta fase é chamada de leptospiremia, dura em torno de 7 dias. Mesmo não sendo considerada uma fase imune, pode apresentar sinais brandos e inespecíficos como febre, leucocitose e albuminemia. Depois ocorre a produção de anticorpos pelo organismo animal e por fim as bactérias migram para os tecidos renais. Nos túbulos contorcidos proximais dos rins, as bactérias que conseguem escapar da ação dos anticorpos, se instalam e formam pequenos grumos caracterizando a fase de leptospirúria, que ocorre entre sétimo e o décimo dia de infecção. Com a ação de anticorpos produzidos há formação de complexos imunes e reação inflamatória causando uma vasculite generalizada, principalmente nos rins fígado, coração, pulmões e sistema reprodutivo (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010, ADLER, 2015).

A lesão primária é observada no endotélio de pequenos vasos que levam a isquemia local em órgãos, resultando em necrose túbulo-renal, dano hepatocelular e pulmonar, meningite, miosite e placentite. O período de incubação depende da dose infectante, taxa de crescimento de microrganismos, toxicidade e imunidade do hospedeiro (MOHAMMED et al. 2011).

2.3 Leptospirose canina: apresentações clínicas e laboratoriais

Os cães são altamente suscetíveis à infecção, podem ser considerados sentinelas pelo risco ambiental que apresentam aos seres humanos, devido ao seu alto nível de exposição a leptospiros patogênicos (SCHULLER et al., 2015; BERTASIO et al., 2020).

Atualmente, a leptospirose canina é considerada um problema de saúde pública, pois o contato próximo entre humanos e cães tem se tornado cada dia mais frequente, vivem dentro de casa e são membros da família (POLACHINI; FUJIMORI, 2015; MIOTTO et al., 2018b; SEVÁ et al., 2020). Nesse contexto, o risco de transmissão é notável, pois os cães mesmo não apresentando sintomas clínicos, são capazes de eliminar a leptospira no ambiente e infectar o homem, por serem portadores renais (liberação intermitente da bactéria) (MIOTTO et al., 2018b; REAGAN; SYKES, 2019).

A infecção por leptospira em cães pode variar desde uma infecção subclínica, com sinais leves e transitórios, ou até mesmo provocar alterações em múltiplos órgãos ocasionando morte do animal (POLACHINI; FUJIMORI, 2015). A variação das manifestações clínicas e a gravidade dos sintomas, estão relacionados com o sorovar infectante, localização do patógeno, adaptabilidade e reposta imune do hospedeiro (TORRES-CASTRO et al., 2016; PICARDEAU, 2017; SEVÁ et al., 2020).

Na leptospirose canina foram identificadas quatro síndromes: ictérica, hemorrágica, urêmica e reprodutiva. As duas primeiras são causadas por leptospiros do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, e as últimas por leptospiros do sorogrupo *Canicola* que normalmente provocam doença crônica (REAGAN; SYKES, 2019). Os sinais clínicos como insuficiência hepática e renal são decorrentes dos sorovares incidentais como *Icterohaemorrhagiae*, provocando doença aguda com predominância de sinais clínicos clássicos (RISSI; BROWN, 2014).

Os principais sintomas clínicos que os cães apresentam incluem vasculite, lesão renal aguda e/ou crônica em casos mais avançados da doença, lesão hepática, icterícia, febre, vômito, diarreia, hemorragia pulmonar, distúrbios vasculares, uveíte, miosite e insuficiência reprodutiva. A apresentação clínica da doença em cães se assemelha muito com a de humanos (ADLER, 2015; SCHULLER et al., 2015; REAGAN; SYKES, 2019). Embora cães podem ser hospedeiros e susceptíveis a vários sorovares (*Pomona*, *Grippotyphosa*, *Copenhageni*, *Bratislava*, *Ballum*, *Australis*, *Hardjo*, *Bataviae*), as estirpes mais revelantes e principalmente reportadas no Brasil pertencem aos sorogrupos *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* (SCHULLER et al., 2015; MIOTTO et al., 2018b).

Santos e Santos (2021) afirmaram que além da alta exposição de cães aos sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Canicola, ainda é possível circulação de sorogrupos não isolados no Brasil, como o sorogrupo Autumnalis.

As principais alterações laboratoriais apresentadas em cães com leptospirose estão relacionadas principalmente a presença de bactérias na circulação, liberação de toxinas causando vasculites nos tecidos hepático e renal e pelos distúrbios vasculares. No hemograma foi verificado por alguns autores aumento do número totais de leucócitos (leucocitose), diminuição das plaquetas (plaquetopenia), neutrofilia (aumento do número total de neutrófilos), às vezes com desvio à esquerda, linfopenia e anemia não regenerativa de leve a moderada. Em casos raros também foi observado anemia grave devida hemorragia gastrointestinal ou pulmonar (SYKES et al., 2011; SCHULLER et al., 2015). Goldstein et al. (2006) afirmaram que a trombocitopenia esteve presente em 58% de cães com leptospirose.

Os achados bioquímicos mais frequentes são condizentes com a lesão renal, aumento de ureia e creatinina, e está presente em quase 90% dos casos (SYKES et al., 2011), hiperfosfatemia também foi observada em 80% dos casos (REAGAN; SYKES, 2019). Aumento da atividade das enzimas hepáticas séricas, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e bilirrubina total são observados em aproximadamente metade dos cães com leptospirose, porém esta lesão sempre está acompanhada de lesão renal (KNOPFLER et al., 2017). Também relataram alterações nas concentrações séricas de fósforo, cloro e albumina. Já os achados da urinálise, incluem liberação de proteína na urina (proteinúria) e diminuição da densidade urinária (hipostenúria ou isotenúria) (REAGAN; SYKES, 2019). Sabendo que nenhuma dessas alterações fornecem um diagnóstico definitivo, é necessário o auxílio de testes diagnósticos mais confiáveis e precisos.

As principais alterações hemato-bioquímicas encontradas em estudo com cães que apresentaram sintomas clínicos (febre, icterícia desidratação, mucosa pálida, hematoquezia) compatíveis com leptospirose foram: anemia, leucocitose e trombocitopenia leve (GEETHA; SELVARAJU, 2021).

2.3.1 Diagnóstico sorológico e molecular

O diagnóstico precoce e definitivo da leptospirose canina é importante devido à natureza zoonótica da doença e à necessidade de iniciar uma intervenção adequada em cães infectados. Segundo Goldstein et al. (2006), quando a doença é identificada de forma precoce e a terapia apropriada é instituída, as taxas de sobrevivência chegam até 80%.

Além disso, os achados clínicos e laboratoriais da doença são geralmente inespecíficos, necessitando de testes confirmatórios que auxiliem no desfecho da suspeita clínica. Os dois principais testes utilizados para o diagnóstico da leptospirose canina são os sorológicos, pelo teste de aglutinação microscópica (MAT) e os moleculares (PCR) (BALBONI et al., 2020).

O MAT é um exame indireto, pois pesquisa anticorpos séricos específicos, e o PCR é um método de identificação direta, capaz de detectar a presença do DNA da leptospira em amostras biológicas como sangue, urina, sêmen (SCHULLER, et al., 2015).

O teste sorológico padrão ouro preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (2003) é o MAT. A aglutinação é avaliada por microscopia de campo escuro e a leitura sugere exposição a um sorovar pertencente ao sorogrupo correspondente (mas não necessariamente ao sorovar testado) (BERTASIO et al., 2020). O MAT é um ensaio específico para sorogrupo, devido a existência de reações cruzadas entre os sorovares de um mesmo sorogrupo (LEVETT, 2001; SYKES et al., 2011).

Na primeira semana de doença, os cães frequentemente apresentam resultados negativos ao MAT, então recomenda-se realizar o exame de forma pareada, com intervalo de 15 dias. Quando observado um aumento de quatro vezes ou mais no título, entre os soros, confirma-se o diagnóstico, independentemente do intervalo entre as amostras (LEVETT, 2001). Porém muitas vezes não é possível realizar a repetição do exame sorológico pois o animal pode morrer antes desse período.

A sorologia MAT é um teste mais específico do que sensível, e possui suas limitações particularmente na fase aguda, não sendo capaz de detectar os anticorpos, devido a falta de soroconversão. Além disso, utiliza antígenos vivos e necessita de profissionais habilitados para leitura dos exames e manutenção das cepas (PICARDEU, 2013).

As técnicas moleculares estão sendo cada vez mais utilizadas para o diagnóstico clínico da leptospirose, ademais há uma maior oferta pelos laboratórios veterinários em todo mundo. São mais sensíveis em comparação com os métodos de cultura, mais rápidos, a bactéria pode ser detectada diretamente de amostras e as infecções podem ser confirmadas antes mesmo dos testes sorológicos (SYKES et al., 2011; ROHILLA et al., 2020).

O PCR detecta o DNA da *Leptospira* no sangue no início da infecção, uma vez que o MAT neste período apresenta resultado negativo, pois ainda não houve a soroconversão. Nos primeiros 10 dias de infecção, o número de bactérias é maior no sangue e, portanto, o sangue é a amostra de escolha durante a primeira semana da doença. Após 7 dias, a maior concentração de bactérias é na urina. Porém quando não se sabe o momento da infecção, o teste simultâneo de sangue e urina é preferido por aumentar a sensibilidade diagnóstica (SYKES et al., 2011).

Resultado positivo revela a presença da *Leptospira* na amostra clínica, não sendo possível a identificação do sorovar infectante, assim como MAT, o PCR possui limitações. Embora isso não seja significativo para o tratamento individual do paciente, a identificação do sorovar tem um valor epidemiológico importante em termos de saúde pública (LEVETT, 2001; PICARDEU, 2013). Já um resultado negativo não exclui a infecção pela *Leptospira*, seja em amostras de sangue ou urina.

O diagnóstico definitivo direto continua sendo a cultura bacteriana a partir de amostras clínicas. Normalmente o teste não é requisitado na rotina clínica pois o crescimento do patógeno é fastidioso e leva meses para obter o resultado. O isolamento da leptospira é o único método que permite a identificação do sorovar infectante (MIOTTO, et al., 2018b).

Contudo, resultados positivos em amostras de sangue, juntamente com sinais clínicos indicativos da doença, são altamente sugestivos de leptospirose aguda. Por outro lado, PCR positiva na urina, pode indicar tanto infecção aguda quanto portadores renais crônicos. Estes eliminam a bactéria de forma intermitente na urina sem apresentar sintomatologia, e ainda servem como fonte de infecção para outros animais e humanos (FRAUNE et al., 2013; SCHULLER, et al., 2015). Rohilla et al. (2020) utilizaram a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para investigarem a presença de *Leptospira* patogênica em amostras de urina de cães aparentemente saudáveis, porém nenhuma das amostras resultou em detecção do DNA.

Nenhuma técnica é completamente satisfatória e suficientemente boa, o que necessita, portanto, de associações entre elas. Muitos trabalhos têm utilizado mais de um tipo de teste para o diagnóstico da leptospirose canina, dentre eles estão os exames sorológicos e moleculares, que incluem MAT e PCR (MIOTTO et al., 2018a). Santos e Santos (2021) também reforçam a importância do uso de múltiplas abordagens diagnósticas para confirmar a leptospirose canina aguda.

Para o diagnóstico molecular de doenças infecciosas do homem e dos animais, o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) tem sido muito bem aceito por serem rápidos, precisos, possuírem alta sensibilidade e especificidade, e pouca reação cruzada (MARTIN, et al., 2019; ROHILLA et al., 2020).

Na maioria dos trabalhos, o gene *lipL32*, principal lipoproteína de membrana da *Leptospira*, tem sido utilizado como gene alvo mais comum nos ensaios qPCR, 48% dos estudos amplificam este marcador genético (Di AZEVEDO; LILENBAUM, 2021). Acredita-se que a *lipL32* seja um fator de virulência presente apenas em espécies patogênicas

de *Leptospira*. Assim, o gene aumenta a especificidade para detecção seletiva de espécies patogênicas (SUMARNINGSIH et al., 2016; ROHILLA et al., 2020).

2.3.2 Tratamento da leptospirose

O tratamento eficaz da leptospirose canina consiste em terapia medicamentosa, como terapia suporte (antieméticos, fluidoterapia). Este procedimento deve acontecer antes mesmo da confirmação diagnóstica definitiva (SCHULLER et al., 2015; SYKES et al., 2011), mesmo sabendo que tratamento ideal ainda é desconhecido. Alguns fatores importantes para esta rápida tomada de decisão são as complicações clínicas apresentadas pelos animais, normalmente graves, podendo levar a morte, e potencial risco de transmissão desta zoonose. O atraso no tratamento do animal pode ser potencialmente prejudicial.

Segundo Levett (2001), as leptospirosas são suscetíveis aos β -lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas e estreptomicina.

As penicilinas (beta-lactâmicos) ou doxiciclina (tetraciclina) tradicionalmente têm sido os antimicrobianos de escolha para o tratamento de humanos e cães com leptospirose (SYKES et al., 2011). O Consenso de Pequenos Animais ACVIM 2010, recomendou-se administrar em cães, doxiciclina 5mg / kg via oral (VO) ou intravenoso (IV) a cada 12 h por 2 semanas e penicilina G na dose 25.000–40.000 U / kg IV a cada 12 h.

Em cães que apresentam sinais gastrointestinais como vômitos e diarreias, é aconselhável utilizar o derivado de penicilina V ou ampicilina na dose 20 mg / kg IV a cada 6 horas, com redução na concentração para cães azotêmicos (SYKES et al., 2011). Após este período os cães devem receber doxiciclina por 2 semanas a fim de eliminar a bactéria dos túbulos renais. Santos et al. (2021) utilizaram em ambiente hospitalar ampicilina (22 mg/Kg; VI, a cada 8 h) e penicilina G (40.000 U/kg IM- via intramuscular a cada 48 h ou 72 h) para controle da infecção em cães. Geetha e Selvaraju (2021) utilizaram doxiciclina uma vez ao dia durante 21 dias (10 mg/kg), juntamente com a terapia suporte o que resultou em recuperação dos cães sem intercorrências.

A penicilina G é um antibiótico bactericida (causa morte da bactéria), age na biossíntese de parede celular, interferindo na síntese do peptídeoglicano, e consequentemente ocasionando a destruição da célula (ROSSI; ANDREAZZI, 2005), seu espectro é reduzido, age basicamente em bactérias Gram-positivas e alguns Gram-negativas.

A doxiciclina possui uma melhor absorção oral, em torno de 90 a 95%, quando comparada as outras tetraciclina, apresenta menor toxicidade por ser uma tetraciclina de

segunda geração. É um antimicrobiano semi-sintético bacteriostático de amplo espectro, atua inibindo a síntese proteica dos microrganismos. Bactérias sensíveis ao antimicrobiano são Gram-positivas e Gram-negativas aeróbicas e anaeróbicas, tais como clamídias, riquetsias (como *Ehrlichia* sp. e *Wolbachia* spp.), espiroquetas, micoplasma e alguns protozoários (*Anaplasma* spp. e *Mycoplasma* sp.) (BOUÇAS; COSTA, 2005).

Estudos publicados recentemente mostraram diversos tratamentos para cães com diagnóstico de leptospirose. Relataram que a terapia com estreptomicina em cães com leptospiúria foi eficaz para eliminar o estado de portador renal, uma vez que a associação de penicilina com doxiciclina não foram suficientes (JUVET et al., 2011).

De acordo com meta-análise publicada por Brett-Major e Coldren (2012), o tratamento com antibióticos não foi comprovado para reduzir a mortalidade de leptospirose. No entanto, afirmam que o atraso na administração do antibiótico é um fator de risco para aumento da mortalidade, sugerindo que a antibioticoterapia é tão benéfica quanto o tratamento precoce (LE TURNEIR; EPELBOIN, 2019). Sykes et al. (2011) verificaram que tratamento iniciado após 4-7 dias da doença é menos eficaz na recuperação clínica do animal.

Mesmo sabendo pouco do tratamento eficaz de leptospirose para cães, o recomendado é utilizar antibióticos antes mesmo de se obter os resultados laboratoriais e diagnósticos definitivos. A justificativa é baseada nas evidências clínicas, risco de morte e potencial zoonótico (SYKES et al., 2011), e a última justificativa é principalmente visando o tratamento adequado para que se elimine o estado de portador renal dos cães.

No que se refere ao controle da leptospirose bovina, a antibioticoterapia é bem aceita sendo considerada mais eficaz para reduzir o risco de transmissão em rebanhos quando associada à vacinação (MUGHINI-GRAS et al., 2014; CORREIA et al., 2019).

A estreptomicina é largamente usada para retirar o *status* de portador renal de bovinos, mas também em episódios de surto e falhas reprodutivas (CORREIA et al., 2019), apresenta bons resultados tanto na fase de leptospiremia quanto no controle da leptospiúria. Recomenda-se administrar 25mg/kg dose única via intramuscular de estreptomicina. Segundo Adler (2015) é o antibiótico mais utilizado para portadores renais e bovinos com diagnóstico de leptospirose genital. Além disso, para infecção aguda, associar penicilina e estreptomicina tem efeito sinérgico considerável na eliminação de portador.

Os aminoglicosídeos como a estreptomicina são pouco absorvidos por via oral, todavia são bem absorvidos pelo peritônio, cavidade pleural, articulações e pele lesionada. Por isso a melhor via de administração continua sendo a via IM. A estreptomicina apresenta amplo espectro, entretanto o uso é limitado por causa do risco associado ao surgimento de cepas

resistentes e pelo potencial de toxicidade (RIBEIRO, 2017). Ele interfere na montagem do complexo de iniciação entre o mRNA e o ribossomo bacteriano, inibindo o início da síntese de proteínas, portanto considerado bactericida (RIBEIRO, 2017).

Estudos realizados em humanos demonstraram que beta-lactâmicos, tetraciclina, macrolídeos, e fluoroquinolonas possuíam alta eficácia no tratamento de leptospirose, mas nenhum foi superior ao outro (RESSNER et al., 2008; LE TURNEIR: EPELBION, 2019).

De forma geral em humanos recomenda-se para o tratamento da forma grave da leptospirose, a penicilina G, porém como não é um antibiótico de amplo espectro, seu uso é limitado. Neste caso, a ceftriaxona e a cefotaxima devem ser preferidas em casos graves (PANAPHUT et al., 2003). Para a forma leve, o indicado é o tratamento oral com doxiciclina por ser eficiente na diminuição dos sinais clínicos e na excreção urinária de leptospiros. Os macrolídeos (azitromicina), beta-lactâmicos (amoxicilina) e fluoroquinolona (ciprofloxacina) são alternativas aceitáveis de tratamento (LE TURNEIR; EPELBOIN, 2019).

As cefalosporinas de terceira geração (ceftiofur) têm se tornado uma opção de tratamento em formas graves de leptospirose humana (PANAPHUT et al., 2003; SUPUTTAMONGKOL et al., 2010).

2.3.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Estudos *in vitro* e *in vivo* são descritos na literatura para testar a eficiência dos antibióticos no tratamento da leptospirose. Como existem várias espécies patogênicas e vários sorovares de leptospirose é de extrema importância estudar o antibiótico mais eficaz para cada caso, ou cepa incriminada como causadora da doença clínica em animais.

Diversos testes laboratoriais estão disponíveis para detectar a resistência de um determinado isolado ou sensibilidade dos microrganismos frente aos agentes antimicrobianos. Dentre eles, o método de microdiluição em caldo, teste *in vitro* amplamente utilizado na medicina veterinária (LEITE, 2016), apropriado para indicar a menor concentração necessária do agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento da bactéria testada.

Considerado uma boa opção por ser um método simplificado, barato, utiliza microplacas, permitindo gerar vários resultados quantitativos de forma rápida e simultânea. Além disso, é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, apresenta alto rendimento, possui reprodutibilidade (JORGENSEN; FERRARO, 2009). A microdiluição em caldo utiliza menos material, por ser realizada em microplacas 96 poços, adiciona menos meio

de cultura e antibióticos aos poços, ademais é possível testar várias e diferentes concentrações de antibióticos em uma mesma placa (CLSI, 2018).

De acordo com o padrão internacional CLSI (2018), o crescimento microbiano é avaliado de forma visual. Porém pode realizar a leitura em espectrofotômetro, uma vez que a avaliação visual não é tão objetiva e completamente precisa. A adição de substâncias reveladoras de células viáveis pode ser adicionada aos poços para facilitar a leitura visual ou até mesmo utilizar leitoras de microplacas, produzindo resultados confiáveis (GRELA, et al., 2018).

Uma das substâncias é o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromida), método colorimétrico de redução do tetrazólio, utilizado para avaliar viabilidade celular, através da atividade enzimática mitocondrial das células vivas. O princípio do método é baseado na redução enzimática (enzima succinato desidrogenase, produto da respiração mitocondrial) do sal de tetrazólio levemente colorido (amarelo) ao precipitado de formazan de cor azul púrpura intensa. Normalmente o valor de absorbância obtido é diretamente proporcional a quantidade de células vivas, pois a conversão do MTT em formazan ocorre somente em células vivas, e está relacionado a sobrevivência e proliferação celular. Para solubilizar o cristal de formazan e posterior leitura em espectrofotômetro é necessário adição de solvente orgânico para dissolver os precipitados (GRELA, et al., 2018).

As combinações terapêuticas de antimicrobianos apresentam melhor eficácia, amplo espectro, além de prevenir o aparecimento de cepas resistentes. O teste de sinergismo é uma metodologia válida para quantificar *in vitro* o efeito de associações de agentes antimicrobianos no crescimento bacteriano. O método de *Checkerboard* avalia sinergia de um composto em combinação com antimicrobiano em diferentes diluições. Assemelha-se ao método de microdiluição em caldo para as determinações padrão de MIC (ISMAIL et al., 2021). Os resultados são mensurados por equações e definido como sinérgica, indiferente ou antagonista MITCHELL et al., 2012; BRENNAN-KROHN; KIRBY, 2019).

Raros são os estudos que testaram a susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Leptospira*, possivelmente devido à dificuldade de cultivo e ao crescimento fastidioso da *Leptospira* a partir de amostras biológicas (LIEGEON et al., 2018). Porém, a espécie mais estudada de origem humana é *L. interrogans* e pequenas variações na suscetibilidade das cepas foram encontradas (CHAKRABORTY et al., 2010; CORREIA et al., 2019).

O teste de suscetibilidade *in vitro* de leptospiros patogênicas fornece informações importantes acerca das melhores estratégias antimicrobianas a ser utilizadas a nível populacional. Como há grande quantidade de espécies patogênicas existentes e o surgimento

constante de novas, inclusive validadas recentemente (VICENT et al., 2019), pesquisas podem revelar a evolução da suscetibilidade sob pressão dos antimicrobianos comumente usados. Estas informações são imprescindíveis para tomada de decisões clínicas de rotina (CHAKRABORTY et al., 2010, HARRIS et al., 2011), independente se os ensaios serão realizados com isolados clínicos ou cepas padrão.

A eficácia das cefalosporinas de terceira geração foi testada em diferentes sorovares de *Leptospira* pelo método *in vitro* de microdiluição em caldo (HARRIS et al., 2011; GOPI et al., 2021). Os sorovares reportados pelos autores foram: *L. borgpetersenii* sorovar Ballum; *L. interrogans* sorovar Australis, Autumnalis, Bataviae, Canicola, Portlandvere, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, *Kirschneri* sorovar Grippotyphosa; *Noguchii* sorovar Fortbragg; e *Weilii* sorovar Celledoni.

Correia et al. (2019) estudaram a susceptibilidade *in vitro* de *Leptospira* frente aos principais antimicrobianos utilizados para bovinos, pelo método de macrodiluição em caldo. Não encontraram a nível de espécie, nenhuma diferença na concentração inibitória mínima, exceto para tetraciclina. Porém a nível de sorovares, diferenças na MIC foram observadas entre as cepas de Sejroe, principalmente para ceftiofur e doxiciclina.

Em outro ensaio *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo, testaram as suscetibilidades de 46 isolados de *Leptospira* em ratos pelos principais antibióticos utilizados no tratamento da leptospirose (penicilina, doxiciclina, estreptomicina e cefalosporinas de amplo espectro) e observaram sensibilidade de todas as cepas. Isso mostrou que os antibióticos foram eficazes para o tratamento da leptospirose (CHAKRABORTY et al., 2010).

Murray e Hospenthal (2004) mostraram em seus experimentos que muitos antimicrobianos têm excelentes atividades *in vitro* contra *Leptospira*, e que a técnica de microdiluição em caldo possui boa reprodutibilidade com maior rendimento do que métodos de macrodiluição.

Suepaul et al. (2015) estudaram 67 cepas de *Leptospira* isoladas de cães e roedores. Concluíram que os agentes antimicrobianos (doxiciclina, penicilina, penicilina-estreptomicina, amoxicilina e ceftriaxona) foram eficazes contra o patógeno avaliado. No entanto, sulfatrimetoprim e gentamicina tiveram valores altos de MIC, sugerindo que eles podem ser menos eficazes no tratamento da leptospirose.

A exploração de medicamentos alternativos de várias fontes, incluindo plantas, tem sido uma tendência crescente e promissora na medicina para tratamento da infecção bacteriana por

leptospira. Resultados consistentes sobre a atividade anti-*Leptospira in vitro* de extratos de *Phyllanthus amarus* foram demonstrados por Ismail e colaboradores (2021).

Considerando os estudos anteriores é notável a susceptibilidade das leptospiros a vários agentes antimicrobianos, porém ainda não se tem relatos disponíveis sobre a ação de nanopartículas metálicas. Estas sabidamente possuem boa ação antibacteriana, sendo uma excelente alternativa para testar sua atividade anti-*Leptospira*, além do mais apresentam menor resistência, menor toxicidade e melhor eficácia em bactérias patogênicas.

2.4 Nanopartículas

A nanotecnologia pode ser definida como a ciência da manipulação de materiais ultrafinos em nível atômico, molecular ou supramolecular. Nanopartículas são partículas ultrafinas com tamanhos entre 1 e 100 nanômetros (nm) (KAUR et al., 2020).

Os nanocristais de óxido de zinco (ZnO) apresentam propriedades importantes, como alta atividade catalítica, estabilidade química e física, bem como absorção ultravioleta (UV) (TANKHIWALE; BAJPAI, 2012). Com intuito de aumentar a atividade catalítica de ZnO, utiliza-se a técnica de dopagem (agregação de nanopartículas metálicas), logo, há aumento da capacidade de induzir estresse oxidativo em bactérias, caracterizando um dos mecanismos de ação bactericida (ESPITIA et al., 2012; PATI et al., 2014). Devido seu pequeno tamanho e alta relação superfície-volume, as nanopartículas de ZnO apresentam atividade antimicrobiana evidente e toxicidade mínima para células humanas (REDDY et al., 2007).

De acordo com Kaur et al. (2020), nanopartículas de ZnO apresentam considerável atividade antibacteriana contra os seguintes microrganismos: *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, o tratamento de células bacterianas com nanopartículas causou alterações na permeabilidade da membrana, levando ao vazamento de ácido nucleico, indicando um provável mecanismo de ação (KAUR et al., 2020)

A dopagem de íons metálicos na matriz pura de ZnO, aumenta a área superficial, reduz o tamanho das partículas, aumenta a absorção de luz (PAL; SHARON, 2002). Metais como a prata (Ag) têm sido utilizados para dopar na estrutura de ZnO a fim de melhorar suas propriedades estruturais, ópticas, elétricas e catalíticas (SHARMA et al., 2020). Elas atuam de forma eficiente na rápida neutralização da carga elétrica superficial da membrana bacteriana e alteram sua permeabilidade causando morte celular (MANYASREE et al., 2018). Os autores afirmam ainda que a nanopartícula ZnO-Ag (óxido zinco dopada com prata) podem ser

utilizadas como agentes antimicrobianos contra infecções bacterianas, fúngicas e em práticas industriais e agrícolas (SHARMA et al., 2020).

Com o aumento de cepas multirresistentes devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos tanto na medicina humana como na medicina veterinária, nanopartículas de prata (AgNPs) tornaram-se uma ferramenta de escolha para tratar infecções causadas por microrganismos resistentes (Viana, et al., 2021). No entanto, especialmente a nanopartícula óxido de zinco dopada com prata (ZnO-Ag) têm se mostrado bastante promissora pela atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (NIGUSSIE et al., 2018).

Na última década, as AgNPs tornaram-se conhecidas como agentes antimicrobianos eficazes com baixa toxicidade para células de mamíferos (THAMMAWITHAN et al., 2021). Além das propriedades antibacterianas, as AgNPs têm ação cicatrizante em feridas (GRASSI; GRASSI, 2021; THAMMAWITHAN et al., 2021).

As características que as tornam potenciais agentes antimicrobianos estão relacionadas a seu tamanho, contêm cerca de 20 a 15.000 átomos de prata e diâmetros menores que 100 nm. Por isso, mesmo em baixas concentrações as nanopartículas de prata conseguem exibir uma notável atividade antimicrobiana, devido grande relação superfície-volume (OVES et al., 2018; YIN et al., 2020).

O mecanismo através do qual as nanopartículas de prata exercem seu efeito antibacteriano, ainda está sendo discutido. Bapat et al. (2018) e Khorrami et al. (2018) indicaram que devido nanopartículas de prata liberarem de forma constante íons de prata, e estes possuírem afinidade por proteínas que contêm enxofre que estão presentes na parede celular bacteriana, seria um mecanismo de matá-las. Devido essa afinidade, os íons de prata aderem a parede celular e membrana plasmática, levando a ruptura do envelope bacteriano.

Além da ruptura da parede e membrana celular, várias são as teorias sugeridas: desnaturação dos ribossomos (inibição da síntese proteica), interrupção da produção de ATP (desativação do sistema enzimático da cadeia respiratória), interferência na replicação de DNA (inativação da multiplicação celular) e por fim com a ruptura da membrana, as organelas são liberadas para fora do meio intracelular (YIN et al., 2020).

Outros autores afirmam que a grande área de contato com a bactéria associado ao tamanho reduzido (<100nm) facilita a invasão das nanopartículas dentro da célula, o que interfere na respiração e por fim provoca a morte celular (DURÁN et al., 2019). Devido a capacidade de matar bactérias por mecanismos complexos, as nanopartículas apresentam

grande potencial capaz de resolver parte do problema da resistência bacteriana (RAI et al., 2012).

Diante das várias características importantes apresentadas e dos mecanismos de ação frente a bactérias patogênicas, as nanopartículas de prata destacam-se pelo alto poder antimicrobiano. Surge então um questionamento acerca do potencial antibacteriano das nanopartículas de prata, elas seriam capazes de inibir o crescimento e controlar infecções causadas por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. De acordo com a literatura disponível não se encontrou publicações do uso de nanopartículas de prata com esta finalidade, portanto está sendo utilizada pela primeira vez.

2.5 Teste de toxicidade em modelo experimental *in vivo*: embrião de galinha

A indústria farmacêutica enfrenta desafios para desenvolver novos medicamentos que sejam seguros e eficazes. A responsabilidade que eles têm em garantir produtos seguros, é grande, pois qualquer erro causa sérios problemas para a saúde da população.

A avaliação da toxicidade dos fármacos é uma das etapas imprescindíveis na formulação de novos agentes antimicrobianos, normalmente é realizada em animais de laboratórios, porém nos últimos anos vem sendo substituídas por modelos alternativos (SHI et al., 2014; HRUBA et al., 2019). A determinação dos efeitos adversos de elementos químicos e drogas requer o uso de um modelo pré-clínico (KHOSRAVI et al., 2018).

Nos últimos anos, o embrião de galinha (EG) está sendo muito utilizado como modelo animal *in vivo* para estudar a toxicidade de drogas e infecções (Zosen et al., 2021). Várias pesquisas ao invés de utilizar animais como camundongos, hamsters, ratos, coelhos estão optando por EG, devido as vantagens apresentadas. Sem dúvida, a principal vantagem é o baixo custo do experimento, o descarte dos embriões relativamente fácil, não requer anestésias, utiliza poucos instrumentos cirúrgicos (GANDARA et al., 2008).

O embrião de galinha fornece um modelo adequado para avaliação *in vivo* da toxicidade, biodistribuição, biocompatibilidade, e farmacocinética da droga devido à simplicidade, baixo custo, boa reprodutibilidade dos resultados, uma vez que os aspectos éticos e legais são também reduzidos (VARGAS et al., 2007; HASELGRÜBLER et al., 2017; KHOSRAVI et al., 2018). Além disso, compartilha semelhanças morfológicas, bioquímicas e genéticas com seres humanos e também com espécies de mamíferos, tornando-os ideais para teste de segurança de novas drogas (WACHHOLZ et al., 2021).

Os ensaios pré-clínicos avaliam o potencial terapêutico de um determinado medicamento e ainda a segurança para o uso final. Os parâmetros avaliados normalmente são a toxicidade, viabilidade ou taxa de sobrevivência, peso do embrião, potencial carcinogênico, alterações micro e macroscópicas e mensurações de metabólitos (KHOSRAVI et al., 2018; HRUBA et al., 2019; Zosen et al., 2021).

Gandara et al. (2008) utilizaram como modelo experimental, embriões de galinha que demonstraram capacidade de reproduzir alterações intestinais da gastrosquise humana. Em outro estudo avaliaram as condições diabéticas em embriões de galinha, em substituição a modelos animais como cães e roedores (SHI et al., 2014). Além destas patologias estudadas, é possível estudar o efeito toxicológico de antibióticos como enrofloxacina e marbofloxacina em ovos embrionados (*Gallus Gallus domesticus*). A biodistribuição para o cérebro foi testada em modelo alternativo para avaliar drogas antiepilépticas, ácido valpróico e lamotrigina, em dois estágios de desenvolvimento do embrião (HRUBA et al., 2019).

Por estes e outros motivos que o modelo de embrião de galinha tem potencial ainda inexplorado em testes pré-clínicos, atendendo aos princípios dos 3Rs (reduzir, reutilizar e reciclar) como modelo alternativo aos camundongos e ratos de laboratório (Zosen et al., 2021).

REFERENCIAS

ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015.

ADLER, B; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012

ALTHEIMER, K. et al. *Leptospira* infection and shedding in dogs in Thailand. **BMC veterinary research**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2020. DOI: 10.1186/s12917-020-2230-0

BALBONI, A. et al. Identification of Serogroups Australis and Icterohaemorrhagiae in Two Dogs with a Severe Form of Acute Leptospirosis in Italy. **Pathogens**, v. 9, n. 5, p.1-6, 2020. DOI: 10.3390/pathogens9050351

BAPAT, R. A. et al. An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. **Materials Science and Engineering: C**, v. 91, p. 881-898, 2018. DOI:10.1016/j.msec.2018.05.069

BARRAGAN, V. et al. High *Leptospira* Diversity in Animals and Humans Complicates the Search for Common Reservoirs of Human Disease in Rural Ecuador. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, p. 1-14, 2016. DOI: doi.org/10.1371/journal.pntd.0004990

BERTASIO, C. et al. Detection of new leptospira genotypes infecting symptomatic dogs: is a new vaccine formulation needed?. **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 1-19, 2020. DOI: 10.3390/pathogens9060484

BOUÇAS, R. C. R.; COSTA, E. F. Uso da doxiciclina para tratamento de Leptospirose. **Nosso Clínico**. n. 47, p. 60- 64, 2005.

BRENNAN-KROHN, T.; KIRBY, J. E. Antimicrobial Synergy Testing by the Inkjet Printer-assisted Automated Checkerboard Array and the Manual Time-kill **Method. Journal of Visualized Experiments**, n. 146, p. 58636, 2019. DOI: 10.3791/58636

BRETT-MAJOR, D. M.; COLDREN, R. **Antibiotics for leptospirosis**. Cochrane Database of Systematic Reviews, n. 2, 2012. DOI: 10.1002/14651858.CD008264.pub2

CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 5, p. 760–768, set. 2009. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.06.009

CHAKRABORTY, A. et al. In vitro sensitivity and resistance of 46 *Leptospira* strains isolated from rats in the Philippines to 14 antimicrobial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5403-5405, 2010. DOI: 10.1128/AAC.00973-10

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically**. Standard Approved, 11^a ed. Documento CLSI M07-A10 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, pp. 1-87, 2018.

CORREIA, L.; LOUREIRO, A. P.; LILENBAUM, W. Reduced susceptibility in leptospiral strains of bovine origin might impair antibiotic therapy. **Epidemiology & Infection**, v. 147, p.1-6, 2019. DOI: 10.1017/S0950268818002510

DI AZEVEDO, M. I. N.; LILENBAUM, W. An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 496–508, 2021. DOI: 10.1111/lam.13442

DURÁN, N. et al. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**, v. 42, n.2, p. 206-213, 2019. DOI:10.21577/0100-4042.20170318

ESPITIA, P. J. P. et al. Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. **Food and bioprocess technology**, n.5, n.5, p.1447-1464, 2012. DOI: 10.1007/s11947-012-0797-6

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. Melbourne: MediSci, 1999. 272p.

FORNAZARI, F. et al. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 90, n. 3, p. 321-326, 2012. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.06.005

FRAUNE, C. et al. Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs in a referral center. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 242, n. 10, p. 1373-1380, 2013. DOI: 10.2460/javma.242.10.1373

FREIRE, N. B. et al. Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata sobre isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de organismos aquáticos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n.2, p. 244-249, 2018. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-4805

GANDARA, C. A. T.; ARAÚJO, E.S.; MOTTA, U. I. C. Chicken embryo as an experimental model for the study of gastroschisis. **Acta cirúrgica brasileira**, v. 23, n.3, p. 247-252, 2008. DOI: 10.1590/S0102-86502008000300006

GARCÍA-VÁZQUEZ, E. et al. Leptospirosis. **Medicine: Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, v. 10, n. 57, p. 3896–3902, 2010. DOI: 10.1016/S0304-5412(10)70133-5

GEETHA, M.; SELVARAJU, G. Canine leptospirosis: Clinical and molecular diagnosis associated therapeutic management. **The Pharma Innovation Journal**, v. 10, n. 9, p. 264-266, 2021.

GOLDSTEIN, R. E. et al. Influence of Infecting Serogroup on Clinical Features of Leptospirosis in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 489–494, 2006. DOI: 10.1892/0891-6640(2006)20[489:ioisoc]2.0.co;2

GOPI, C. et al. Recent Progress in the Treatment of Leptospirosis. **SN Comprehensive Clinical Medicine**, v.3, n.12, p. 1-8, 2021. DOI:10.1007/s42399-021-00833-3

GRASSI, L. T.; GRASSI, V. M.T. Ação da nanopartícula de prata no processo de cicatrização de ferida: uma revisão sistemática. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 58109-58131, 2021. DOI:10.34117/bjdv7n6-286

GREENE, C. E. et al. **Leptospirosis**. In: Infectious Diseases of the Dog and Cat. 3rd edn. Ed C. E. Greene. St Louis, Saunders Elsevier 2006, pp 402-417.

GRELA, E.; KOZŁOWSKA, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 4, p. 303–311, 2018. DOI: 10.1016/j.acthis.2018.03.007

HAAKE, D. A. et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 4, p. 2276-2285, 2000. DOI: 10.1128/IAI.68.4.2276-2285.2000

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Subclinical leptospirosis may impair athletic performance in racing horses. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 8, p. 1927-1930, 2012. DOI:10.1007/s11250-012-0158-5

HARRIS, B. M. et al. In vitro and in vivo activity of first generation cephalosporins against *Leptospira*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 5, p. 905-908, 2011. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.11-0352

HASELGRÜBLER, R. et al. Gluc-HET, a complementary chick embryo model for the characterization of antidiabetic compounds. **Plos One**, v. 12, n. 8, p. 1-12, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0182788

HENDIGER, E. B. et al. Tannic acid-modified silver nanoparticles enhance the anti-Acanthamoeba activity of three multipurpose contact lens solutions without increasing their cytotoxicity. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p.1-8, 2020. DOI: 10.1186/s13071-020-04453-z

HRUBA, H. et al. Reproductive toxicity of fluoroquinolones in birds. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 1-8, 2019. DOI: 10.1186/s12917-019-1957-y

ISMAIL, Che Ain Munirah et al. In Vitro Anti-Leptospiral Activity of Phyllanthus amarus Extracts and Their Combinations with Antibiotics. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 6, p. 1-13, 2021. DOI: 10.3390/ijerph18062834

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 11, p. 1749–1755, dez. 2009. DOI: 10.1086/647952

JUVET, F. et al. Urinary shedding of spirochaetes in a dog with acute leptospirosis despite treatment. **Veterinary Record**, v. 168, n. 21, p. 564–564, 2011. DOI: 10.1136/vr.d740

KAUR, T. et al. Zinc oxide nanoparticles inhibit bacterial biofilm formation via altering cell membrane permeability. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 51, n.4, p. 309-319, 2021. DOI: 10.1080/10826068.2020.1815057

KHORRAMI, S. et al. Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7 tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 8013, 2018. DOI: 10.2147/IJN.S189295

KHOSRAVI, A. R. et al. Chemical composition, antioxidant activity and antifungal effects of five Iranian essential oils against Candida strains isolated from urine samples. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 28, n. 2, p. 355-360, 2018. DOI: 10.1016/j.mycmed.2018.01.005

KNÖPFLER, S. et al. Evaluation of clinical, laboratory, imaging findings and outcome in 99 dogs with leptospirosis: Case study of leptospirosis in 99 dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 58, n. 10, p. 582–588, 2017. DOI: 10.1111/jsap.12718

KOBAYASHI, Y. Clinical observation and treatment of leptospirosis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 7, n. 2, p. 59–68, 2001. DOI: 10.1007/s101560100011

LE TURNIER, P.; EPELBOIN, L. Mise au point sur la leptospirose. **La Revue de Médecine Interne**, v. 40, n. 5, p. 306–312, 2019. DOI 10.1016/j.revmed.2018.12.003

LEITE, R. F. **Concentração inibitória mínima de extratos brutos produzidos por actinobactérias para agentes causadores de mastite bovina**. 2016. 96f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2016.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001. DOI: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001

LEVETT, P.N. Systematics of leptospiraceae. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 387, p. 11–20, 2015. DOI: 10.1007/978-3-662-45059-8_2

LIEGEON, G.; DELORY, T.; PICARDEAU, M. Antibiotic susceptibilities of livestock isolates of leptospira. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 5, p. 693–699, 2018. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.12.024

MANJUMEENA, R. et al. Biogenic nanosilver incorporated reverse osmosis membrane for antibacterial and antifungal activities against selected pathogenic strains: An enhanced eco-friendly water disinfection approach. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 49, n. 10, p. 1125–1133, 2014. 10.1080/10934529.2014.897149

MANYASREE, D.; KIRANMAYI, P.; KOLLI, V. R. Characterization and antibacterial activity of ZnO nanoparticles synthesized by co precipitation method. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, v. 10, n.6, p.224–228, 2018. DOI: 10.22159/ijap.2018v10i6.29376

MARTIN, P. L. et al. Diagnosis of canine leptospirosis: evaluation of two PCR assays in comparison with the microagglutination test. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 4, p. 255–262, abr. 2019. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-5868

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. **Research in Veterinary Science**, v. 112, p. 156–160, 2017. DOI: 10.1016/j.rvsc.2017.03.021

MARTINS, M.H DA. M.; SPINK, M.J.P. A leptospirose humana como doença duplamente negligenciada no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 3, p. 919–928, 2020. DOI: 10.1590/1413-81232020253.16442018

MIOTTO, B. A. et al. Development and validation of a modified TaqMan based real-time PCR assay targeting the lipL32 gene for detection of pathogenic *Leptospira* in canine urine samples. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 584–590, 2018a. DOI: 10.1016/j.bjm.2017.09.004

MIOTTO, B. A. et al. Diagnosis of acute canine leptospirosis using multiple laboratory tests and characterization of the isolated strains. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, article 222, p.1–9, dez. 2018b. DOI: 10.1186/s12917-018-1547-4

MITCHELL, G. et al. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 3, p. 559–568, 2012. DOI: 10.1093/jac/dkr510

MOHAMMED, H. et al. LEPTOSPIRA: Morphology, Classification and Pathogenesis. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 02, n. 06, p. 2-6, 2011. DOI: 10.4172/2155-9597.1000120

MORENO, L. Z. et al. Comparative genomic analysis of Brazilian *Leptospira kirschneri* serogroup Pomona serovar Mozdok. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 8, p. 539–541, 2016. DOI: 10.1590/0074-02760160174

MUGHINI-GRAS, L. et al. Application of an integrated outbreak management plan for the control of leptospirosis in dairy cattle herds. **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 6, p. 1172–1181, 2014. DOI: 10.1017/S0950268813001817

MURRAY, C. K.; HOSPENTHAL, D. R. Broth microdilution susceptibility testing for *Leptospira* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1548-1552, 2004. DOI: 10.1128/AAC.48.5.1548-1552.2004

NIGUSSIE, G.Y. et al. Antibacterial activity of Ag-doped TiO₂ and Ag-doped ZnO nanoparticles. **International Journal of Photoenergy**, v. 2018, p.1-7, 2018. DOI: 10.1155/2018/5927485

OIE. **Leptospirosis**, Chapter 2.2.4. World Organisation for Animal Health, 2006.

Organização Mundial da Saúde. **Human leptospirosis : guidance for diagnosis, surveillance and control**. [s.l.] World Health Organization, 2003. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42667/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf?sequence=1. Acesso em: 09 nov. 21.

OVES, M. et al. Antimicrobial and anticancer activities of silver nanoparticles synthesized from the root hair extract of *Phoenix dactylifera*. **Materials Science and Engineering: C**, v. 89, p. 429–443, 2018. DOI: 10.1016/j.msec.2018.03.035

PAES, A. C. Leptospirose canina. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.; **Doenças Infeciosas em Animais de Produção e de Companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 356-377.

PAL, B.; SHARON, M. Enhanced photocatalytic activity of highly porous ZnO thin films prepared by sol–gel process. **Materials Chemistry and Physics**, 2002, v.76, n.1, p. 82-87, 2002. DOI:10.1016/S0254-0584(01)00514-4

PANAPHUT, T. et al. Ceftriaxone Compared with Sodium Penicillin G for Treatment of Severe Leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 12, p. 1507–1513, 2003. DOI: 10.1086/375226

PARTE, A.C. et al. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.70, n.11, p.5607-5612, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004332

PATI, R. et al. Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane disintegration in macrophages. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, n. 6, p. 1195-1208, 2014. DOI: 10.1016/j.nano.2014.02.012

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, n. 1, p. 1–9, 2013. DOI: 10.1016/j.medmal.2012.11.005

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 297–307, 2017. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.5

POLACHINI, C. O.; FUJIMORI, K. Leptospirose canina e humana, uma possível transmissão conjuntival no Município de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Pan-Amaz Saúde**, v. 6, n. 3, p. 59-65, 2015. DOI: 10.5123/S2176-62232015000300008

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed Editora, 2005. 512p.

RAI, M. K. et al. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 112, n. 5, p. 841-852, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x

REAGAN, K.L; SYKES, J.E. Diagnosis of Canine Leptospirose. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 49, n. 4, p.719-731, 2019. DOI:https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.008

REDDY, K. M., et al. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. **Applied Physics Letters**, v. 90, n. 21, p. 2139021-2139023, 2007. DOI: 10.1063/1.2742324

RESSNER, R. A. et al. Antimicrobial Susceptibilities of Geographically Diverse Clinical Human Isolates of *Leptospira*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2750–2754, ago. 2008. DOI: 10.1128/AAC.00044-08

RIBEIRO, A. M. F. **Farmacologia dos Antibióticos Aminoglicosídeos**. 2017. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 72 f. 2017.

RISSI, D. R.; BROWN, C. A. Diagnostic features in 10 naturally occurring cases of acute fatal canine leptospirosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, n. 6, p. 799–804, 2014. DOI: 10.1177/1040638714553293

RODRIGUES, A.L. Perfil epidemiológico de pacientes acometidos por leptospirose em um estado brasileiro na Amazônia Ocidental. **Revista Sustinere**, v. 7, n. 1, p.32–45, 2019. DOI: 10.12957/sustinere.2019.39824

ROHILLA, P. et al. Detection of *Leptospira* in urine of apparently healthy dogs by quantitative polymerase chain reaction in Haryana, India. **Veterinary World**, v. 13, n. 11, p. 2411–2415, 2020. DOI : 10.14202/vetworld.2020.2411-2415

ROSSI, F.; ANDREAZZE, D. **Resistência Bacteriana: Interpretando o antibiograma**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 118p.

SANTOS, A. P. L.; SANTOS, H. P. Leptospirose canina: conscientização e importância da realização de ações educativas de prevenção em uma comunidade no Maranhão. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 1495–1505, 2021. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-103>

SANTOS, C. M. et al. Molecular and serological characterization of pathogenic *Leptospira* spp. isolated from symptomatic dogs in a highly endemic area, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2021. DOI: 10.1186/s12917-021-02930-w

SCHULLER, S. et al. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 3, p. 159–179, 2015. DOI: 10.1111/jsap.12328

SEVÁ, A. P. et al. Seroprevalence and incidence of *Leptospira* spp. in domestic dogs in the Southeast region of São Paulo State, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 5, p. 399–407, 2020. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-6390

SHARMA, R.; G. R.; KUMARI, A. A review on biogenic synthesis, applications and toxicity aspects of zinc oxide nanoparticles. **EXCLI Journal**, v. 19, p. 1325-1340, 2020. DOI: 10.17179/excli2020-2842

SHI, L. et al. Chicken embryos as a potential new model for early onset type I diabetes. **Journal of Diabetes Research**, v. 2014, article ID 354094, p.1-10, 2014. DOI: 10.1155/2014/354094

SINGH, H.; DU, J.; YI, T.-H. Green and rapid synthesis of silver nanoparticles using *Borago officinalis* leaf extract: anticancer and antibacterial activities. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, n. 7, p. 1310–1316, 2017. DOI: 10.1080/21691401.2016.1228663

SOARES, P. M. et al. Serological and molecular characterization of *Leptospira kirschneri* serogroup Grippotyphosa isolated from bovine in Brazil. **Microbial Pathogenesis**, v. 138, article 103803, p.1-5, 2020. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103803

SOUZA, A. A. T. et al. Variação sazonal e aspectos clínico-epidemiológicos da leptospirose humana na cidade de Itaperuna–RJ. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 24, n. 2, p. 155-159, 2014. DOI: <http://www.dx.doi.org/10.5935/2238-3182.20140046>

SUEPAUL, S. M. et al. Antimicrobial susceptibility of *Leptospira* isolates from dogs and rats to 12 antimicrobial agents. **Tropical Biomedicine**, v. 32, n. 1, p. 1-10, 2015. PMID: 25801249.

SUMARNINGSIH et al. Recombinant LipL32 Protein for Leptospirosis Detection in Indonesia. **Procedia Chemistry**, v. 18, p. 18–25, 2016. DOI: 10.1016/j.proche.2016.01.004

SUPUTTAMONGKOL, Y. et al. Strategies for Diagnosis and Treatment of Suspected Leptospirosis: A Cost-Benefit Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, e. 610, p.1-6, 2010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000610

SYKES, J. E. et al. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 1, p. 1-13, 2011. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x

TANKHIWALE, R.; BAJPAI, S. K. Preparation, characterization and antibacterial applications of ZnO-nanoparticles coated polyethylene films for food packaging. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 16-20, 2012. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.09.031

THAMMAWITHAN, S. et al. A Biological Study of Anisotropic Silver Nanoparticles and Their Antimicrobial Application for Topical Use. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 9, article. 177, p.1-15, 2021. DOI: 10.3390/vetsci8090177

TORRES-CASTRO, M. et al. Revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis. **Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 54, n. 5, p. 620-625, 2016.

VARGAS, A. et al. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 11, p. 1162-1176, 2007. DOI: 10.1016/j.addr.2007.04.019

VASCONCELLOS, S.A. **Leptospirose animal**. In: III Encontro Nacional em Leptospirose, Rio de Janeiro, 1993. p.62-65.

VIANA, A. V. et al. Antimicrobial potential of silver nanoparticles stabilized in curcumin and cashew leaf extract (*Anacardium occidentale* L.). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, e. 47610918364, p.1-10, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i9.18364

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAM, A. N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **Journal of Biosciences**, v. 33, n.4, p. 557-569, 2008. DOI: 10.1007/s12038-008-0074-z

VINCENT, A. T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. e.0007270, p.1-25, 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007270

VITALE, M. et al. Human leptospirosis cases in Palermo Italy. The role of rodents and climate. **Journal of Infection and Public Health**, v. 11, n. 2, p. 209–214, 2018. DOI: 10.1016/j.jiph.2017.07.024

WACHHOLZ, G. E. et al. From the farm to the lab: how chicken embryos contribute to the field of teratology. **Frontiers in Genetics**, v. 12, article 666726, p.1-11, 2021. DOI: 10.3389/fgene.2021.666726.

XU, C. al. Diagnosis of canine leptospirosis by a highly sensitive FRET-PCR targeting the lig genes. **PloS one**, v. 9, n. 2, e.89507, p.1-8, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0089507

YIN, I. X. et al. The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 2555, 2020. DOI: 10.2147/IJN.S246764

ZAKERI, S. et al. *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 2, p. 273-277, 2010. DOI: 10.1016/j.meegid.2010.01.001

ZOSEN, D. et al. Chicken embryo as animal model to study drug distribution to the developing brain. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 112, 2021. DOI: 10.1016/j.vascn.2021.107105

CAPÍTULO 2

Alterações clínico-patológicas, diagnóstico sorológico e molecular em cães com suspeita de leptospirose

Artigo será submetido à Revista Semina: Ciências Agrárias

Alterações clínico-patológicas, diagnóstico sorológico e molecular em cães com suspeita de leptospirose

Resumo

A leptospirose é uma zoonose de importância mundial que causa mortes tanto em humanos, como em animais, especialmente em cães não vacinados. A infecção em cães ocorre pelo contato com urina ou água contaminada pela bactéria espiroqueta patogênica do gênero *Leptospira*. Objetivou-se avaliar dois testes diagnósticos na caracterização de cães com leptospirose, e associar com as principais alterações clínicas-patológicas de cães suspeitos. Foram atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia no período de setembro de 2019 a setembro de 2020, 24 cães com suspeita clínica de leptospirose canina. Exames complementares como hemograma completo, dosagens séricas de creatinina, ureia, ALT (alanina aminotransferase), FA (fosfatase alcalina) foram solicitados. Para o diagnóstico confirmatório de leptospirose foi realizado teste sorológico pelo teste de aglutinação microscópica (MAT) e também teste molecular pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Dos 24 casos de cães suspeitos de leptospirose, 6 (25%) foram positivos no MAT, e 3 (12,5%) no qPCR, sendo 1 (4,17%) positivo nos dois testes diagnósticos avaliados. Quando se associou MAT + qPCR a positividade foi para 8/24 (33,3%). Os sorogrupos reativos predominantes foram Icterohaemorrhagiae (33,33%) e Djasiman (33,33%), seguido de Ballum (16,60%). A sensibilidade e especificidade da qPCR em relação teste padrão ouro (MAT) foi 16,7 % e 88,9%, respectivamente. Houve alterações nos níveis séricos de creatinina, ureia e FA no grupo positivo aos testes diagnósticos (MAT/qPCR), porém somente ureia e FA apresentaram valores elevados no grupo negativo. Quando se comparou os parâmetros bioquímicos no grupo positivo aos testes diagnósticos (MAT/qPCR), e negativo, não se observou nenhuma diferença estatística significativa entre os elementos avaliados ($p>0,05$). Conclui-se para o diagnóstico de leptospirose canina aguda, o médico veterinário deve solicitar o MAT de forma pareada, e o qPCR de urina para aumentar as chances de diagnóstico. A qPCR se mostra como uma ferramenta diagnóstica complementar quando aliada ao MAT e aos achados clínicos-patológicos resultando no direcionamento correto de tratamento e manejo de cães com suspeita de leptospirose.

Palavras-chave: bioquímica sérica, canino, *Leptospira* spp., MAT, qPCR, sensibilidade

Introdução

A leptospirose é uma zoonose de importância mundial que causa mortes tanto em humanos, como em animais, especialmente em cães não vacinados. A infecção em cães ocorre pelo contato com urina ou água contaminada pela bactéria espiroqueta patogênica do gênero *Leptospira* (Curtis et al., 2015; Schuller et al., 2015).

Os cães são considerados suscetíveis à infecção e podem representar fontes potenciais na transmissão da doença em virtude da contaminação do ambiente com leptospirosas patogênicas. Relatos atuais mostraram o

ressurgimento da doença clínica em cães e seres humanos, devido a aproximação estabelecida entre essas espécies nos últimos anos (Hartskeer, Collares-Pereira, & Ellis, 2011; Schuller et al., 2015; Meny et al., 2019), o que torna de suma importância a atualização de técnicas de diagnóstico e prevenção da doença.

Em áreas urbanas o cão é uma das principais fontes de infecção da leptospirose humana, podendo eliminar as leptospirosas vivas na urina de forma intermitente (portador renal), e por período prolongado mesmo não apresentando sinais clínicos (Paes, 2016). O estágio de portador renal crônico não está necessariamente relacionado a presença de anticorpos séricos, o que restringe a identificação de cães infectados e assintomáticos (Greene, Sykes, Brown, & Hartmann, 2006; Robi, 2020).

O diagnóstico da leptospirose é complexo, pois os sinais clínicos apresentados pelo animal são inespecíficos (Mohammed, Nozha, Hakim, & Abdelaziz, 2011; Robi, 2020). Frequentemente apresentam febre, icterícia, anorexia e/ou alterações laboratoriais tais como uremia, leucocitose, plaquetopenia. A associação destas alterações pode manifestar-se desde uma infecção subclínica até uma doença aguda e fatal (Curtis et al., 2015). Uma vez que os achados clínicos são inespecíficos é importante realizar testes sorológicos e moleculares a fim identificar o patógeno, tais como: teste de aglutinação microscópica (MAT) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Schuller et al., 2015).

O teste de aglutinação microscópica é considerado o teste sorológico padrão ouro, utilizado mundialmente e preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (2003), porém, durante os estágios iniciais da doença, apresenta baixa sensibilidade, sendo recomendado duas amostras: uma na fase aguda e outra na fase convalescente da doença (Harkin, Roshto, Sullivan, Purvis, & Chengappa, 2003; Miotto et al., 2018a), o que nem sempre é possível, pois o animal pode ir a óbito antes deste período. Sabendo que os anticorpos anti *Lepstospira* spp. aumentam a níveis detectáveis somente aproximadamente duas semanas pós infecção, é importante avaliar sobre qual tipo de amostra e o teste mais apropriado para cada fase da doença (Reagan & Sykes, 2019).

A PCR é um teste diagnóstico mais útil no início do curso da doença porque o número de bactérias no sangue e na urina neste momento está elevada devido a fase de bacteremia, que pode durar até 10 dias (Greenlee, Alt, Bolin, Zuerner, & Andreasen, 2005). As bactérias são eliminadas na urina, pois são capazes de invadir o tecido renal e hepático, entre outros órgãos (Sykes et al., 2011). Dessa forma, a PCR torna-se uma opção de ferramenta diagnóstica a fim de detectar DNA da bactéria em amostras de urina de cães leptospirúricos (Zakeri et al., 2010). A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) melhora a sensibilidade do ensaio, além de ser menos propenso a contaminação em comparação com os ensaios da PCR convencional (Reagan & Sykes, 2019).

Segundo Miotto et al. (2018b), o uso simultâneo de MAT e PCR foi capaz de aumentar o diagnóstico de leptospirose em casos de cães com suspeita clínica de leptospirose. Estudos realizados por Waggoner et al. (2015) também demonstraram a importância estratégica de associação entre as duas técnicas para maximizar a detecção de casos suspeitos.

Objetivou-se avaliar dois testes diagnósticos na caracterização de cães com leptospirose e associar com as principais alterações clínicas-patológicas de cães suspeitos.

1 **Materiais e Métodos**

2

3 O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de
4 Uberlândia, sob análise final nº A013/19.

5

6 *Delineamento experimental*

7

8 Foram atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia no período de
9 setembro de 2019 a setembro de 2020, 24 cães com suspeita clínica de leptospirose canina.

10 O critério de inclusão no estudo foi que animal apresentasse sintomas clínicos compatíveis com
11 leptospirose (febre, prostração, hiporexia, icterícia) e após avaliação clínica inicial e após avaliação clínica
12 inicial solicitar exames laboratoriais complementares como hemograma completo, dosagens séricas de
13 creatinina, ureia, ALT (alanina aminotransferase), FA (fosfatase alcalina) e exame sorológico confirmatório
14 (MAT). Porém, somente 18 casos com suspeita clínica de leptospirose foi encaminhado para exame
15 confirmatório pelo médico veterinário. As seis amostras restantes foram adquiridas da rotina do LCVET
16 (Laboratório Clínico Veterinário do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia - UFU),
17 selecionadas a partir dos pedidos que continham suspeita clínica de cães com leptospirose.

18 Amostras de sangue colhidas em tubos sem anticoagulante foram encaminhadas ao Laboratório de
19 Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia
20 (LADOC) para realização dos exames sorológicos (MAT). Uma amostra de urina foi colhida de cada animal
21 por cistocentese para posterior realização da qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real).

22 Nas amostras de soro de cada animal foram determinadas as concentrações de creatinina (método
23 picrato alcalino), ureia (método enzimático cinético UV), ALT - alanina aminotransferase (método Cinético
24 UV IFCC), e fosfatase alcalina (método Cinético Optimizado), em analisador automático multicanal
25 ChemWell (Awareness Technology Inc., Palm City, FL, USA), no LCVET (utilizando os kits comerciais da
26 Labtest Diagnostica®). O analisador foi previamente calibrado com calibra H e aferido com soro controle
27 universal qualitol H, ambos produzidos pela Labtest Diagnostica®.

28 As amostras de sangue colhidas de cada animal em tubos com EDTA K₂ para realização do
29 hemograma, foram processadas em analisador hematológico veterinário PocH 100iv diff™ (Sysmex), após
30 confeccionou-se extensões sanguíneas para contagem diferencial de leucócitos, coradas pelo método de May-
31 Grunwald Giemsa (Ferreira Neto, Viana, & Magalhães, 1982). Identificou-se em cada extensão sanguínea 100
32 células em microscopia óptica, com objetiva de imersão (100x) e estabeleceu as fórmulas leucocitárias relativa
33 e absoluta.

34 Informações sobre sinais clínicos, idade, sexo, e histórico de vacinação foram compiladas dos
35 prontuários de cada animal.

36

37

38

1 *Exame sorológico*

2

3 As cepas vivas de *Leptospira* spp. são mantidas no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da
4 Universidade Federal de Uberlândia, as quais são repicadas semanalmente em meio de cultura EMJH
5 (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris Difco®), enriquecido com 10% de soro de coelho, e mantidos em
6 estufa a 30°C.

7 O teste de aglutinação microscópica (MAT) foi utilizado para avaliar a presença de anticorpos anti
8 *Leptospira* spp. no soro do animal incluindo um painel de 12 sorovares (Bratislava, Canicola, Djasiman,
9 Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Hardoprajtino, Wolffii, Pomona, Castellonis, Tarassovi,
10 Grippotyphosa), representando 10 sorogrupos (Australis, Canicola, Djasiman, Hebdomadis,
11 Icterohaemorrhagiae, Sejroe, Pomona, Ballum, Tarassovi, Grippotyphosa) (Tabela 1). As amostras de soro
12 foram diluídas inicialmente a 1:50 (2,45 mL de salina tamponada a 85% e 50 µL do soro). Em seguida 50µL
13 da cultura viva de cada sorovar foi adicionado a 50µL da diluição inicial do soro em uma placa de 96 poços, e
14 após uma hora de incubação a 30°C, procedeu-se a leitura em microscópio de campos escuro (Carl Zeiss®
15 modelo Axio Scope).

16 Foi considerado positivo na triagem, o soro com no mínimo 50% de aglutinação, em título igual ou
17 maior (≥ 100), comparando com uma cultura de controle diluída 1/2 em solução salina tamponada a 85%. As
18 amostras de soro reagentes na triagem foram tituladas a diluições crescentes (1:200; 1:400; 1:800; 1:1600) a
19 fim de determinar o ponto final de reação, segundo Organização Mundial de Saúde (2003).

20

21 *Exame molecular*

22

23 As amostras de urina foram separadas em alíquotas de 2 mL e armazenadas em microtubos a 20° C,
24 até o envio ao Laboratório de Diagnóstico Molecular Veterinário - LDMVET, onde foram processadas.

25 A PCR em tempo real (qPCR) foi realizada conforme protocolo padronizado e descrito por Stoddard,
26 Gee, Wilkins, McCaustland e Hoffmaster (2009), com adaptações do laboratório - LDMVET. Para a extração
27 de material genético utilizou-se kit de extração de DNA, seguindo as recomendações do fabricante. Em todas
28 as reações foram usados controles positivos, obtidos de amostra naturalmente infectada, a qual foi sequenciada
29 pelo método de Sanger e confirmada com 100% de identidade. Como controle negativo foi usada água livre
30 de ácidos nucleicos. A sequência dos primers selecionados LipL32-45F (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG
31 TG-3 ') e LipL32-286R (5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3 '), reconhecem o gene LipL32, proteína
32 abundante da membrana externa presente exclusivamente em espécies patogênicas de *Leptospira* spp.

33

34 *Análise Estatística*

35

36 Para avaliar a associação e concordância entre os dois testes diagnósticos (MAT e qPCR), utilizou-se
37 o Teste Exato de Fisher e Teste *Kappa* com 5% de significância, respectivamente, p-valores menores que 0,05
38 foram considerados estatisticamente significativos.

Para fins de comparação dos resultados bioquímicos séricos, considerou-se dois grupos, positivo ou negativo, aos testes diagnósticos (MAT/qPCR) para cães com suspeita de leptospirose. Os dados bioquímicos foram submetidos ao teste de normalidade (Anderson-Darling, 5% de significância), pelo programa Action 2020, porém somente a ureia apresentou distribuição normal, então neste caso, optou-se pelo teste paramétrico T-Student, para comparação entre os grupos. Já a creatinina, ALT e FA como não apresentaram distribuição normal, optou-se pelo teste não paramétrico (Wilcoxon), com 5% de significância.

O programa utilizado para as análises estatísticas foi IBM SPSS Statistics para Windows, Versão 20.0, e GraphPad Prism versão 8.0.0 para Windows, utilizado para construção das representações gráficas (Box-plots).

Resultados e Discussão

Dos 24 cães suspeitos de leptospirose, 6 (25%) foram reagentes ao MAT, e 3 (12,5%) no qPCR, sendo 1 (4,17%) positivo nos dois testes diagnósticos avaliados (Tabela 2.), totalizando 8 animais detectados em pelo menos um teste. Quando se associou MAT e qPCR a positividade foi para 8/24 (33,3%), mostrando um aumento no reconhecimento de animais verdadeiramente positivos.

O MAT foi capaz de detectar os títulos de anticorpos contra *Leptospira* sp. em 25% dos casos de cães com suspeita clínica, enquanto a qPCR (12,5%). Resultados semelhantes foram observados em estudos realizados por Martin, Stanchi, Brihuega, Galli e Arauz (2019), no qual confirmou pelo MAT, 7 num total de 51 cães suspeitos (13,7%), sendo 6 (11,7%) detectados em PCR-*lipL* 32 em tempo real. Troia et al. (2018) também associaram duas ferramentas diagnósticas no mesmo grupo de animais, e obtiveram 10,3 % de positividade na qPCR, contudo no teste padrão-ouro (MAT) a porcentagem foi mais expressiva de 76,2%. Embora o ensaio MAT continue a ser a técnica mais sensível e padrão para o diagnóstico, esses resultados mostram a importância da complementariedade das técnicas sorológicas e moleculares, ou seja, quando é utilizado em conjunto, provam ser mais eficientes no diagnóstico de doenças infecciosas, principalmente no caso da leptospirose canina (Martin et al., 2019; Meira, Wenseslau, Carvalho, Correa, & Albuquerque, 2011; Miotto et al., 2018b), assim pode-se evitar diagnósticos incorretos, facilitando o adequado tratamento e manejo dos animais.

Enquanto os anticorpos são detectados em torno 14 dias na circulação após a infecção, leptospiras são eliminadas na urina de forma intermitente desde 72 horas após a infecção até semanas e meses nos animais domésticos (LEVETT, 2001). A PCR é uma ferramenta diagnóstica utilizada não só para confirmação da leptospirose aguda em cães, mas também na identificação de casos crônicos sem que haja manifestação clínica. Dois cães desta pesquisa estavam eliminando *Leptospiras* spp. pela urina, e não estavam reagentes ao MAT. Provavelmente deviam estar em infecção aguda, e não houve tempo para soroconversão, mostrando a importância da associação das ferramentas diagnósticas.

Os sorogrupos/sorovares reativos ao MAT com maior frequência e os respectivos títulos encontram-se na Tabela 3. Os sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Djasiman tiveram 33,33% de ocorrência, seguido de Ballum (16,60%). O sorogrupo Djasiman é pouco relatado em cães, porém a manifestação clínica é muito

semelhante com a sintomatologia apresentada em cães acometidos pelo sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, vômito, diarreia, anorexia, icterícia (Escarrone, Baltodano, & Oliveira, 2020). Foram feitas tentativas de correlacionar o sorovar infectante com a apresentação clínica, porém até o momento, não se evidenciou nenhuma correlação significativa. Além disso, os sinais clínicos vão depender da idade, estado imunológico e virulência do sorovar infectante (Meire et al., 2011). Estudos dizem que essa correlação do sorovar infectante deve ser baseada em pesquisas sobre sorotipagem, isolamento e testes genéticos (Sykes et al., 2011), no entanto incluir testes dessa natureza na rotina clínica inviabiliza devido ao alto valor dos ensaios.

O isolamento da bactéria em amostras de urina é complexo, desafiador e pode levar meses para se obter resultado. Segundo Guedes et al. (2020), o isolamento é considerado como diagnóstico definitivo para leptospirose, sendo útil na identificação de portadores renais. Entretanto alguns fatores como o curto período de viabilidade das leptospirosas na urina, crescimento fastidioso e falta de padronização de protocolos, dificultam o sucesso dos resultados. Alguns autores afirmam que amostras de urina devem ser processadas em até duas horas para se obter sucesso no isolamento (Zarantonelli et al., 2018).

Miotto et al. (2018a) incluíram 33 cães com suspeita clínica, e obtiveram 55,5% dos casos sororreagentes, com títulos entre 100 e 3200. Os sorogrupos reativos predominantes foram *Icterohaemorrhagiae* (n=23), *Australis* (n=7), *Pomona* (n=4), *Butembo* (n=4) e *Ballum* (n=3), confirmando mais uma vez que o sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* ainda é um dos principais agentes causadores da leptospirose canina reportados no Brasil.

O sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* é o mais importante em termos de saúde pública, uma vez que estão mais relacionados a infecções em humanos, do que outros sorovares (Miotto et al., 2018a; Sevá et al., 2020) e, portanto, tem um papel importante na epidemiologia da leptospirose humana. Embora o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) seja o hospedeiro mais relevante do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, os cães são considerados hospedeiros acidentais e devido à proximidade com o ser humano aumentar a chance de transmissão (Picardeau, 2013). Sabendo dessa informação faz-se necessário alertar os tutores dos animais reagentes ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* do risco de transmissão e contato com urina contaminada.

Diferente deste estudo, Latosinski et al. (2018), ao realizarem uma pesquisa soro epidemiológica com cães em Botucatu relataram ser o sorogrupo *Canicola*, o mais comum (66,6%), seguido por *Autumnalis* (33,3%) e *Grippotyphosa* (16,6%).

O teste *Kappa* analisou a concordância entre os testes, sensibilidade e especificidade da qPCR em relação teste padrão ouro (MAT) (Tabela 2.). O valor de *Kappa* obtido é considerado muito baixo (0,067) e o p-valor (0,722) não é significativo, o que mostra ausência de concordância entre os testes realizados (MAT/qPCR). Além disso o teste Exato de Fisher ($p < 0,05$), também não evidenciou qualquer associação ou dependência entre os testes diagnósticos analisados (p -valor=1,00). A discordância entre MAT e PCR é frequente e tem sido observada em alguns estudos Latosinski et al. (2018), no entanto, a associação de técnicas é benéfica, pois pode contribuir para a confirmação de casos suspeitos. Martin et al. (2019), compararam o ensaio de PCR em tempo real *lipL32* e MAT, porém diferente desta pesquisa, encontraram uma forte concordância ($kappa = 0,76$) entre os ensaios.

A sensibilidade da qPCR foi de 16,7 % e a especificidade de 88,9%. Apesar de vários trabalhos demonstrarem a alta especificidade e sensibilidade do ensaio de PCR em tempo real, provando ser um método rápido para o diagnóstico de leptospirose aguda (Stoddard et al., 2009), no presente estudo somente a especificidade foi alta, e a sensibilidade foi baixa. Com base em pesquisas anteriores isso pode ser explicado, pela liberação intermitente de leptospira na urina, uso prévio de antibióticos a análise, congelamento das amostras, até mesmo o pH da urina, podem influenciar e reduzir a sensibilidade do teste (Fraune, Schweighauser, & Francey, 2013; Rohilla, Khurana, Kumar, Batra, & Gupta, 2020; Schuller et al., 2015). Troia et al. (2018) também demonstraram baixa sensibilidade diagnóstica na qPCR, uma vez que a sensibilidade encontrada foi de 13,5% e a especificidade de 92,0 %, resultados semelhantes aos encontrados no atual estudo.

Os fatores pré-analíticos podem ter interferido nesta pesquisa, gerando resultados falso-negativos. Realizar a PCR em amostras de urina em diferentes momentos, extrair o DNA da bactéria sem congelamento prévio e fazer a neutralização do pH da urina, seriam opções que talvez aumentasse a taxa de detecção, e, portanto, a sensibilidade (Branger et al., 2005; Schuller et al., 2015; Sykes et al., 2011). Ressaltando que deve haver mais estudos para uso de primers que apresentem maior capacidade de detecção de genes específicos de *Leptospira* spp. e controle de fatores pré-analíticos.

A idade dos animais positivos (n=8), confirmados em pelo menos um dos testes diagnósticos (MAT e/ou qPCR) para leptospirose canina, variou de 3 meses a 13 anos (média de 7 anos), e 62,5% eram machos. Dos 8 animais positivos, somente um tinha histórico de vacinação registrado em ficha clínica. Os principais sintomas clínicos apresentados na consulta inicial foram perda do apetite ou hiporexia (87,5%), vômitos (62,5%), diarreia (50%), debilitação geral do animal ou prostração e dificuldade respiratória (37,5%), febre e icterícia (25%), demais sintomas encontram-se na Figura 1. Estes sinais são compatíveis com a maioria das pesquisas anteriores com leptospirose em cães (Miotto et al., 2018a; Rissi & Brown, 2014). Quando se comparou manifestações clínicas apresentadas por humanos, observaram que os sintomas são semelhantes aos dos cães, porém a taxa de mortalidade para cães é alta (Major; Schweighauser & Francey, 2014).

A maior probabilidade e tendência de infecção em cães machos, cães adultos, também foi relatada em outros estudos (Azocar-Aedo & Monti, 2016; Ricardo; Previtali & Signorini, 2020). A característica comportamental dos machos de cheirar, lambem a urina, marcação de território, além do instinto para reprodução, podem aumentar o risco de exposição a leptospirosas patogênicas. Além da maior exposição de cães machos, cães adultos e com acesso à rua tem um aumento significativo na probabilidade de infecção, pois podem entrar em contato com água e lixos contaminados (Azocar-Aedo & Monti, 2016; Ricardo; Previtali & Signorini, 2020).

A vacinação é imprescindível para a prevenção da doença, porém as vacinas comerciais incluem apenas sorovares como Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Pomona, já outras também incluem Copenhageni. Apenas um animal com diagnóstico de leptospirose neste estudo teve histórico de vacinação. Fato que alerta a possibilidade de infecção por sorovares não contemplados na maioria das vacinas comercializadas para cães no Brasil. De acordo com Ricardo, Previtali e Signorini (2020) e Ellis (2010), houve um ressurgimento de casos devido a infecções incidentais com sorovares não apreciados em vacinas, já as

1 infecções com o sorovar Canicola tem diminuído nas últimas décadas justamente devido ao aumento da
2 vacinação da população canina.

3 Outro fator a ser considerado é que a proteção da vacina é específica para sorovarietades (Oliveira et
4 al., 2012), ou seja, não induz imunidade contra sorovares pertencentes a outros sorogrupos. Verificou neste
5 estudo acometimento de um cão por sorovar que não está incluído na vacina comercializada na região,
6 mostrando a necessidade de se incluir sorovares locais para aumentar a proteção da população alvo.

7 Foram analisados os resultados bioquímicos séricos (creatinina, ureia, ALT, FA) do grupo de cães
8 positivos e negativos nos testes diagnósticos (MAT e/ou qPCR) para leptospirose canina. Observou-se valores
9 elevados para creatinina, ureia e FA em relação aos valores de referência estabelecidos por Kaneko, Harvey e
10 Bruss (2008), no grupo positivo, porém somente ALT manteve-se dentro dos valores de normalidade para a
11 espécie canina (Tabela 4). Já em relação ao grupo negativo somente os valores de ureia e FA apresentaram
12 valores elevados. Quando se comparou os dois grupos, não se observou diferença estatística significativa entre
13 os valores dos elementos avaliados ($p>0,05$).

14 A creatinina e ureia apresentaram valores acima do limite máximo de referência no grupo positivo,
15 caracterizando um quadro de azotemia, sinal bastante comum em leptospirose canina. Estes elementos
16 encontram-se elevados na corrente sanguínea pois há redução na perfusão renal e taxa de filtração glomerular,
17 provocada pela liberação de toxinas e componentes de membrana das leptospiros, o que causa uma destruição
18 das células epiteliais dos túbulos renais (Greene et al., 2006). Há relatos desta alteração bioquímica em cães
19 com diagnóstico de leptospirose (Chideroli, et al., 2016; Costa, Honorato, Fiuza, & Leite, 2013). Segundo
20 Geisen et al. (2007), 57% de cães com leptospirose, apresentaram azotemia e 81% tiveram níveis séricos
21 elevados de fosfatase alcalina.

22 Como enzimas indicadoras de lesão hepática, somente FA teve seus níveis elevados em relação aos
23 valores de referência no grupo positivo, indicando colestase. Uma vez que o pico máximo de ALT no sangue
24 é atingido em dois dias após a injúria (Pinna et al., 2010), talvez seja uma das possíveis causas do valor normal
25 apresentado. Dados na literatura afirmam que cães com leptospirose podem mostrar níveis normais dessa
26 enzima (Thrall, Weiser, Allison, & Campbell, 2015), o que condiz com os resultados do atual estudo. Doenças
27 infecciosas, como a leptospirose, podem causar perda da funcionalidade hepatocelular devido as toxinas
28 liberadas pela bactéria, portanto, podem elevar os níveis sanguíneos tanto de bilirrubina como de FA, pela
29 estase biliar (Chideroli, et al., 2016). De acordo com Oliveira (2010), o aumento sérico da FA e da bilirrubina
30 total são mais frequentes do que a elevação sérica da ALT. As alterações bioquímicas séricas mais observadas
31 em cães com leptospirose, são devido a lesão renal, incluindo azotemia e hiperfosfatemia, sendo relatados em
32 80% a 100% dos casos, respectivamente. O aumento da atividade das enzimas hepáticas séricas, raramente é
33 observado na ausência de lesão renal (Geisen et al., 2007).

34 Os valores do perfil hematológico de cães com resultado positivo nos testes diagnóstico MAT e/ou
35 qPCR encontram-se na Tabela 5. Os valores do eritrograma de cães com resultado positivo nos testes
36 diagnóstico MAT e/ou qPCR, estão abaixo dos valores de referência para a espécie, de acordo com Weiss, &
37 Wardrop (2010), o que caracteriza anemia do tipo normocítica normocrômica, arregenerativa. Animais
38 positivos para leptospirose apresentam anemia hemolítica imunomediada provavelmente por IgM. Para Sykes

et al. (2011), os achados no hemograma completo podem incluir anemia não regenerativa desde leve a moderada, entretanto é raro ocorrer anemia grave como acontece nos casos de hemorragia gastrointestinal ou pulmonar.

O leucograma apresentou valores de leucócitos totais, neutrófilos segmentados e bastonetes, acima dos valores de referência, o que caracteriza leucocitose por neutrofilia com desvio para a esquerda regenerativo. Isso sugere estímulo inflamatório, provavelmente pela multiplicação de leptospiras na corrente sanguínea (leptospirose). Schuller et al. (2015), relataram ser as alterações hematológicas mais comuns leucocitose por neutrofilia às vezes com desvio à esquerda, resultados semelhantes foram encontrados neste estudo. Porém, descreve que na fase leptospirêmica é possível encontrar uma discreta leucopenia.

O plaquetograma permaneceu dentro dos limites de normalidade para cães. Era esperada trombocitopenia, assim como afirma Andrade et al. (2020), mas não ocorreu. A trombocitopenia pode afetar até 58% dos cães, e quando acompanhada por evidência de dano renal agudo com ou sem lesão hepática, pode ajudar a aumentar a suspeita para o diagnóstico de leptospirose (Sykes et al., 2011). As alterações laboratoriais mais frequentes no perfil hematológico de cães com sinal clínico de leptospirose canina semelhantes às do presente estudo, também foram observadas por Geisen et al. (2007). Esses mesmos pesquisadores afirmam que 45% dos cães apresentaram anemia com hematócrito inferior aos limites de referência, 81% do leucograma foi caracterizado por neutrofilia com desvio à esquerda e 53% apresentavam trombocitopenia.

Exames complementares tais como hemograma completo e análises bioquímicas sanguíneas devem ser solicitados de acordo com necessidade de cada animal. Eles servem tanto para auxiliar no diagnóstico precoce de patologias, como para acompanhar a evolução do estado de saúde em geral.

O diagnóstico clínico da leptospirose é complexo devido à variedade de sinais clínicos inespecíficos, por isso relacionar os sinais clínicos dos animais com as alterações hematológicas e bioquímicas séricas são imprescindíveis, pois podem ajudar a elucidar mais facilmente o caso suspeito de leptospirose canina e direcionar para a prova diagnóstica mais adequada. Uma vez que não existe sinal clínico nem alteração laboratorial patognomônica para a infecção por *Leptospira* spp. em cães, aliar ferramentas diagnósticas, levando em consideração cada fase da doença, parece ser a melhor estratégia.

Conclusão

Ao avaliar os testes diagnósticos e associar com as principais alterações clínicas-patológicas de cães suspeitos de leptospirose, aconselha-se que o médico veterinário solicite o MAT de forma pareada, e o qPCR de urina para aumentar a sensibilidade diagnóstica. Além disso, aliar os testes diagnósticos aos exames laboratoriais, parece ser uma opção mais assertiva, pois fornece informações importantes acerca do prognóstico do animal. A qPCR se mostra como uma ferramenta diagnóstica complementar quando aliada ao MAT e aos achados clínicos-patológicos resultando no direcionamento correto de tratamento e manejo de cães com suspeita de leptospirose.

1 **Agradecimentos**

2

3 Agradecemos à Fundação de Desenvolvimento Universitário da Universidade Federal de Uberlândia
4 (FAU) pelo apoio financeiro, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior - Brasil (CAPES)
5 – Código de Financiamento 001 e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

6

7 **Referências**

8

9 Action. (2013). Estatcamp - Consultoria estatística e qualidade, São Carlos, SP, Brasil. Retrieved from
10 <http://www.portalaction.com.br/>. Acesso em: 04 nov. 2020.

11 Andrade, M.C., Oliveira, L.B., Santos, A.F., Moreira, M.V.L, Pierezan, F., & Ecco, R. (2020). Diagnósticos
12 diferenciais em 83 cães com icterícia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 40 (6), 451-465.
13 <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6482>

14 Azócar - Aedo, L & Monti, G. (2016). Meta-análises de fatores associados à leptospirose em cães
15 domésticos. *Zoonoses Public Health*, 63, 328 - 336. doi: 10.1111 / zph.12236

16 Branger, C., Blanchard, B., Fillonneau, C., Suard, I., Aviat, F., Chevallier, B., & André-Fontaine, G. (2005).
17 Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the
18 hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiology Letters*, 243(2), 437–445.
19 <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.007>

20 Chideroli, R.T., Bracarense, A.P. F. R. L., Padovani, L., Martins, L. A., Gonçalves, D. D., & de Freitas J.C.
21 (2016). Leptospirose canina associada à insuficiência renal aguda -Relato de caso. *Revista Brasileira de*
22 *Medicina Veterinária*, 38(Supl.1), 79-84.

23 Costa, E.R.A., Honorato, R.A., Fiuza, R.F. & Leite, A.K.R.M. (2013). Alterações hematológicas,
24 morfológicas sanguíneas e bioquímicas em um cão com leptospirose. *Revista Científica Eletrônica de*
25 *Medicina Veterinária*, 11(21), 1-10.

26 Curtis, K.M., Foster, P.C., Smith, P.S., Monn, M.P., Stillman, B.A., Chandrashekar, R., Lappin, M.R., &
27 Goldstein R.E. 2015. Performance of a Recombinant LipL32 Based Rapid In-clinic ELISA (SNAP® Lepto)
28 for the Detection of Antibodies Against *Leptospira* in Dogs. *The International Journal of Applied Research*
29 *in Veterinary Medicine*, 3 (3), 182-189.

30 Ellis, W.A. (2010). Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? *Veterinary Record* 167(16),
31 602-605. doi: 10.1136/vr.c4965

32 Escarrone, A., Baltodano, J.P.R., & Oliveira, M. T. (2020). Leptospirose canina causada pelo sorovar
33 Djasiman no município de Alegrete RS- Relato de caso. *Anais Do Salão Internacional De Ensino, Pesquisa E*
34 *Extensão*, 8(5). Recuperado de <https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/85323>

- 1 Ferreira Neto, J. M., Viana, E.S., & Magalhães, L. M. (1982). *Patologia Clínica Veterinária*, 2 ed. Belo
2 Horizonte: Rabelo, 1982. 279p.
- 3 Fraune, C. K., Schweighauser, A., & Francey, T. (2013). Evaluation of the diagnostic value of serologic
4 microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs
5 in a referral center. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 242(10), 1373–1380.
6 <https://doi.org/10.2460/javma.242.10.1373>
- 7 Geisen, V., Stengel, C., Brem, S., Müller, W., Greene, C., & Hartmann, K. (2007). Canine leptospirosis
8 infections - clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). *The*
9 *Journal of small animal practice*, 48(6), 324–328. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2007.00324.x>
- 10 GraphPad Prism versão 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego: Califórnia, EUA. Recuperado
11 de: www.graphpad.com
- 12 Greene C.E., Sykes J.E., Brown C.A. & Hartmann K. (2006). *Infections Diseases of the dog and cat*. 3rd ed.
13 Saunders Elsevier, St Louis.
- 14 Greenlee, J. J., Alt, D. P., Bolin, C. A., Zuerner, R. L., & Andreasen, C. B. (2005). Experimental canine
15 leptospirosis caused by *Leptospira interrogans* serovars pomona and bratislava. *American Journal of*
16 *Veterinary Research*, 66(10), 1816-1822. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.1816>
- 17 Guedes, I.B., Rocha, K.S., Negrão, M.P., Souza, G.O., Castro, J.F.P., Cavalini, M.B., Souza Filho, A.F,
18 Damasceno Neto, M.S., Aizawa, J., Moraes, C.C.G., Heinemann, M.B. (2020). *Leptospira* transport medium
19 (LTM): A practical tool for leptospires isolation. *Journal of Microbiological Methods*, 175.
20 <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105995>.
- 21 Harkin, K. R., Roshto, Y. M., Sullivan, J. T., Purvis, T. J., & Chengappa, M. M. (2003). Comparison of
22 polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of
23 urinary shedding of leptospires in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(9),
24 1230–1233. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.222.1230>
- 25 Hartskeerl, R. A., Collares-Pereira, M., & Ellis, W. A. (2011). Emergence, control and re-emerging
26 leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clinical microbiology and infection: the official*
27 *publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17(4), 494–501.
28 <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x>
- 29 IBM Corp. Lançado em 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Versão 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- 30 Kaneko, J. J., Harvey, J. W., & Bruss, M. L. (2008). *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6th. Ed. San
31 Diego: Academic Press, 916p.

- 1 Latosinski, G.S., Fornazari, F., Babboni, S.D., Caffaro, K., Paes, A.C., & Langoni, H. (2018). Serological
2 and molecular detection of *Leptospira* spp in dogs. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*,
3 51(3), 364-367. doi: 10.1590/0037-8682-0276-2017
- 4 Levett P. N. (2001). Leptospirosis. *Clinical microbiology reviews*, 14(2), 296–326.
5 <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
- 6 Major, A., Schweighauser, A., & Francey, T. (2014). Increasing incidence of canine leptospirosis in
7 Switzerland. *International journal of environmental research and public health*, 11(7), 7242–7260.
8 <https://doi.org/10.3390/ijerph110707242>
- 9 Martin, P.L., Stanchi, N.O., Brihuega, B. F., Galli, L., & Arauz. M. S. (2019). Diagnosis of canine
10 leptospirosis: evaluation of two PCR assays in comparison with the microagglutination test. *Pesquisa*
11 *Veterinária Brasileira*. 39(4), 255-262. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5868>
- 12 Meira, C.D., Wenceslau, A.A., Carvalho., F.S., Correa, J.M.X., & Albuquerque, G.R. (2011). Detecção
13 molecular de leptospira em amostras de urina de cães infectados naturalmente. *Veterinária e Zootecnia*.
14 18(2), 249-254.
- 15 Meny, P., Menéndez, C, Ashfield, N., Quintero, J., Rios, C., Iglesias, T., Schelotto, F., & Varela, G. (2019).
16 Seroprevalence of leptospirosis in human groups at risk due to environmental, labor or social conditions,
17 *Revista Argentina de Microbiología*, 51(4), 324-333. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.01.005>
- 18 Miotto, B. A., Hora, A.S. da., Taniwaki, S. A., Brandão, P. E., Heinemann, M. B., & Hagiwara, M.k.
19 (2018b). Development and validation of a modified TaqMan based real-time PCR assay targeting the lipL32
20 gene for detection of pathogenic *Leptospira* in canine urine samples. *Brazilian Journal of Microbiology*,
21 49(3), 584-590. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.09.004>.
- 22 Miotto, B.A., Tozzi, B.F, Penteao, M., Guilloux, A. G. A., Moreno, L.Z., Heinemann, M. B., Moreno, A. M.,
23 Lilenbaum, W. & Hagiwara, M. K. (2018a). Diagnosis of acute canine leptospirosis using multiple
24 laboratory tests and characterization of the isolated strains. *BMC Veterinary Research* 14(222)
25 <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1547-4>
- 26 Mohammed, H., Nozha, C., Hakim, K., & Abdelaziz, F. 2011. *Leptospira*: morphology, classification and
27 pathogenesis. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 2 (6), 1-5. doi:10.4172/2155-9597.1000120
- 28 Oliveira, S.T. (2010). *Leptospirose Canina: Dados clínicos, laboratoriais, e terapêuticos em cães*
29 *naturalmente infectados*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS,
30 Brasil.
- 31 Oliveira, S.T., Messick, J.B., Biondo, A. W., Dos Santos, A.P., Stedile, R., Dalmolin, M.L., Guimaraes,
32 A.M.D., Mohamed, A.S., & Gonzalez, F.H. D. (2012). Exposure to *Leptospira* spp. in Sick Dogs, Shelter
33 Dogs and Dogs from an Endemic Area: Points to Consider. *Acta Scientiae Veterinariae*, 40(3), 1-7.

- 1 Organização Mundial da Saúde (2003). *Leptospirose humana: orientações para diagnóstico, vigilância e*
2 *controle*. Acesso em:09-11-20. Disponível em:
3 [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42667/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf?sequence=1&is](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42667/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
4 [Allowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42667/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>
- 5 Paes A.C. 2016. *Leptospirose canina*, p.356-377. In: Megid J., Ribeiro M.G. & Paes A.C. (Eds), *Doenças*
6 *Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia*. Roca, São Paulo.
- 7 Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 43
8 (1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>.
- 9 Pinna, M.H., Oriá, A.P., Cypriano, G.B., Oliveira, F.S., Almeida, D.S., Pinheiro, A.C.O., Macêdo, L.D., &
10 Rolemberg, D.S. (2010). Leptospirose em cães. *PubVet*, 4(32).
- 11 Reagan, K. L., & Sykes, J. E. (2019). Diagnosis of Canine Leptospirosis. *The Veterinary clinics of North*
12 *America. Small animal practice*, 49(4), 719–731. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.008>
- 13 Ricardo, T., Previtali, M. A., & Signorini, M. (2020). Meta-analysis of risk factors for canine leptospirosis.
14 *Preventive veterinary medicine*, 181, 105037. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105037>
- 15 Rissi, D. R., & Brown, C. A. (2014). Diagnostic features in 10 naturally occurring cases of acute fatal canine
16 leptospirosis. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association*
17 *of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 26(6), 799–804. <https://doi.org/10.1177/1040638714553293>
- 18 Robi, D. T (2020). Epidemiology and Zoonotic Implication of Leptospirosis in Domestic Animals in
19 Ethiopia. *Academic Journal of Animal Diseases*, 9 (1), 19-32. doi:10.5829/idosi.ajad.2020.19.32
- 20 Rohilla, P., Khurana, R., Kumar, A., & Batra, K., & Gupta, R. (2020). Detection of *Leptospira* in urine of
21 apparently healthy dogs by quantitative polymerase chain reaction in Haryana, India. *Veterinary World* 13
22 (11), 2411-2415. doi: 10.14202 / vetworld.2020.2411-2415
- 23 Schuller, S., Francey, T., Hartmann, K., Hugonnard, M., Kohn, B., Nally, J. E., & Sykes, J. (2015). European
24 consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *The Journal of small animal practice*, 56(3), 159–179.
25 <https://doi.org/10.1111/jsap.12328>
- 26 Sevá, A.P., Brandão, A.P.D., Godoy, S.N., Souza, G. O., Souza Filho, A.F., Jimenez-Villegas, T.,
27 Heinemann, M.B., & Ferreira, F. (2020). Soroprevalência e incidência de *Leptospira* spp. em cães
28 domésticos na região Sudeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 40(5), 399-
29 407. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6390>.
- 30 Stoddard, R. A., Gee, J. E., Wilkins, P. P., McCaustland, K., & Hoffmaster, A. R. (2009). Detection of
31 pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene.
32 *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 64(3), 247–255.
33 <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014>

- 1 Sykes, J., Hartmann, K., Lunn, K., Moore, G., Stoddard, R. & Goldstein, R. (2011), 2010 ACVIM Small
- 2 Animal Consensus Statement on Leptospirose: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention.
- 3 *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25: 1-13. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x>
- 4 Thrall, M. A.; Weiser, G.; Alisson, R.W.; & Campbell, T.W. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*.
- 5 2 ed. Roca: Rio de Janeiro, 2015. 688p.
- 6 Troia, R., Balboni, A., Zamagni, S., Frigo, S., Magna, L., Perissinotto, L., Battilani, M., & Dondi, F. (2018).
- 7 Prospective evaluation of rapid point-of-care tests for the diagnosis of acute leptospirosis in dogs. *Veterinary*
- 8 *Journal*, 237, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.05.010>
- 9 Waggoner, J.J, Balassiano I, Mohamed-Hadley, A, Vital-Brazil, J.M., Sahoo, M.K., & Pinsky, B.A. (2015).
- 10 Reverse-Transcriptase PCR Detection of *Leptospira*: Absence of Agreement with Single-Specimen
- 11 Microscopic Agglutination Testing. *PLoS One*, 10 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132988>
- 12 Weiss, D.J., & Wardrop, K.J. (2010). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6 ed. Ames: Wiley-Blackwell
- 13 Zarantonelli, L, Suanes, A., Meny, P., Buroni, F., Nieves, C., Salaberry, X., Briano, C., Ashfield, N.,
- 14 Silveira, C.S., Dutra, F., Easton, C., Fraga, M., Giannitti, F., Hamond, C., Rioseco, M., Menendez, C.,
- 15 Mortola, A., Picardeau, Quintero, Rios, C., Rodrigues, V., Romero, A., Varela, G., Rivero, R., Schelotto,
- 16 F., Riet-Correa, F., & Buschiazzi, A. (2018). Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally
- 17 infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human
- 18 leptospirosis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 12(9), 1-22. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006694>
- 19 Zakeri, S., Khorami, N., Ganji, Z.F., Sepahian, N., Malmasi, A.A., Gouya, M. M., & Djadid, N.D. (2010).
- 20 *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog.
- 21 *Infection, Genetics and Evolution*, 10(2), 273-277. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.01.001>
- 22 **Tabela 1:** Espécies, sorogrupos e sorovares utilizados no teste de aglutinação microscópica (MAT) para o
- 23 diagnóstico de leptospirose canina no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de
- 24 Uberlândia, 2020.

Espécie	Sorogrupo	Sorovar
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava
	Canicola	Canicola
	Djasiman	Djasiman
	Hebdomadis	Hebdomadis
	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
	Sejroe	Hardoprajtino
	Sejroe	Wolffi
	Pomana	Pomana
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis
	Tarassovi	Tarassovi
<i>L. santarosai</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa

Tabela 2: Frequência de cães positivos para leptospirose utilizando a associação das técnicas de diagnóstico MAT e qPCR.

		MAT		
		Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
	qPCR			
	Negativo	16 (66,67) ^a	5 (20,83) ^a	21 (87,5)
	Positivo	2 (8,33) ^a	1 (4,17) ^a	3 (12,5)
	Total	18 (75)	6 (25)	24 (100)

^aAs proporções de cada coluna não diferem estatisticamente um das outras no nível de 5% de significância (p-valor = 1,00). Teste Exato de Fisher e Teste *Kappa* (p<0,05). MAT (teste de aglutinação microscópica) e qPCR (reação em cadeia de polimerase em tempo real). Sensibilidade 16,7% e especificidade 88,8%.

Tabela 3: Sorogrupos e sorovares mais frequentes e respectivos títulos no teste de aglutinação microscópica (MAT) em cães com suspeita clínica de leptospirose atendidos no Hospital Veterinário da UFU, 2020.

Sorogrupos/Sorovares	Títulos			
	100	200	400	Total (%)
Ballum/Castellonis	1	-	-	1(16,60)
Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	1	-	1*	2 (33,33)
Icterohaemorrhagiae/Icterohaemorrhagiae	1	1*	-	2 (33,33)
Djasiman/Djasiman	1	1	-	2 (33,33)

*positivo em dois sorovares do sorogrupo Icterohaemorrhagiae

14

Tabela 4: Valores de creatinina, ureia, ALT e FA de cães submetidos aos testes diagnósticos (MAT/qPCR) para leptospirose canina, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, 2020.

Bioquímicos	Creatinina (mg/dL)	Ureia* (mg/dL)	ALT (U/L)	FA (U/L)
	Md ± erro padrão	Média ± SD	Md ± erro padrão	Md ± erro padrão
Positivo (n=8)	2,35 ± 3,37 ^a	244,43 ± 117,04 ^a	75,5 ± 16,51 ^a	551,00 ± 469,82 ^a
Negativo (n=16)	1,07 ± 1,07 ^a	273,20 ± 144,45 ^a	96,00 ± 162,50 ^a	543,00 ± 266,89 ^a
p-valor	0,34	0,60	0,21	0,75
Valores de referência**	(0,5 – 1,5)	(21 – 59,9)	(21 – 102)	(20 – 156)

* Teste T Student, demais Teste Wilcoxon com 5% de significância. SD (desvio-padrão).

**Kaneko et al., (2008). Md= mediana

20

21

22

Tabela 5: Média e desvio-padrão dos parâmetros hematológicos de cães com diagnóstico positivo para leptospirose, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, 2020.

Parâmetros	Média ± DP	Valores de referência *
He ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	$4,17 \pm 1,42$	5,5-8,5
Hb (g/dL)	$8,63 \pm 3,76$	12-18
Ht (%)	$26,8 \pm 8,30$	37-55
VCM (fL)	$65,11 \pm 3,36$	60-77
CHCM (g/dL)	$33,64 \pm 1,39$	30-36
RDW (%)	$13,51 \pm 1,83$	11-16
Leuc totais (mm^3)	$34.628,57 \pm 26.680,87$	6.000 – 17.000
Neutro bast (mm^3)	$2.283 \pm 2.655,06$	0 - 300
Neutro seg (mm^3)	$28.759,71 \pm 24.464,52$	3.000 – 11.500
Eos. (mm^3)	$17,29 \pm 45,73$	100 – 1.250
Linf. (mm^3)	$2.544,86 \pm 1.368,14$	1.000 – 4.800
Mon. (mm^3)	$1.066,57 \pm 425,03$	150 – 1.350
Bas. (mm^3)	$0,00 \pm 0,00$	Raros
Plaquetas (mm^3)	$217.285,71 \pm 224.847,88$	175.000 – 500.000
VPM (fL)	$11,68 \pm 2,04$	6,7 -11,1

He (hemácias); Hb (hemoglobina); Ht (hematócrito); VCM (volume corpuscular médio); CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média); RDW (red cell distribution width)); Leuc totais (leucócitos totais); Neutro bast (neutrófilo bastonete); Neutro seg (neutrófilo segmentado); Eos (eosinófilo); Bas (basófilo); Mon (monócitos); Linf (linfócitos). * Weiss, & Wardrop (2010).

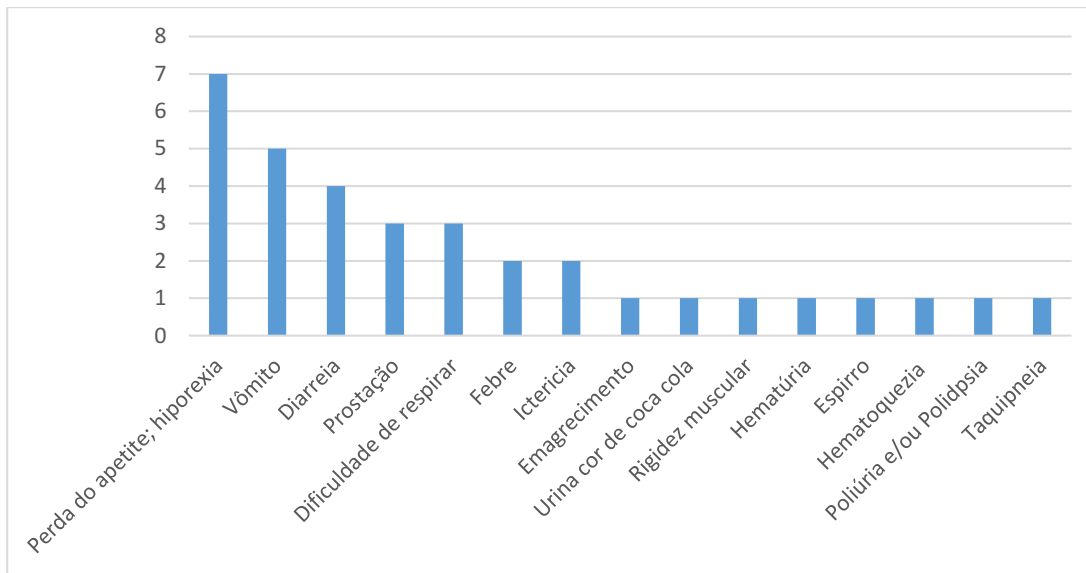


Figura 1. Frequência de sinais clínicos observados em cães com diagnóstico de leptospirose, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, 2020.

CAPÍTULO 3

Avaliação *in vitro* do efeito antimicrobiano da nanopartícula ZnO:9Ag e antibióticos em cepas padrão de *Leptospira* spp.

Artigo será submetido a Revista: Nanomaterials*

Avaliação *in vitro* do efeito antimicrobiano da nanopartícula ZnO:9Ag e antibióticos em cepas padrão de *Leptospira* spp.

Resumo: Nanopartículas de prata possuem propriedades antimicrobianas amplamente conhecidas contra bactérias patogênicas. Sabendo da gravidade da doença e que o tratamento ideal para leptospirose ainda é desconhecido, reforça a busca por novas alternativas terapêuticas. Objetivou-se avaliar o efeito antimicrobiano da nanopartícula Óxido de Zinco dopado com prata (ZnO:9Ag) em cepas padrão de *Leptospira* spp. e sua comparação a antibióticos comumente utilizados no tratamento da doença. Selecionou-se cinco espécies patogênicas de *Leptospira* (*L. interrogans*, *L. santarosai*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*), sendo 6 sorovares de *L. interrogans* e um sorovar das demais espécies, totalizando dez cepas padrão. A concentração inibitória mínima (CIM), viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico (MTT), teste de permeabilidade de membrana e liberação do conteúdo intracelular foram utilizados para verificar o efeito *in vitro* de estreptomicina, penicilina G, doxiciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag nas espécies de *Leptospira*. Analisou-se a segurança e toxicidade da ZnO:9Ag em modelo alternativo *in vivo*, embrião de galinha. Todos os tratamentos exibiram efeitos anti-*Leptospira*. Penicilina G apresentou menor CIM (<0,048), apesar da ZnO:9Ag exibir maior CIM (6,25 a 50 µg/mL), também apresentou efeito inibitório, tornando uma boa opção terapêutica. Cinquenta por cento (50%) das cepas apresentaram menor viabilidade celular com ZnO:9Ag (100 µg/mL), sendo três na espécie *L. interrogans* e duas nas espécies *L. kirschneri* e *L. noguchii*. ZnO:9Ag foi o único que apresentou alteração significativa ($p < 0,05$) na permeabilidade em todas as espécies, e foi o tratamento que provocou mais extravasamento do conteúdo intracelular em porcentagem. A enzima GGT foi o único parâmetro avaliado que revelou diferença estatística com o controle negativo ($p < 0,05$) no ensaio de toxicidade *in vivo* da ZnO:9Ag em embriões de galinha. Conclui-se que a nanopartícula ZnO:9Ag pode ser potencialmente usada como agente antibacteriano alternativo contra *Leptospira* spp., capaz de inibir seu crescimento, além ser seguro e pouco tóxico para o organismo.

Palavras-chave: nanopartícula de prata, CIM, viabilidade celular, leptospirose, toxicidade

1. Introdução

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira* [2,3], podendo acometer várias espécies animais, desde animais domésticos, silvestres e seres humanos. A doença é considerada reemergente e tem sido apontada como um problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento [4,5]. Ocorre principalmente em locais de clima tropical, por propiciar condições ambientais favoráveis à transmissão da doença, tais como altas taxas de precipitação pluviométrica, inundações, desastres naturais, e condições sanitárias precárias [6,7].

Cães, ratos, bovinos dentre outros são considerados hospedeiros de manutenção da *Leptospira*, e podem transmitir a bactéria para espécies suscetíveis através da urina contaminada [8]. A infecção acontece entre os animais pelo contato direto com o sangue, tecidos de órgãos ou urina contaminados com a bactéria e entre os animais e o homem, principalmente de forma indireta, através da água, solo úmido e alimentos contaminados [9,10]. Após a penetração da leptospira em mucosas, pele íntegra e disseminação por diversos órgãos, vários sinais clínicos são observados desde febre, vômito, diarreia, sangramento nasal, icterícia, insuficiência hepática e renal, podendo levar a morte [11].

No Brasil, a leptospirose é uma doença de notificação compulsória, tanto a ocorrência de casos suspeitos isolados como a de surtos devem ser notificados. De acordo com boletim epidemiológico das doenças tropicais negligenciáveis divulgado pelo Ministério da Saúde, no período de 2010 a 2020 a média de óbitos registrados por ano foi de 321, com letalidade média de 8,7% [12]. Devido a inespecificidade dos sinais clínicos e da gravidade da doença com altas taxas de mortalidade observadas tanto em cães como seres humanos [3], reforça a necessidade de estudos e informações atualizadas sobre manejo e novas alternativas terapêuticas.

O tratamento ideal para a leptospirose ainda é desconhecido, entretanto recomenda-se utilizar doxiciclina para leptospirose canina. As penicilinas ou doxiciclina têm sido tradicionalmente os antibacterianos de escolha para o tratamento de humanos e cães com a infecção [13], porém apresentam toxicidade consideráveis [14].

Sabendo do aparecimento de cepas multirresistentes, e conforme observada resistência antimicrobiana da *Leptospira* [15,16], faz-se necessário investigar novos agentes antimicrobianos que sejam capazes de inibir o crescimento de *Leptospira* com melhor eficácia, menor resistência e toxicidade. Neste contexto, as nanopartículas de prata (AgNPs) tornam-se uma estratégia terapêutica promissora frente aos tratamentos tradicionais [17], pois possuem

propriedades antimicrobianas amplamente conhecidas contra bactérias patogênicas [18,19] e apresentam baixa toxicidade para células de mamíferos [20].

Fonseca et al. [21] comprovaram que a nanopartícula ZnO:Ag-AgO foi eficaz, segura, e viável para o controle de microrganismos na avicultura, sendo capaz de inibir a formação de biofilme de *Salmonella* sp. na casca do ovo e ainda preveniu a entrada da bactéria no ovo. Até o momento não tem disponível na literatura, o uso de nanopartículas, especialmente a óxido de zinco dopada com prata (ZnO:9Ag) com a finalidade antimicrobiana em bactérias do gênero *Leptospira*. Portanto, surge uma alternativa com grande potencial capaz de inibir o crescimento destas bactérias.

Objetivou-se avaliar o efeito antimicrobiano da nanopartícula Óxido de Zinco dopado com prata (ZnO:9Ag) em cepas padrão de *Leptospira* spp. e sua comparação a antibióticos comumente utilizados do tratamento no tratamento da doença.

2. Material e Métodos

2.1 Cepas padrão e seleção de Leptospira

Cepas padrão de *Leptospira* spp. foram gentilmente doadas pelo Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal Fluminense. *L. santarosai* sorovar Guaricura é uma estirpe isolada em bovino no Brasil, porém também é considerada uma cepa padrão conforme os registros do laboratório. As cepas foram cultivadas em meio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) enriquecido com 10% de soro de coelho, mantidas em estufa a 30°C, com repiques realizados semanalmente.

Devido a *Leptospira interrogans* ser a espécie que contém o maior número de sorovares patogênicos de importância epidemiológica e impacto na saúde pública, optou-se por incluir 6 sorovares, em contrapartida foi selecionado mais um representante sorovar das outras espécies patogênicas, *L. santarosai*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, totalizando 10 sorovares e 5 espécies diferentes. As espécies, sorogrupos e sorovares das cepas de *Leptospira* incluídas no experimento estão no Quadro 1.

- 1 Quadro 1: Seleção de espécies, sorogrupos e sorovares de *Leptospira* patogênicas para o
2 experimento.

Nº	Espécie	Sorogrupo	Sorovar	Cepa	Instituto de Origem
1	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20	Fiocruz
2	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Verdun	Pasteur
3	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV	Pasteur
4	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjoprajitno	Hardjoprajitno	OMS
5	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3705	Fiocruz
6	<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez Bratislava	Fiocruz
7	<i>L. santarosai</i>	Sejroe	Guaricura	BOV G	Fiocruz
8	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellon 3	Pasteur
9	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V	Pasteur
10	<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214K	Pasteur

3

4

5 2.2 Preparação da nanopartícula e das soluções antimicrobianas

6

7 A síntese dos nanocristais (NCs) de ZnO:Ag-AgO (ZnO:9Ag) foram realizadas no
8 Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS) do Instituto de Física da
9 Universidade Federal de Uberlândia. NCs de ZnO:Ag-AgO foram sintetizados pelo método de
10 coprecipitação, que está sob pedido de patente (BR 10 2018 007714 7) e gentilmente cedidas
11 por Anielle Christine para execução deste trabalho.

12 Os antimicrobianos utilizados estreptomicina, penicilina G, tetraciclina foram
13 adquiridos da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, e doxíciclina da ExataVet (Farmácia de
14 Manipulação Veterinária) de Uberlândia-MG. As soluções estoque foram preparadas conforme
15 recomendações do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) [22]. As soluções de
16 trabalho (400 µg/U/ mL) foram utilizadas imediatamente após preparação.

17

18

19

2.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e Ensaio de viabilidade celular através do teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT)

Os procedimentos para avaliar o perfil de suscetibilidade de microrganismos foram realizados de acordo com Murray e Hoshpenthal e Liegeon et al. [16,23], com modificações. Para avaliar a concentração inibitória mínima (MIC), ZnO:9Ag foram diluídos para concentrações decrescentes de 100 para 0,049 µg/mL em meio EMJH suplementado com 10% de soro de coelho. Como controle negativo, apenas caldo EMJH foi utilizado, e como controle positivo, os respectivos caldos mais os sorovares de *Leptospira*. Antibióticos comerciais estreptomicina, penicilina G, tetraciclina e doxiciclina foram usados como controles. A concentração celular final foi de 2×10^6 leptospira/mL em um volume final em cada poço de 200 µL. As placas foram incubadas a 30°C por 72 h em mini estufa BOD (Q315M). Após esse período, 20 µL de sal de tetrazólio na concentração de 5 mg/mL (Sigma) foram adicionados a cada poço e as amostras foram incubadas a 30°C por 4 horas. Qualquer mudança na cor de amarelo para roxo foi considerada como indicação de crescimento celular. CIM foi registrada como a concentração no poço contendo a concentração mais baixa sem uma mudança de cor amarelo para roxo.

Para os ensaios de viabilidade [24] após o tratamento anterior, os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 µL de PBS com 10% de SDS (dodecil sulfato de sódio) e 10 de DMF (dimetilformamida) por 18 h até a dissolução completa dos cristais. A densidade óptica foi determinada a 570 nm em um leitor de placas (Multiskan GO Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem (%) em comparação com o controle não tratado, de acordo com a fórmula: $(\text{ABS}_{570\text{nm}} \text{ da amostra} / \text{ABS}_{570\text{nm}} \text{ do controle}) \times 100$.

2.4 Teste de Permeabilidade celular

A alteração na permeabilidade da membrana foi detectada pelo ensaio do cristal violeta [25] com modificações. Suspensões da cepa de *Leptospira* foram preparadas em caldo EMJH (2×10^6 leptospira/mL). As suspensões de 1,5 mL foram tratadas com 100, 50 e 25 µg/mL de ZnO:9Ag, doxiciclina e estreptomicina por 72 horas, incubadas em estufa BOD. Decorrido o tempo de tratamento, as suspensões foram centrifugadas a $9300 \times g$ durante 5 min a 4 °C. As células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS (pH 7,4) contendo 10 µg/mL de cristal violeta. Os antimicrobianos doxiciclina e estreptomicina foram utilizados como controle

positivo. As suspensões bacterianas foram, então, incubadas durante 10 min a 37°C. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 13.400 x g durante 15 min e a absorbância do sobrenadante foi mensurada por espectrofotômetro a 590nm (Multiskan GO Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). O valor médio da solução de cristal violeta que foi utilizada no ensaio foi considerada 100%. A percentagem de captação de cristal violeta de todas as amostras foi calculada usando a seguinte fórmula: $(\text{ABS}_{590\text{nm}} \text{ da amostra} / \text{ABS}_{590\text{nm}} \text{ da solução de cristal violeta}) \times 100$.

2.5 Liberação do conteúdo intracelular

A liberação de material intracelular foi quantificada com absorbância em 260 nm de acordo com os métodos modificados de Bennis et al. [26]. Alíquotas de 1,5 mL de suspensões de leptospira (2×10^6 mL) em meio EMJH suplementado com 10 % soro de coelho foram tratadas com 100, 50 e 25 µg/mL de ZnO:9Ag, doxiciclina e estreptomicina por 72 horas, incubadas em estufa BOD. Após o tratamento, as células foram centrifugadas a $2500 \times g$ por 5 min, e a absorbância do sobrenadante a 260 nm foi determinado usando um espectrofotômetro ultravioleta (Multiskan GO Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Uma solução contendo apenas ZnO:9Ag foi considerada como branco para células tratadas. A solução salina e de doxiciclina/estreptomicina foram usadas como branco para os controles negativo e positivo, respectivamente.

2.5 Ensaios de toxicidade in vivo em modelo de embrião de galinha

O projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (nº de registro A022 / 21). Foram utilizados ovos fertilizados de poedeiras (*Gallus gallus*) com 10 dias de incubação (d10), linhagem Hy-Line W-36, doados pela empresa Hy-Line do Brasil (Uberlândia, Brasil). Antes das análises, os ovos foram submetidos a uma ovoscopia de luz para garantir a qualidade e o desenvolvimento embrionário. Após a ovoscopia, foram pesados (d10) e divididos aleatoriamente em sete grupos (n = 8 ovos por grupo).

As doses foram baseadas no ensaio anterior da concentração inibitória mínima (CIM), o qual foi possível testar até 1000 x (vezes) a maior concentração utilizada no CIM (100 µg/mL), a fim de testar a segurança da nanopartícula ZnO:9Ag em modelo *in vivo*. No grupo controle negativo (CN) foi injetado 100 µL de água para injeção, enquanto cada grupo

1 experimental (6 grupos) foi tratado com 100 µL das seguintes diluições de ZnO:9Ag e
 2 concentração correspondente no embrião: D1 (100 mg/mL; 10 mg/embrião); D2 (10 mg/mL;
 3 1 mg/embrião) D3 (1 mg/mL; 100 µg/embrião) D4 (100 µg/mL; 10 µg/embrião) D5 (10 µg/mL;
 4 1 µg/embrião) e D6 (1 µg/mL; 100 ng/embrião).

5 A inoculação foi via alantóide (a dois terços da altura do ovo da extremidade romba),
 6 usando uma seringa estéril de 1 mL, para isso os orifícios de injeção foram esterilizados
 7 previamente com antisséptico iodopovidona à 10%. Os ovos foram incubados a 37°C com
 8 umidade de 58% e virados a cada duas horas. Após 24 horas de incubação, foi verificado dois
 9 óbitos, sendo um no grupo D1 e outro no grupo D3. Estas mortalidades são consideradas
 10 inespecíficas, inerentes da inoculação e não propriamente do fármaco.

11 No dia 17 do experimento (d17), ou seja, 7 dias após a inoculação, realizou-se os
 12 seguintes procedimentos: quebrou-se a casca do ovo, avaliou a mortalidade/viabilidade
 13 embrionária, colheu o sangue, anotou-se o peso do embrião sem anexos, e avaliou as alterações
 14 macroscópicas.

15 O peso dos embriões foi ajustado considerando o peso inicial do ovo (d10), utilizando a
 16 seguinte Equação 1, segundo Ribeiro et al. [27]. Onde PA é o peso ajustado para 50g; PE é o
 17 peso do embrião de galinha no dia 17 (d17) sem anexos; PI é peso inicial do ovo no dia 10
 18 (d10).

19 Equação 1:

$$20 \quad PA = \frac{PE \cdot 50}{PI}$$

21
 22
 23 O sangue foi centrifugado a 1000× g por 10 min, e o soro obtido foi usado para
 24 quantificar as concentrações de creatinina – Crea (método picrato alcalino), ácido úrico – AU
 25 (método Enzimático-colorimétrico), alanina aminotransferase - ALT (método Cinético UV
 26 IFCC), aspartato aminotransferase – AST (método Cinético UV IFCC), gama glutamil
 27 transferase – GGT (método Szasz modificado), fosfatase alcalina – FA (método Cinético
 28 Optimizado), em analisador automático multicanal PKL® 125 – Inter técnica (Pokler Italia),
 29 utilizando os kits comerciais da InterKit Katal. O equipamento foi previamente calibrado e
 30 aferido com controles da própria marca.

31 A toxicidade *in vivo* das diferentes concentrações de nanopartículas de prata (ZnO:9Ag)
 32 foi avaliada em embriões de galinha por meio dos seguintes parâmetros: peso ajustado
 33 (diferença do peso do ovo na inoculação/peso do embrião sem anexos na coleta), marcadores

1 bioquímicos no soro sanguíneo: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase
 2 (AST), gama glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), creatinina (Crea), ácido úrico
 3 (AU), e lesões macroscópicas.

4

5 2.6 Análises estatísticas

6

7 As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Graph PadPrism 9.2.
 8 Primeiro realizou-se teste de normalidade (Shapiro-Wilk) nos dados, os que apresentaram
 9 distribuição normal, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com 5% de
 10 significância e pós teste de Tukey. P-valores ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente
 11 significantes.

12

13 3. Resultados

14

15 3.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

16

17 As CIMs da nanopartícula ZnO:9Ag e antimicrobianos estão mostrados na Tabela 1.
 18 Tanto os antimicrobianos como a nanopartícula exibiram efeitos anti-*Leptospira*. No entanto
 19 das dez cepas estudadas, cinco delas apresentaram valores MICs abaixo do limite inferior de
 20 detecção para Penicilina G ($< 0,048$ U/mL), sendo considerada a mais eficaz neste teste se
 21 comparado aos outros tratamentos.

22 Neste estudo, os valores de CIM para penicilina G nos diferentes sorovares de *L.*
 23 *interrogans*, foram $< 0,048$ a $0,781$ U/mL. Para as outras espécies *L. santarosai*, *L.*
 24 *borgpetersenii*, *L. kirschneri* e *L. noguchii*, o MIC variou entre $< 0,048$ a 50 U/mL. O MIC da
 25 estreptomicina variou de $0,781$ a $3,125$ µg/mL para *L. interrogans*, contudo nas outras espécies
 26 o intervalo foi menor entre $0,390$ a $0,781$ µg/mL. O intervalo CIM da doxiciclina nas cepas da
 27 *L. interrogans* foi de $0,390$ a $12,5$ µg/mL, nas demais espécies foi de $0,390$ a $1,562$ µg/mL. O
 28 CIM foi de $0,390$ a 50 µg/mL para tetraciclina na espécie *L. interrogans*, porém o intervalo nas
 29 outras diferentes espécies foi menor ($0,390$ a $3,125$ µg/mL). Como nova proposta de tratamento
 30 ZnO:9Ag, foi capaz de inibir o crescimento de todas as espécies de *Leptospira*. O MIC
 31 resultante variou de $6,25$ a 50 µg/mL para *L. interrogans* e demais (*L. santarosai*, *L.*
 32 *borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*) de $12,5$ a 25 µg/mL. Mesmo apresentando maior
 33 MIC quando comparado aos outros tratamentos, a nanopartícula ZnO:9Ag correspondeu de
 34 forma efetiva, tornando-se um potencial agente antibacteriano para tratamento de infecções

1 causadas por *Leptospira*. Portanto, todas as cepas foram sensíveis à penicilina G,
2 estreptomicina, doxiciclina, tetraciclina e nanopartícula ZnO:9Ag, Tabela 1.

3

4 Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM - µg/mL) de Penicilina G (U/mL),
5 Estreptomicina, Doxiciclina, Tetraciclina e nanopartícula ZnO:9Ag, em cinco espécies
6 selecionadas de bactérias do gênero *Leptospira*.

Espécies	Sorovar	MIC (µg/U/mL)				
		Penicilina G	Estreptomicina	Doxiciclina	Tetraciclina	ZnO:9Ag
<i>L. interrogans</i>	Copenhageni	< 0,048	0,781	3,125	3,125	12,5
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	0,781	3,125	12,5	50	12,5
<i>L. interrogans</i>	Canicola	< 0,048	3,125	3,125	12,5	6,25
<i>L. interrogans</i>	Hardjoprajitno	< 0,048	1,562	1,562	1,562	25
<i>L. interrogans</i>	Wolffi	< 0,048	0,781	0,390	0,390	25
<i>L. interrogans</i>	Bratislava	0,097	3,125	3,125	3,125	50
<i>L. santarosai</i>	Guaricura	0,390	0,781	0,781	0,781	12,5
<i>L. borgpetersenii</i>	Castellonis	0,195	0,781	1,562	3,125	12,5
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	< 0,048	0,781	1,562	1,562	25
<i>L. noguchii</i>	Panama	50	0,390	0,390	0,390	25

7

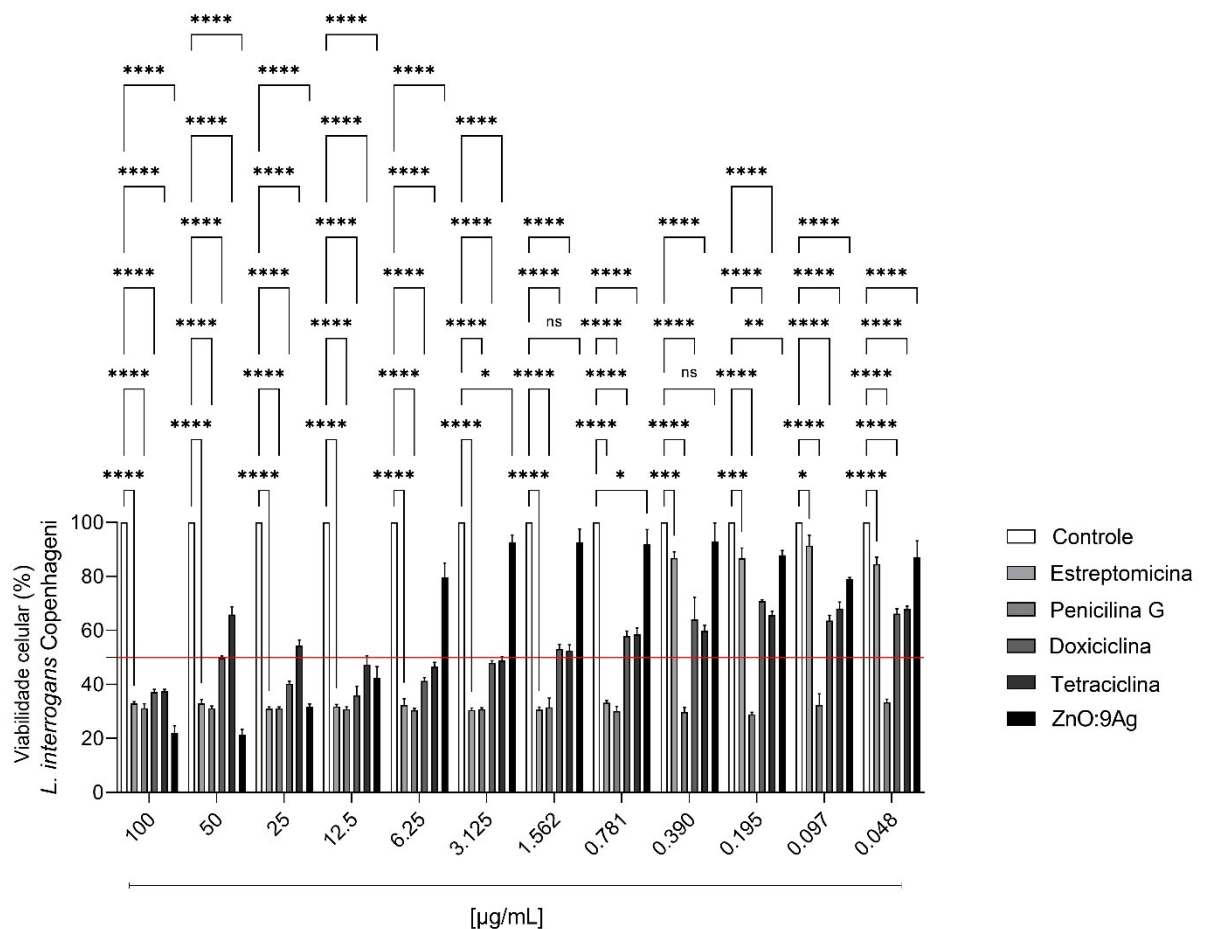
8

9 3.2 Ensaio de viabilidade celular por meio do teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT)

10

11 Observou-se diferença estatística significativa de todos os tratamentos em relação ao
12 controle para *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, conforme Figura 1, exceto para
13 ZnO:9Ag nas concentrações de 0,390 e 1,562. Em contrapartida *Leptospira interrogans* sorovar
14 Copenhageni apresentou menor viabilidade 21% ao tratamento com ZnO:9Ag na concentração
15 100 µg/mL, ou seja, a nanopartícula foi mais citotóxica que os outros tratamentos, capaz de
16 inibir quase 89% do crescimento da bactéria. Nenhum dos tratamentos apresentou viabilidade
17 reduzida (20%) nas doze diluições testadas, a mais próxima foi a ZnO:9Ag na concentração 50
18 e 100 µg/mL. Na diluição de 100 µg/mL, todos os tratamentos foram capazes de reduzir o
19 número de células viáveis em 50%.

20



1

2 **Figura 1.** Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em
 3 relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *Leptospira*
 4 *interrogans* sorovar Copenhageni, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562,
 5 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxíciclina,
 6 tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa
 7 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de
 8 variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.

9

10

11 A viabilidade celular da *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae
 12 apresentou diferença estatística de todos os tratamentos em relação ao controle nas
 13 concentrações 12,5 a 100 µg/mL ($p < 0,05$). A partir de 6,25 µg/mL até a última diluição, pelo
 14 menos um dos tratamentos não diferiu do controle (100% de viabilidade) ($p > 0,05$). Somente
 15 nas duas primeiras concentrações (50 e 100 µg/mL) foi possível encontrar viabilidade de 50%
 16 em todos os tratamentos testados. Viabilidade reduzida em 20% do sorovar
 17 Icterohaemorrhagiae foi observado a partir da concentração 0,781 a 100 U/mL para o
 18 tratamento penicilina G. Na maior concentração (100 µg/mL), o sorovar Icterohaemorrhagiae
 19 apresentou menor taxa de viabilidade 10,28% com ZnO:9Ag, Figura 2.

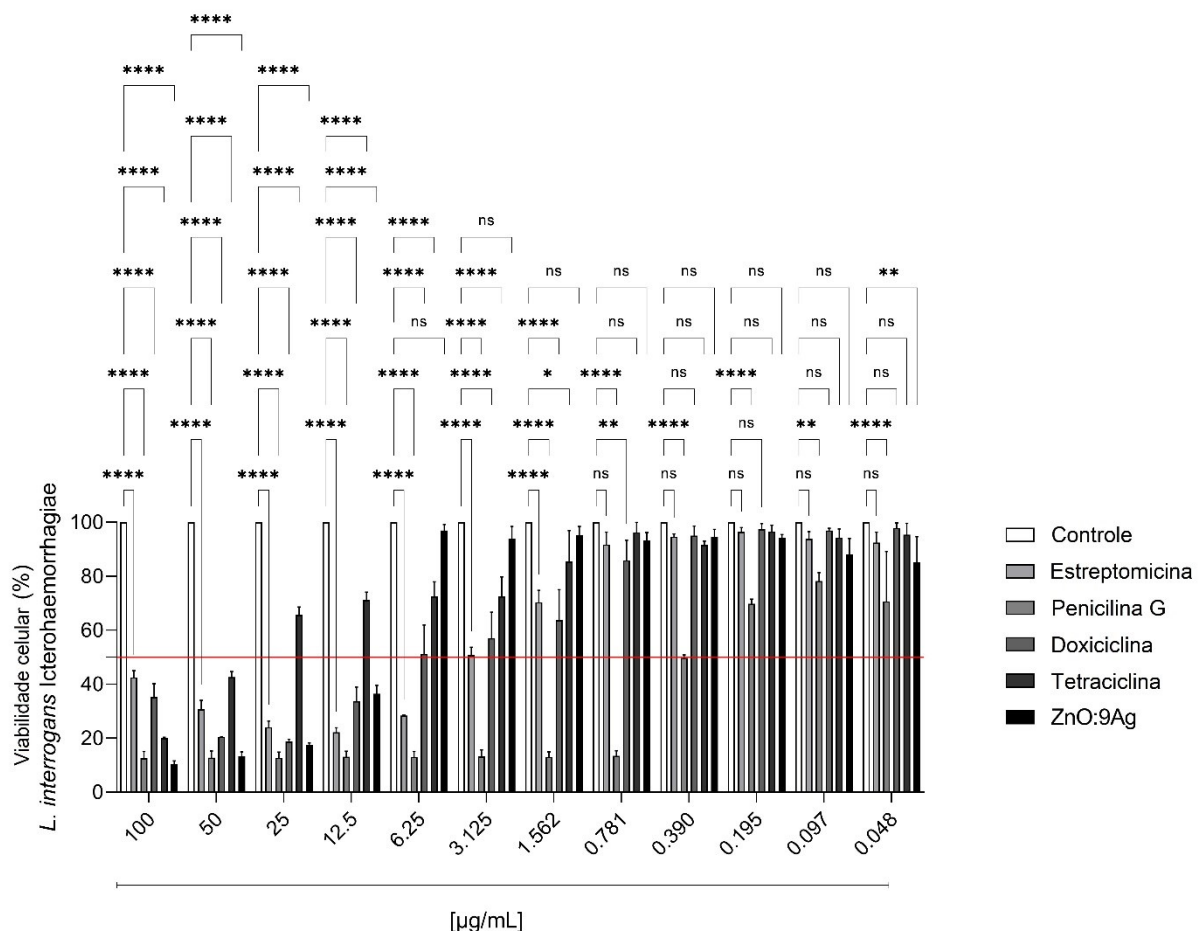


Figura 2. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxíciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.

Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) na viabilidade da *L. interrogans* sorovar Canicola nas concentrações 6,25 a 100 µg/mL para todos os tratamentos testados. Nas outras concentrações pelo menos um dos tratamentos foi igual a viabilidade do controle (100%) ($p > 0,05$). Nas concentrações 12,5 a 50 µg/mL foi verificado viabilidade de 50% em todos os tratamentos. O sorovar Canicola apresentou viabilidade reduzida (20%) constante em todas as diluições de penicilina G. Contudo na concentração 100 µg/mL, a bactéria exibiu viabilidade de 15,31% para ZnO:9Ag e 14,83% para penicilina G, Figura 3.

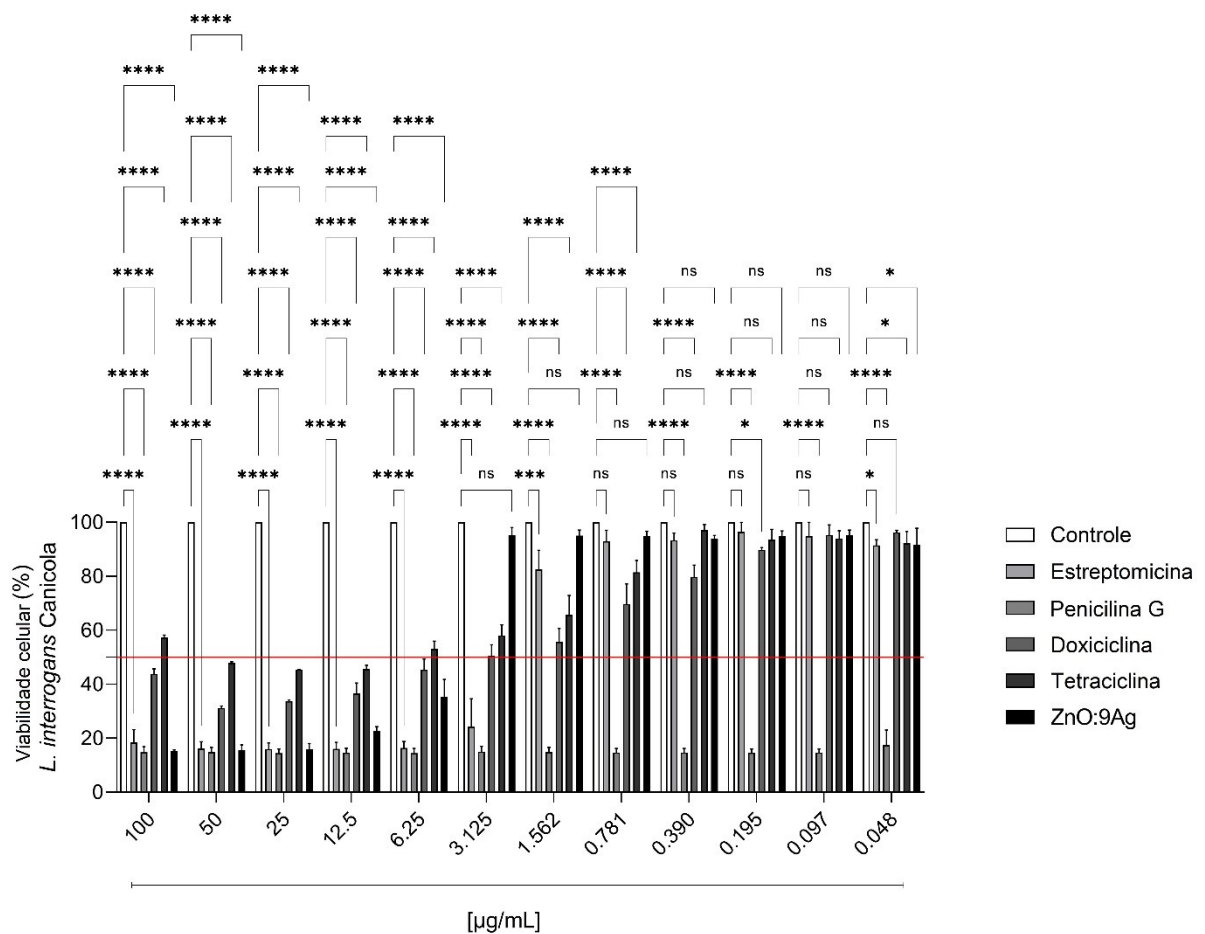


Figura 3. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade de viabilidade), de células viáveis da *L. interrogans* sorovar Canicola, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxíciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.

Conforme mostrado na Figura 4, todos os tratamentos apresentaram diferença significativa na porcentagem de células viáveis em todas as concentrações, exceto ZnO:9Ag nas três maiores diluições (0,048 a 0,195 µg/mL). Porém reduziu para 19% a viabilidade celular de *L. interrogans* sorovar Hardjoprajitno, na concentração 100 µg/mL, sendo menor que Penicilina G (20,78%). O tratamento que apresentou diminuição da viabilidade constante desde a menor concentração (0,048) foi a penicilina G, seguido da estreptomicina a partir de 1,562 µg/mL.

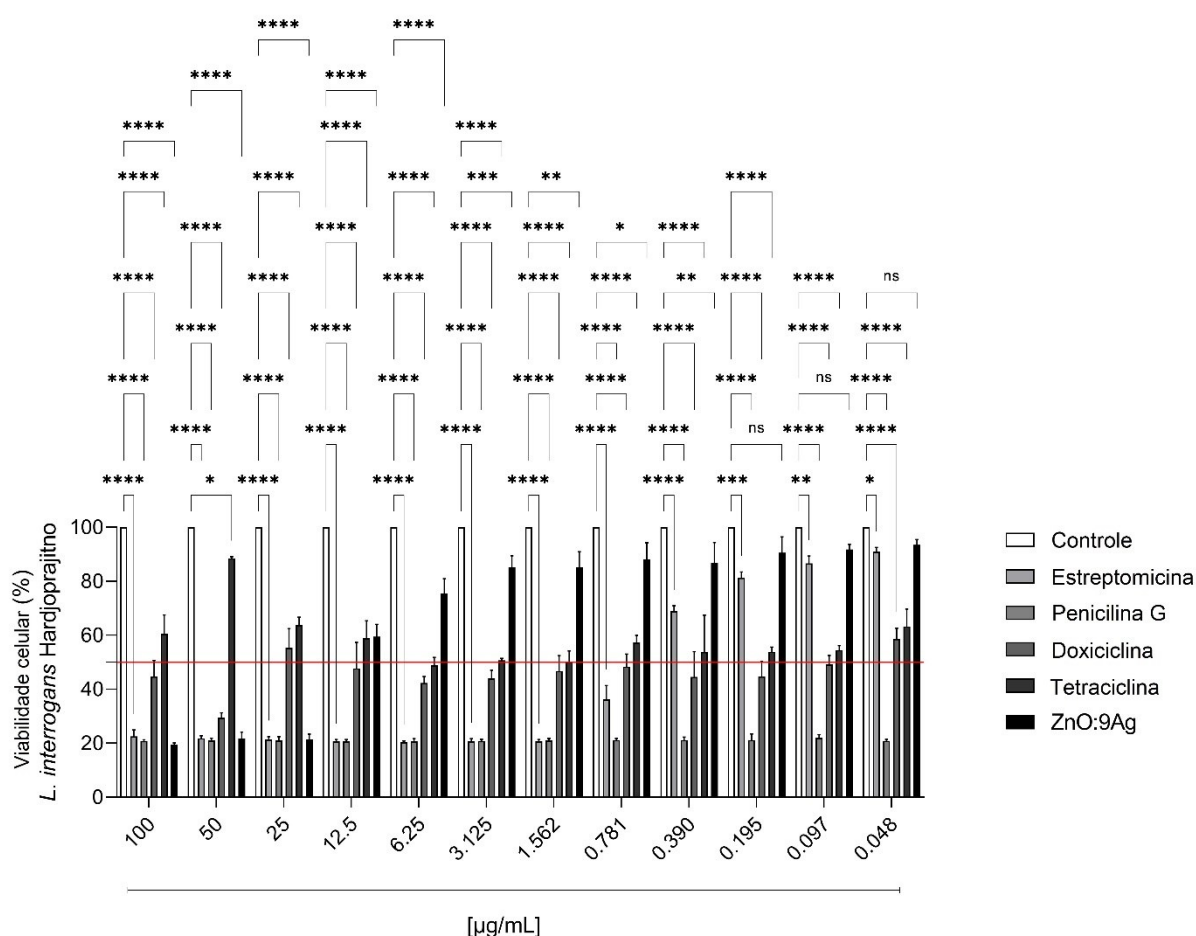


Figura 4. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *L. interrogans* sorovar Hardjoprajitno, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxíciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.

Todos os tratamentos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de células viáveis da *L. interrogans* sorovar Wolffi em todas as concentrações, exceto estreptomicina em 0,195 µg/mL. Apenas nas três maiores concentrações (25 a 100 µg/mL) observou viabilidade de 50% de todos os tratamentos realizados. A bactéria apresentou viabilidade reduzida, $< 20\%$, para todas as concentrações de penicilina G. Na concentração 100 µg/mL, as menores taxas de viabilidade 12,01%, 14,38% e 14,96% foram observadas para penicilina G, estreptomicina e ZnO:9Ag, respectivamente. O percentual de viabilidade apresentado pela nanopartícula na concentração 50 µg/mL, foi menor que estreptomicina, 12,93%, Figura 5.

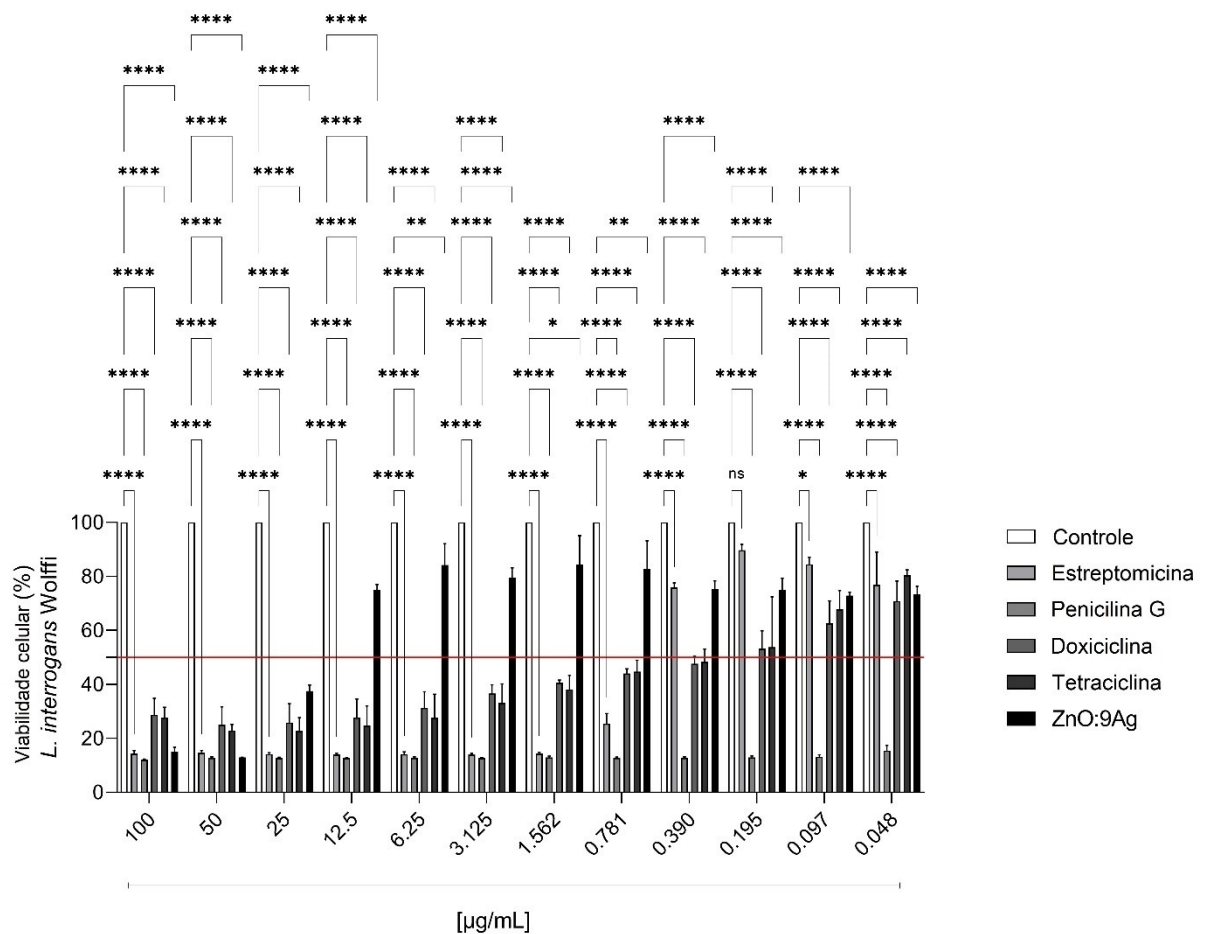
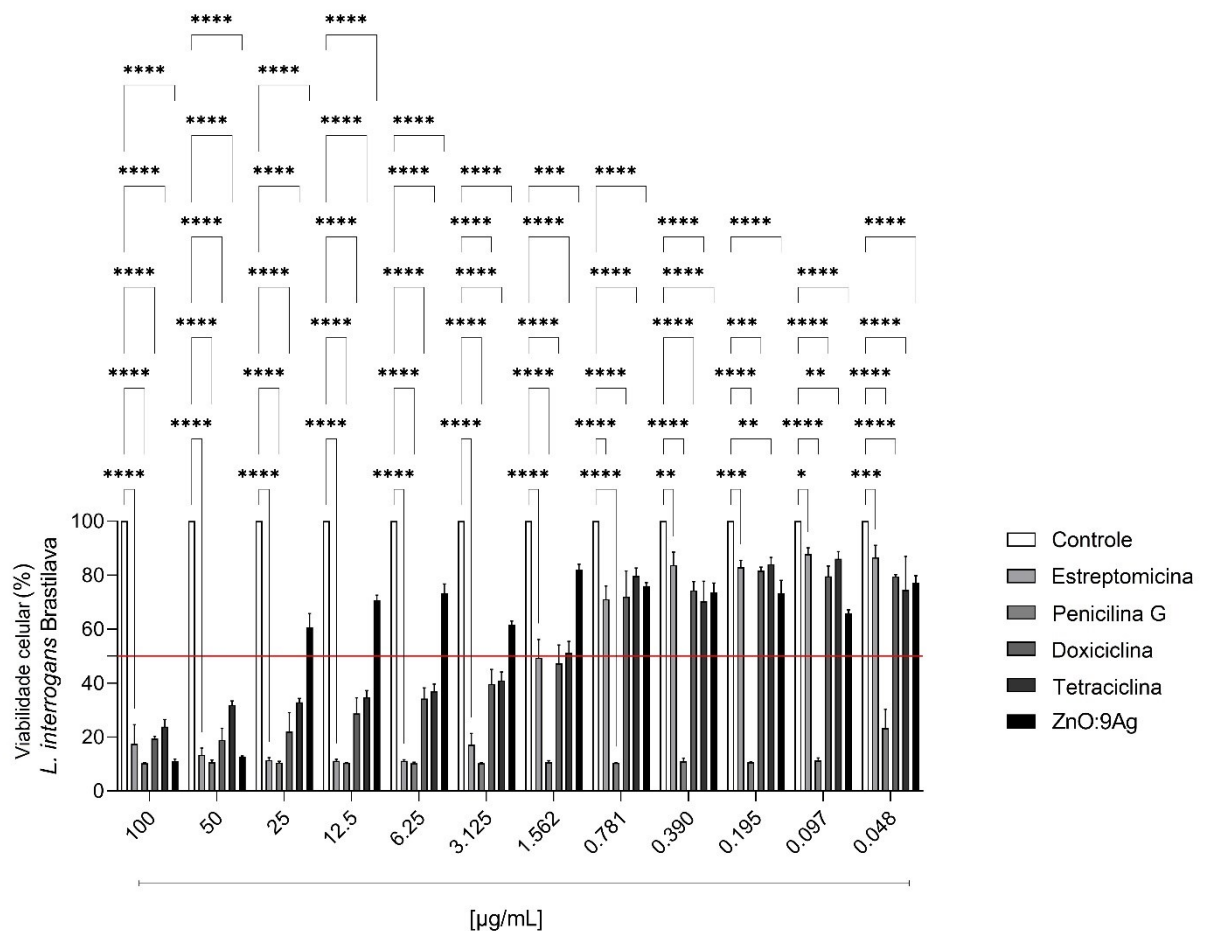


Figura 5. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *L. interrogans* sorovar Wolffii, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxíciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.

Foi observado diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na viabilidade da *L. interrogans* sorovar Bratislava independente da concentração dos tratamentos testados. Conforme mostra o gráfico, apenas nas maiores concentrações (50-100 µg/mL), observou-se viabilidade inferior a 50% em todos os tratamentos. Viabilidade menor que 20% da bactéria na concentração 0,097 até a maior diluição foi observada para Penicilina G. Mesmo que o sorovar Bratislava tivesse apresentado viabilidade maior que 50%, na concentração 25 µg/mL para o tratamento com a nanopartícula, na 100 µg/mL, a bactéria apresentou 11,11% semelhante à penicilina 10,27%, Figura 6.



1

2 **Figura 6.** Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em
 3 relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *L. interrogans*
 4 sorovar Bratislava, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390,
 5 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxiciclina, tetraciclina e
 6 ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de
 7 viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de
 8 variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.

9

10 Diferenças significativas ($p < 0,05$) da viabilidade celular da *L. santarosai* em todos os
 11 tratamentos foi encontrada nas concentrações 1,562 a 100 µg/mL, no restante pelo menos um
 12 dos tratamentos não diferiu ($p > 0,05$) do controle. A viabilidade 50% da espécie de *L. santarosai*
 13 foi encontrada em todos os tratamentos estão nas concentrações (12,5 - 50 µg/mL). A partir da
 14 concentração 0,195 U/mL, a espécie teve menor porcentagem de viabilidade para penicilina G.
 15 Entretanto na maior concentração (100 µg/mL), a estreptomicina foi o tratamento que mais se
 16 aproximou da penicilina G, seguido da nanopartícula ZnO:9Ag, Figura 7.

17

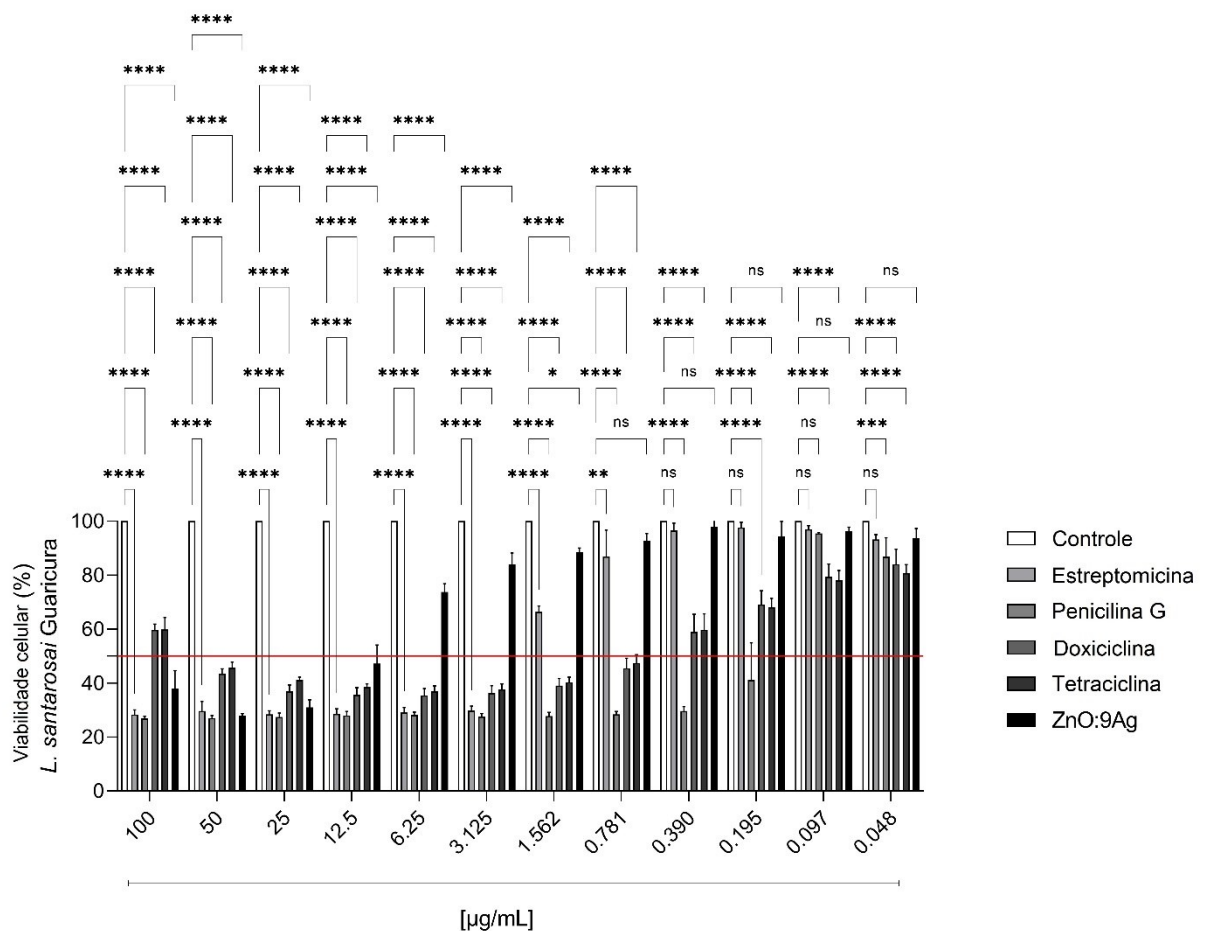


Figura 7. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *L. santarosai* sorovar Guaricura, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxiciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.

A diferença do percentual de viabilidade da *L. borgpeterseni* sorovar Castellonis em todos os tratamentos em relação ao controle ($p < 0,05$) foi observada em 12,5 - 100 µg/mL. Já em relação a viabilidade de 50% observou que em três concentrações (12,5 - 50 µg/mL) foi possível reduzir à metade das bactérias. Desde a diluição (0,195), a penicilina G apresentou menor taxa de viabilidade 27,17% em relação aos outros tratamentos. Na maior concentração, a espécie *L. borgpeterseni* apresentou viabilidade 26,27% para a nanopartícula, próximo da penicilina G. Em nenhuma das concentrações observou-se viabilidade reduzida (<20%) desta espécie para os diferentes tratamentos, Figura 8.

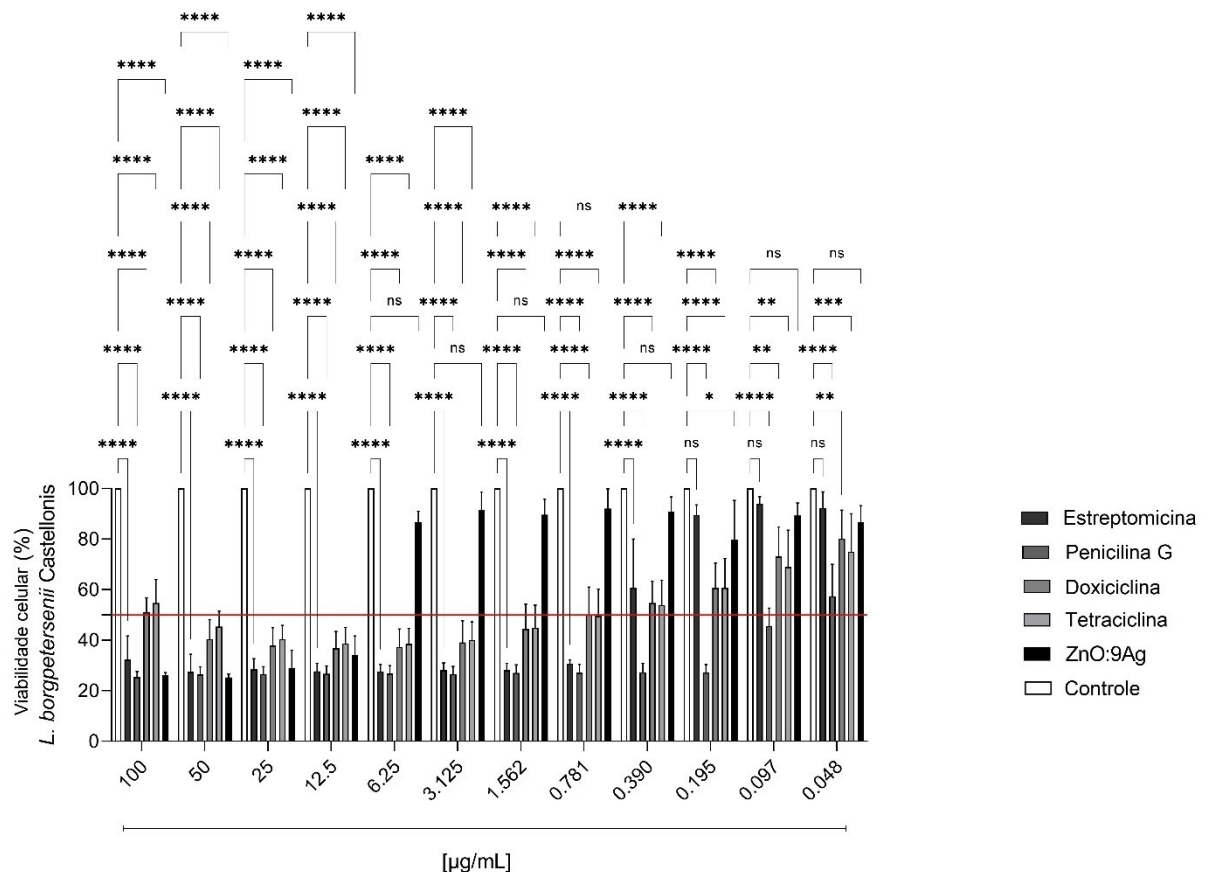


Figura 8. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *L. borgpetersenii* sorovar Castellonis, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxiciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.

Diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) da viabilidade da *L. kirschneri* sorovar Grippotyphosa em relação ao controle ocorreram nas concentrações 12,5 a 100 µg/mL para todos os tratamentos. Nas demais concentrações conforme mostra a Figura 9, pelo menos um tratamento não foi diferente ($p > 0,05$) do controle. A partir da terceira maior concentração (25 µg/mL) observou viabilidade de 50% da bactéria para todos os tratamentos. Vale ressaltar que para penicilina G a viabilidade da espécie foi menor que 20% desde a menor concentração. Na concentração 100 µg/mL a viabilidade da bactéria foi menor para ZnO:9Ag (12,93%) que penicilina G e demais tratamentos.

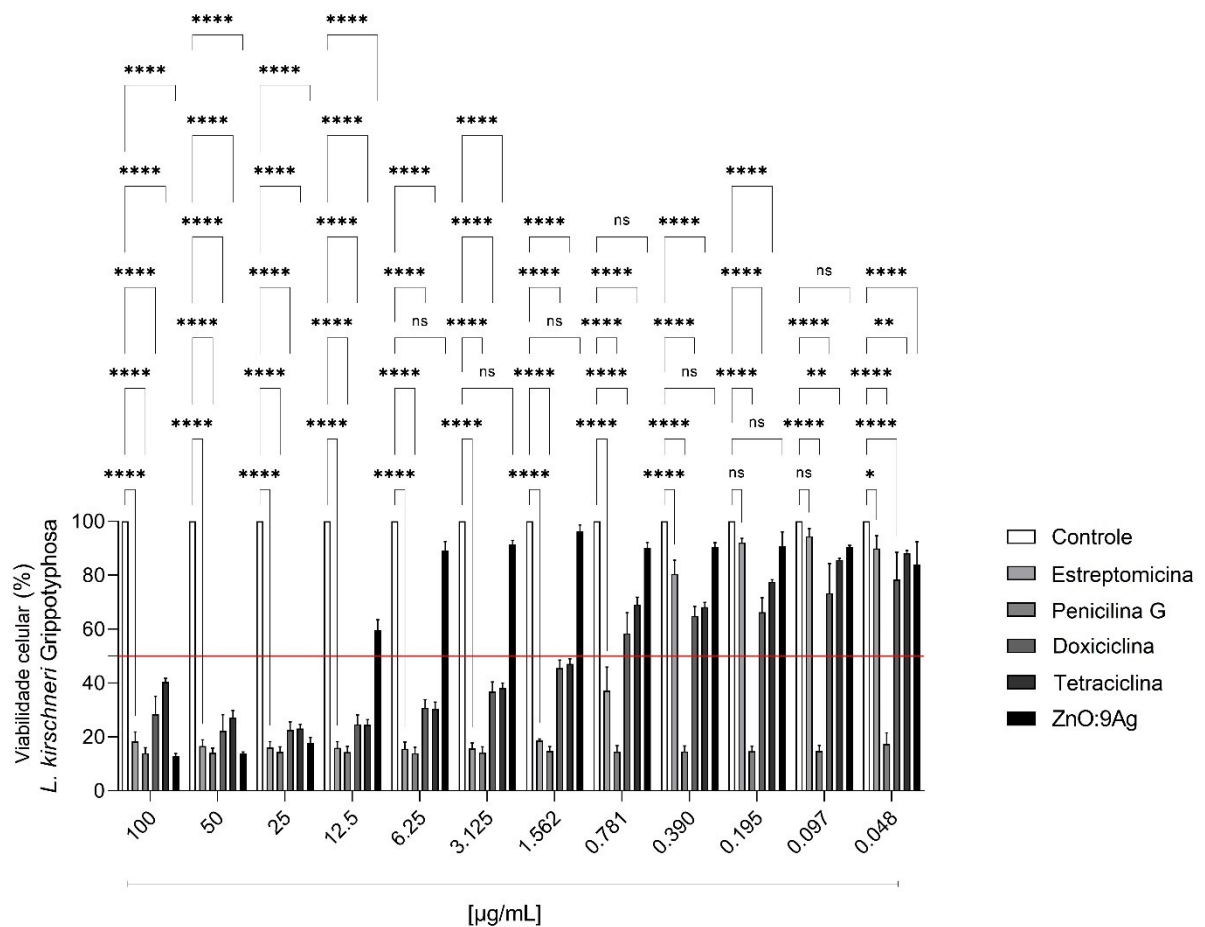


Figura 9. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *L. kirschneri* sorovar Grippyphosa, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxíciclica, tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.

Observou-se que houve diferença estatística ($p < 0,05$) na viabilidade da *L. noguchii* sorovar Panama em todos os tratamentos nas três maiores concentrações (25 a 100 µg/mL), já nas menores pelo menos um tratamento não diferiu do controle. A viabilidade 50% da espécie *L. noguchii* para todos os tratamentos foi detectada nas concentrações 50 e 100 µg/mL. *L. noguchii* apresentou viabilidade reduzida ($< 20\%$) frente ao tratamento penicilina G desde a concentração 1,562 até 100 µg/mL. Porém, foi possível observar em 100 µg/mL menor porcentagem de células viáveis para ZnO:9Ag (8,97%) que os outros tratamentos, inclusive penicilina G, Figura 10.

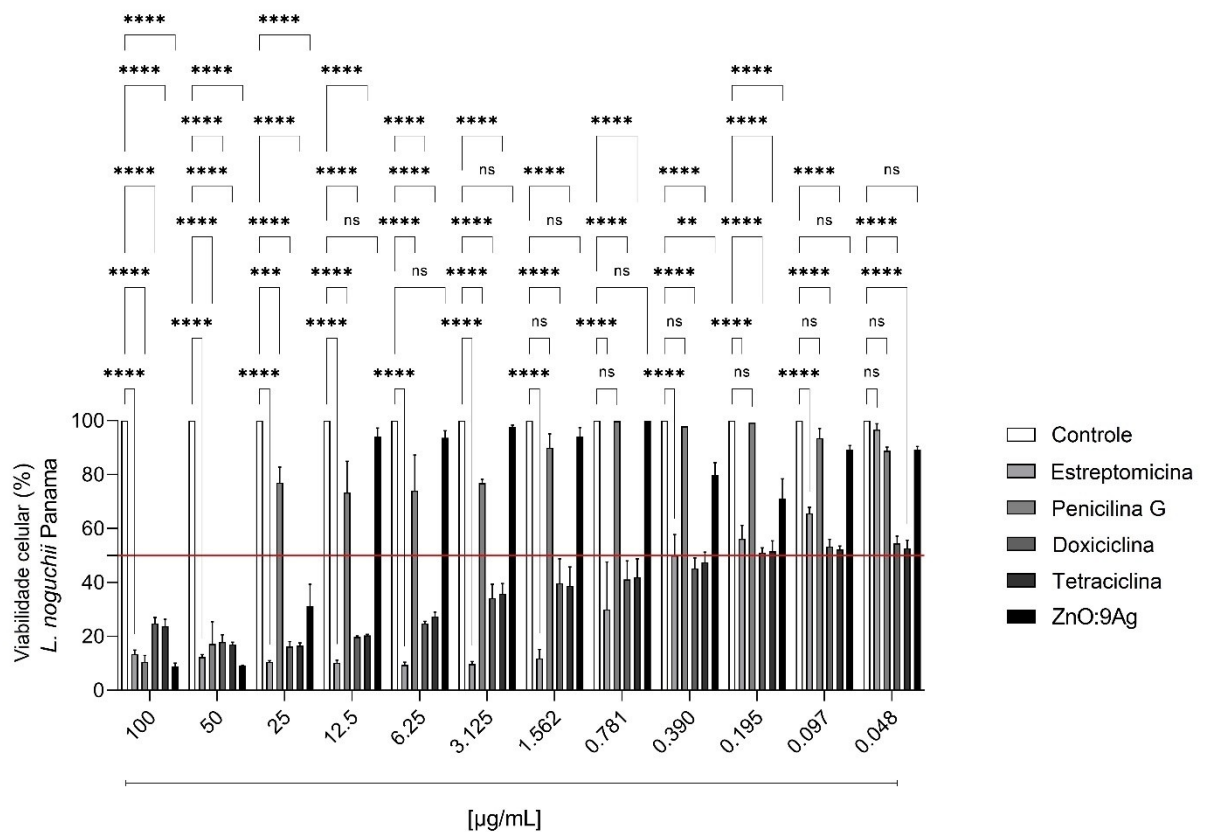
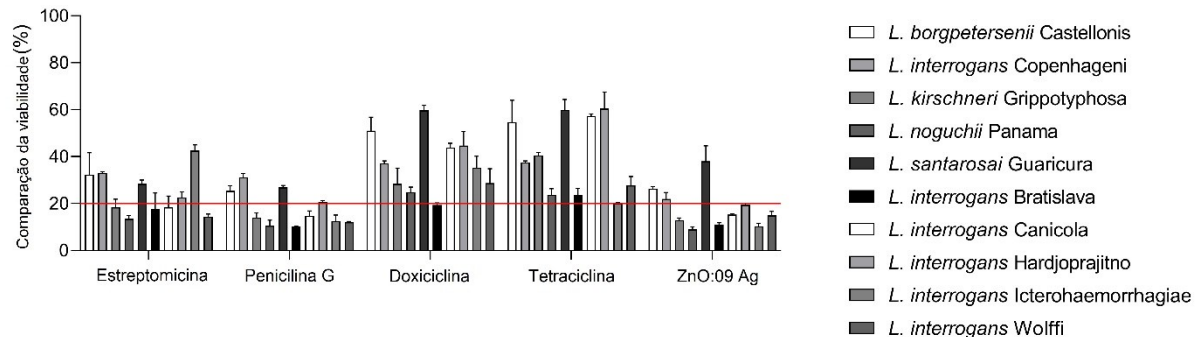


Figura 10. Viabilidade celular: ensaio MTT. Os histogramas representam a porcentagem em relação às células controle (Controle, 100% de viabilidade), de células viáveis da *L. noguchii* sorovar Panama, após tratamento por: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195, 0,097, 0,048 µg/mL de estreptomicina, penicilina G (U/mL), doxiciclina, tetraciclina e ZnO:9Ag. Os dados mostram a média e desvio-padrão. Linha vermelha representa 50% de viabilidade. * Estatisticamente significativo em relação ao controle, segundo análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e pós teste de Tukey.

Conforme mostra na figura 11, realizou-se a comparação da viabilidade celular das espécies de *Leptospira* na concentração 100 µg/mL para os cinco tratamentos: estreptomicina, penicilina G, doxiciclina, tetraciclina e nanopartícula ZnO:9Ag. Cinquenta por cento (50%) das cepas estudadas apresentaram melhor viabilidade com tratamento ZnO:9Ag na concentração 100 µg/mL, sendo três na espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni, Icterohaemorrhagiae e Hardjoprajtino, e duas nas espécies *L. kirschneri* sorovar Grippotyphosa e *L. noguchii* sorovar Panama. Nas outras cepas, a penicilina G apresentou viabilidade semelhante à nanopartícula. Nas espécies, *L. santarosai* sorovar Guaricura e *L. interrogans* sorovar Wolffi, ZnO:9Ag foi menos eficiente que penicilina e estreptomicina nesta ordem, porém da mesma forma apresentou propriedades citotóxicas na bactéria *Leptospira*, portanto, pode ser considerada uma escolha para o tratamento. Na concentração 100 µg/mL, ZnO:9Ag inibiu o crescimento de *L.*

1 *noguchii* sorovar Panama em 91,20%, apresentando maior citotoxicidade ao tratamento com
2 nanopartícula.

3



4

5 **Figura 11.** Comparação da viabilidade celular das cinco espécies de *Leptospira* em relação aos
6 tratamentos (estreptomicina, penicilina G, doxíciclina, tetraciclina e ZnO:09Ag na concentração
7 100 µg/U/mL. A relação das cepas são *L. interrogans* sorovar: Copenhageni, Icterohaemorrhagiae,
8 Canicola, Hardjoprajitno, Wolffii, Bratislava; *L. santarosai* sorovar Guaricura; *L. borgpeterseni* sorovar
9 Castellonis; *L. kirschneri* sorovar Grippotyphosa; *L. noguchii* sorovar Panama. Linha vermelha
10 representa 20% de viabilidade celular.

11

12

13 3.3 Teste de Permeabilidade celular

14

15 Aumento significativo ($p < 0,05$) da permeabilidade celular ocorreu em todos os
16 tratamentos avaliados (doxíciclina, estreptomicina e ZnO:9Ag), para espécie *L. interrogans*
17 (Figura 12), com exceção da doxíciclina e estreptomicina na concentração (25 µg/mL) de *L.*
18 *interrogans* sorovar Copenhageni (Figura 12A). Somente ZnO:9Ag nesta diluição causou
19 alteração significativa da permeabilidade ($p < 0,05$) em relação ao controle (membrana íntegra).
20 Observou-se que a permeabilidade aumentou com o aumento da dose (Figura 12).

21 A permeabilidade de membrana das espécies *L. borgpeterseni*, *L. santarosai*, *L.*
22 *kirschneri*, *L. noguchii*, sofreram alterações significativas em relação ao controle ($p < 0,05$) em
23 todos os tratamentos e concentrações analisados (Figura 13), porém na menor concentração (25
24 µg/mL) doxíciclina não diferiu do controle, com isso não alterou a permeabilidade da
25 membrana de *L. noguchii* sorovar Panama (Figura 13D). A nanopartícula ZnO:9Ag apresentou
26 porcentagens elevadas de permeabilidade em todas as espécies de *Leptospira*.

27

28

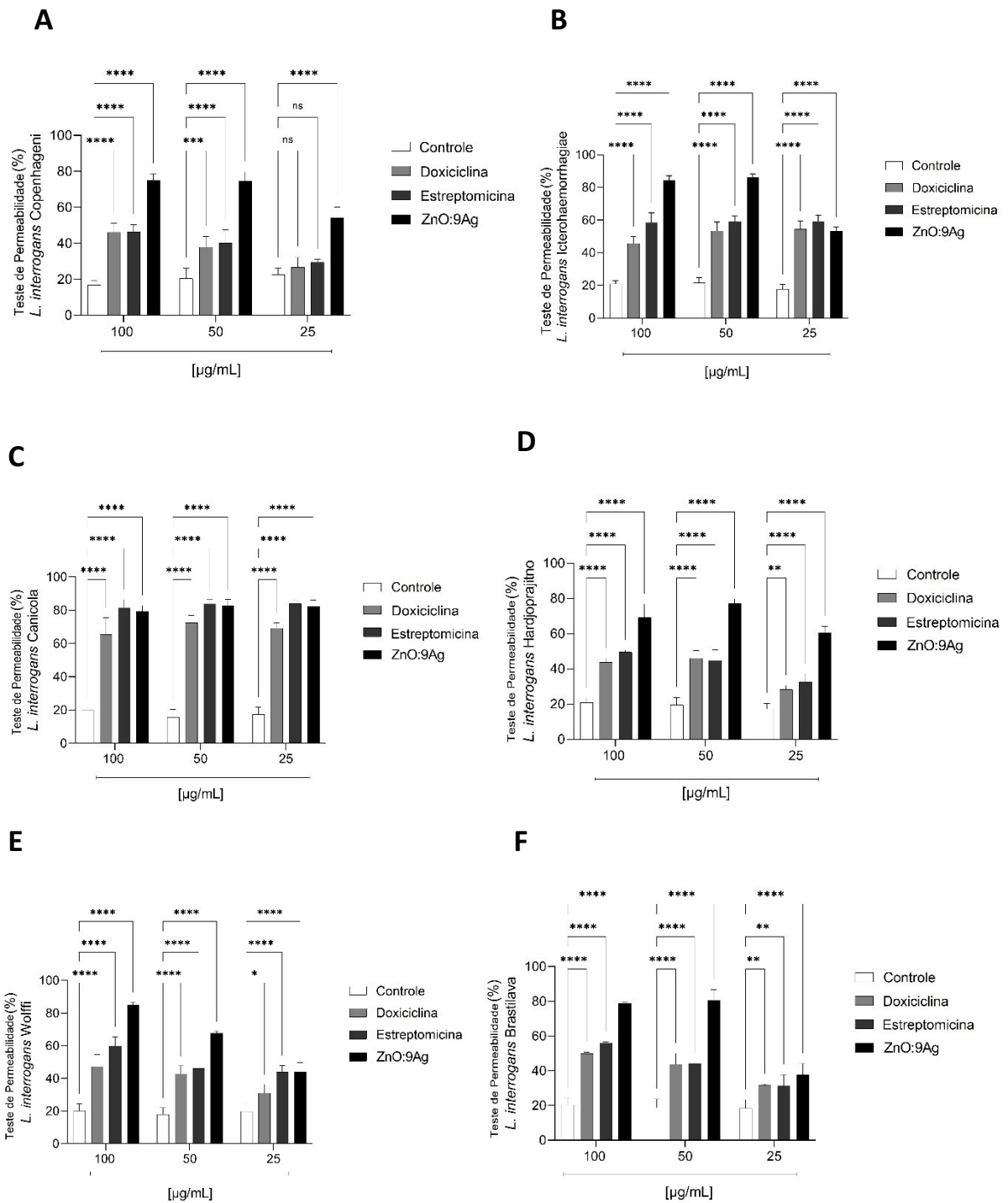
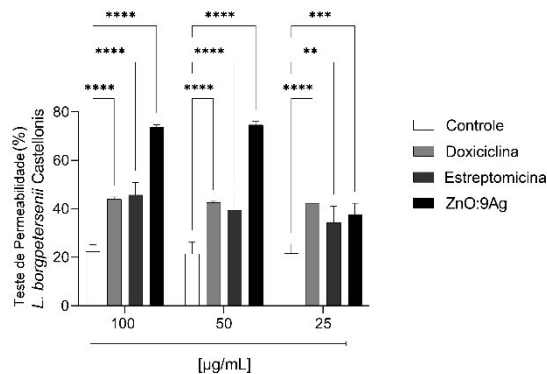
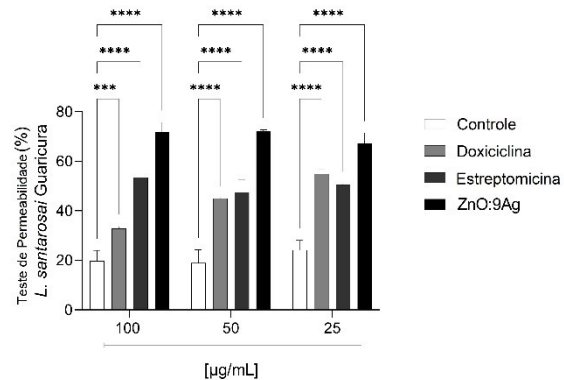


Figura 12. Ensaio de permeabilidade celular. Influência do tratamento com doxiciclina, estreptomicina e nanopartícula ZnO:9Ag nas concentrações 25 a 100 µg/mL na permeabilidade de membrana celular de *L. interrogans* sorovar: Copenhageni (A), Icterohaemorrhagiae (B), Canicola (C), Hardjoprajitno (D), Wolffii (E), Bratislava (F). Dados mostram média ± desvio-padrão, com intervalo de confiança de 95%. Teste análise de variância ANOVA, com pós teste de Tukey. * Indica diferença estatística com o controle (membrana íntegra), (p-valor <0,05).

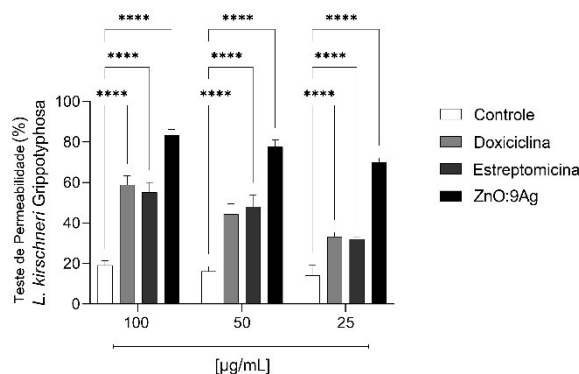
A



B



C



D

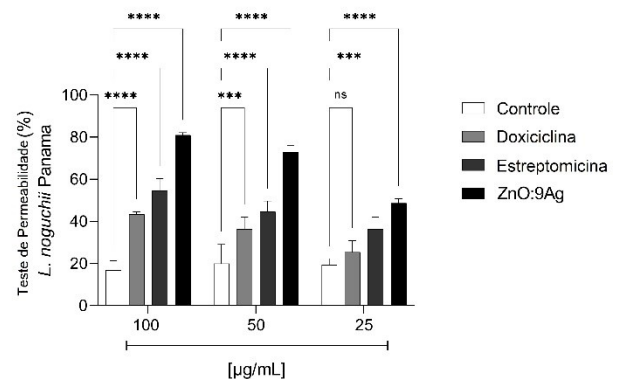


Figura 13. Ensaio de permeabilidade celular. Influência do tratamento com doxiciclina, estreptomicina e nanopartícula ZnO:9Ag nas concentrações 25 a 100 µg/mL na permeabilidade de membrana celular de *L. borgpeterseni* sorovar Castellonis (A), *L. santarosai* sorovar Guaricura (B), *L. kirschneri* sorovar Grippotyphosa (C), *L. noguchii* sorovar Panama (D). Dados mostram média ± desvio-padrão, com intervalo de confiança de 95%. Teste análise de variância ANOVA, com pós teste de Tukey. * Indica diferença estatística com o controle, p-valor ($p < 0,05$).

3.4 Liberação do conteúdo intracelular

Foi possível observar que os tratamentos (doxiciclina, estreptomicina e ZnO:9Ag) nas três diluições (100, 50 e 25 µg/mL) foram diferentes do controle ($p < 0,05$) nas cinco espécies de *Leptospira* estudadas, conforme mostra os gráficos (Figuras 14 e 15). A liberação do conteúdo intracelular foi aumentando progressivamente conforme o aumento das concentrações dos tratamentos. Observa-se quanto maior a liberação de conteúdo, maior valor de absorvância encontrado na densidade óptica (DO) 260 nm, quando comparado ao controle que possui conteúdo intracelular preservado. A nanopartícula ZnO:9Ag foi o tratamento que mais provocou extravasamento do conteúdo intracelular em todas as espécies de *Leptospira*,

considerando maior absorbância apresentada na DO, o que também pode associar ao maior dano a membrana celular e consequentemente maior permeabilidade de membrana.

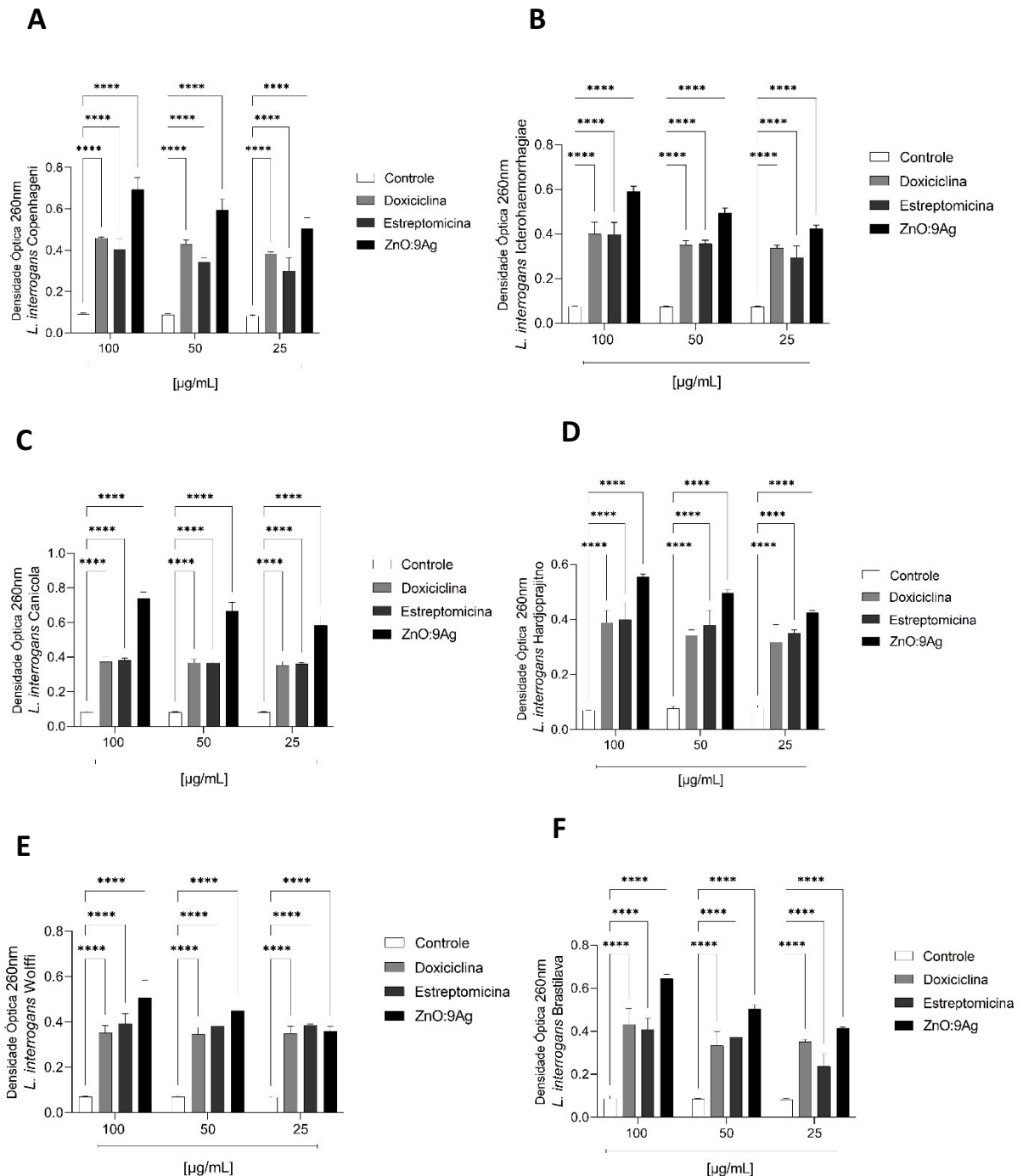


Figura 14. Ensaio de liberação do conteúdo intracelular. Influência do tratamento com doxiciclina, estreptomicina e nanopartícula ZnO:9Ag nas concentrações 25 a 100 µg/mL na liberação do conteúdo intracelular de *L. interrogans* sorovar: Copenhagens (A), Icterohaemorrhagiae (B), Canicola (C), Hardjoprajitno (D), Wolffii (E), Bratislava (F). Leitura da densidade óptica 260nm. Dados mostram média das absorbâncias \pm desvio-padrão, com intervalo de confiança de 95%. Teste análise de variância ANOVA, com pós teste de Tukey. * Indica diferença estatística com o controle, (p-valor <0,05).

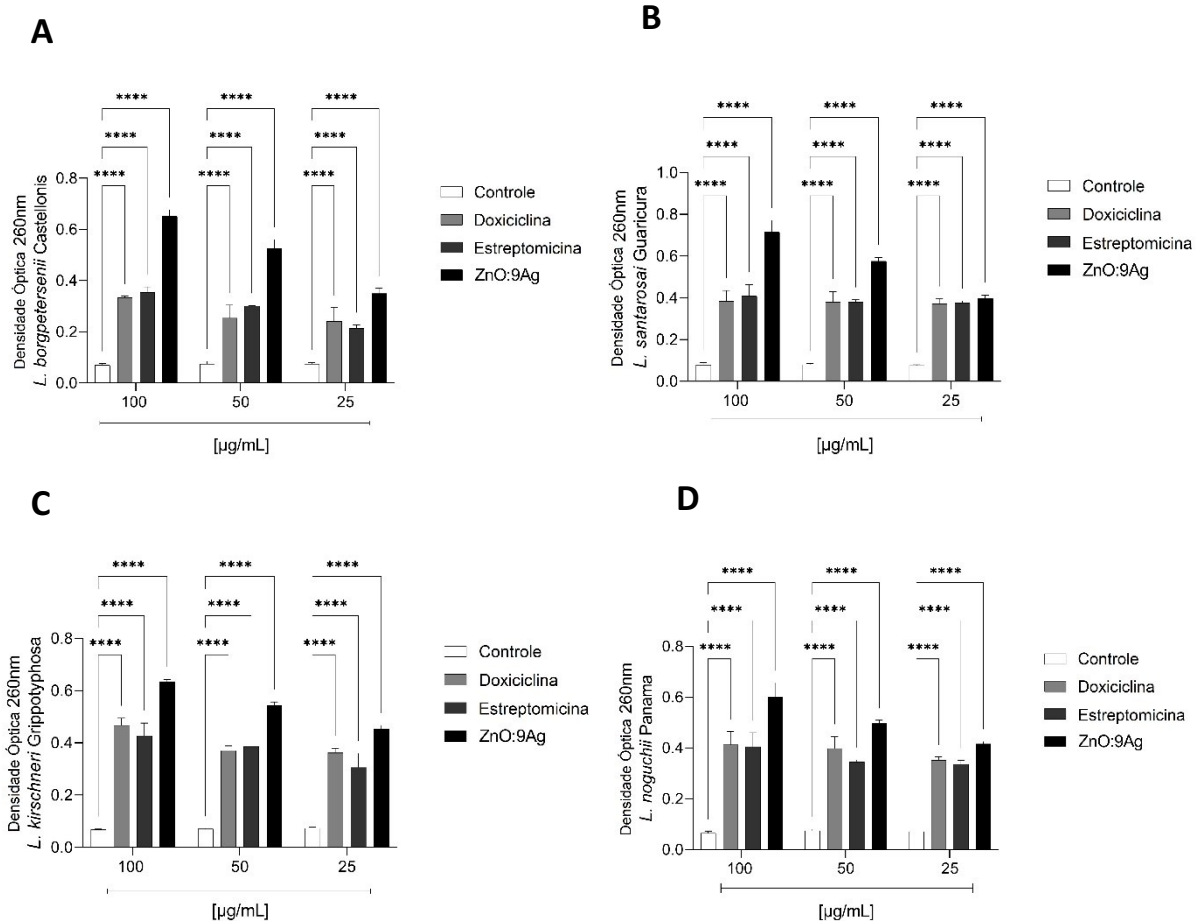


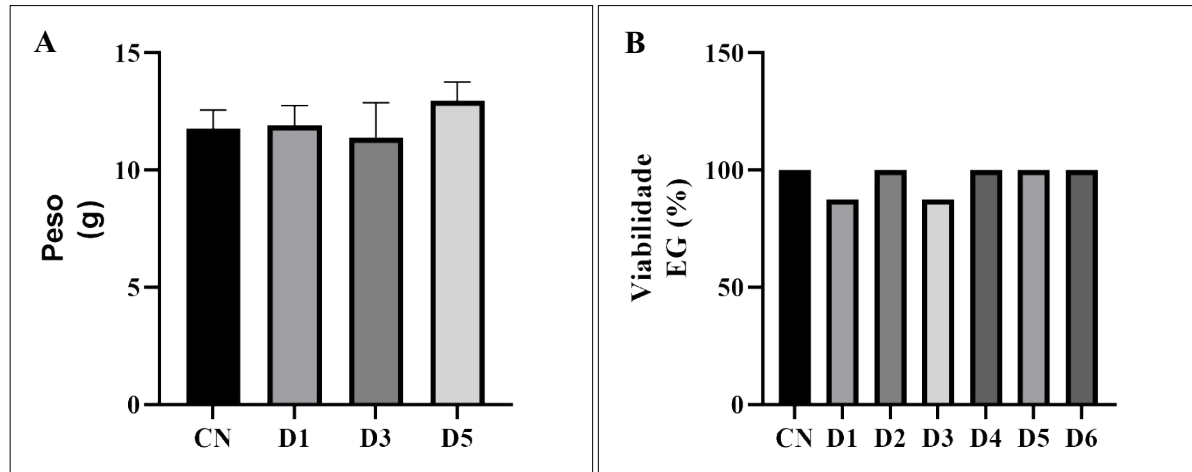
Figura 15. Ensaio de liberação do conteúdo intracelular. Influência do tratamento com doxiciclina, estreptomicina e nanopartícula ZnO:9Ag nas concentrações 25 a 100 µg/mL na liberação do conteúdo intracelular de *L. borgpeterseni* sorovar Castellonis (A), *L. santarosai* sorovar Guaricura (B), *L. kirschneri* sorovar Grippytyphosa (C), *L. noguchii* sorovar Panama (D). Leitura da densidade óptica 260nm. Dados mostram média das absorbâncias \pm desvio-padrão, com intervalo de confiança de 95%. Teste análise de variância ANOVA, com pós teste de Tukey. * Indica diferença estatística com o controle, (p-valor <0,05).

3.5 Ensaios de toxicidade *in vivo* em modelo de embrião de galinha

O ensaio de toxicidade *in vivo* em embriões de galinha revelou que as diferentes concentrações de nanopartículas de prata (ZnO:9Ag) foi tóxico apenas no parâmetro da enzima GGT, em que houve diferença estatística com o controle negativo (p<0,05). Peso ajustado, viabilidade do embrião (Figura 16), e demais biomarcadores da função hepática (ALT, AST, FA) e renal (creatinina e ácido úrico) (Figura 17), não se observaram diferença (p>0,05), sugerindo que não houve dano renal e uma pequena alteração hepática. Na análise macroscópica verificou-se petéquias no pericárdio de um embrião do grupo D3 (100 µg/embrião). Porém mesmo assim os resultados mostram o quanto é segura a utilização de nanopartículas de prata

1 (ZnO:9Ag) para tratamento de leptospirose, pois apresentam atividade anti-*Leptospira* sem
 2 provocar grandes alterações de toxicidade no modelo animal *in vivo*.

3



4

5 **Figura 16:** Peso (g) (A) e viabilidade (%) (B) de embriões de galinha - EG (modelo *in vivo*) ao
 6 teste de toxicidade de nanopartículas de prata (ZnO:9Ag) em diferentes concentrações. CN –
 7 controle negativo (água para injeção); D1 (10 mg/embrião); D2 (1 mg/embrião); D3 (100
 8 µg/embrião); D4 (10 µg/embrião); D5 (1 µg/embrião); D6 (100 ng/embrião). Não houve
 9 diferença estatística entre os grupos pelo teste ANOVA com 5% de significância.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

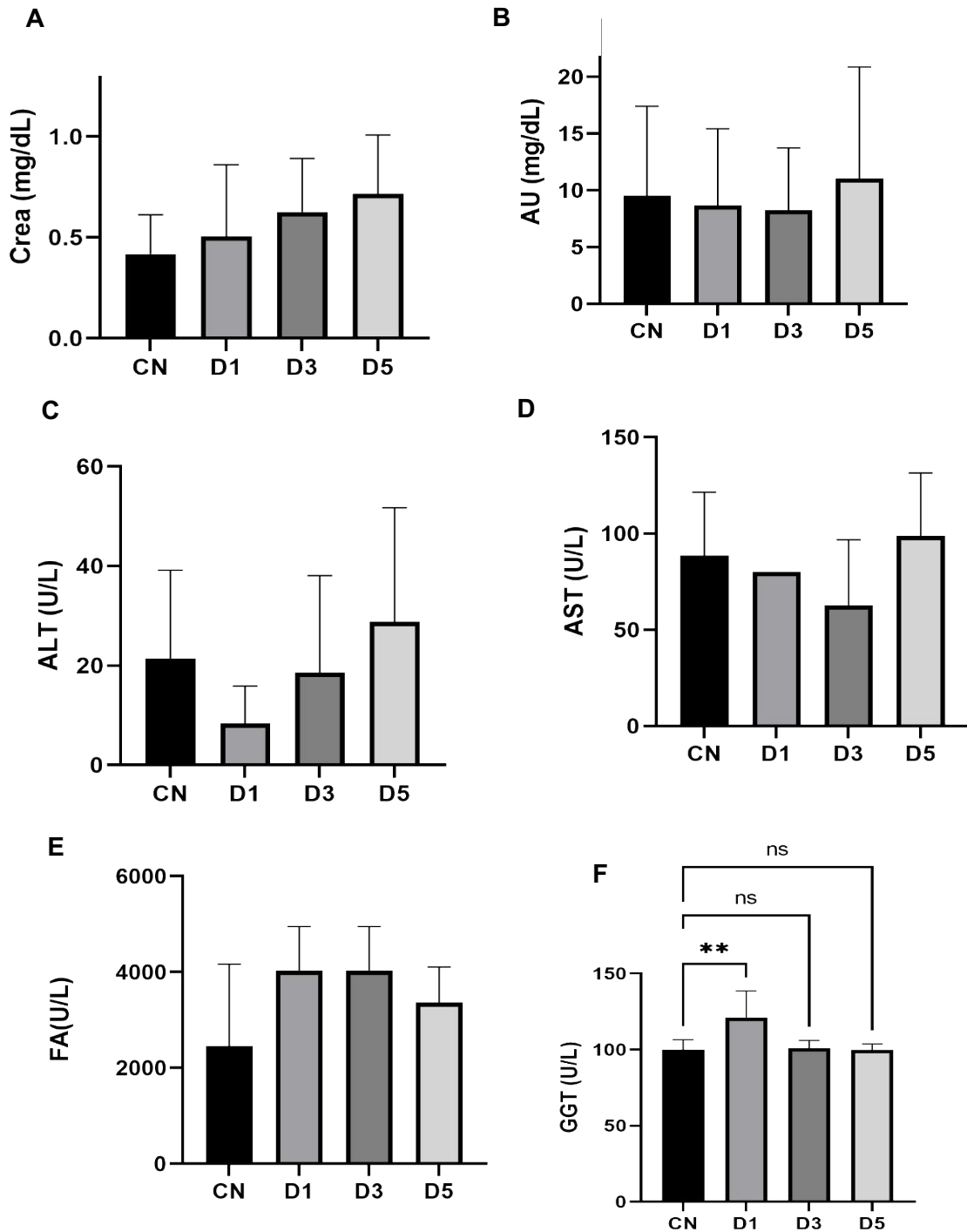


Figura 17. Níveis de Crea (creatinina) (A), AU (ácido úrico) (B), ALT (alanina aminotransferase) (C), AST (aspartato aminotransferase) (D), FA (fosfatase alcalina) (E), GGT (gama glutamiltransferase) (F), em soro sanguíneo de embriões de galinha (EG), após o tratamento com ZnO:9Ag. CN – controle negativo (água para injeção); D1 (10 mg/embrião); D3 (100 µg/embrião); D5 (1 µg/embrião). * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) e os valores são expressos em média \pm desvio-padrão. Teste estatístico ANOVA pós teste de Tukey com 5% de significância.

1 Discussões

2

3 A multirresistência dos microrganismos patogênicos aos antimicrobianos tornou-se um
4 grande obstáculo para o sucesso do diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas em
5 humanos e animais, principalmente bovinos e caninos. Atualmente com os avanços na
6 nanotecnologia foi possível descobrir novos medicamentos que possivelmente ajudam no
7 combate à multirresistência microbiana [28]. A leptospirose é uma doença potencialmente fatal
8 e que na maioria das vezes é tratada de forma empírica pois o diagnóstico rápido e definitivo
9 ainda é tardio. Opções de tratamento são limitadas exigindo decisões terapêuticas que podem
10 abranger o maior número de espécies patogênicas possível a fim de evitar a evolução da doença
11 [23].

12 Estudos anteriores mostraram agentes antimicrobianos efetivos contra cepas padrão de
13 *Leptospira* mantidas em laboratório e estirpes isoladas de várias espécies animais no mundo.
14 Esses resultados demonstraram existir uma grande variação na suscetibilidade das espécies de
15 *Leptospiras* estudadas aos diferentes tipos de tratamento [16,23], assim como encontrado nesta
16 pesquisa. Divergências nos padrões de susceptibilidade podem existir devido diferenças na
17 origem das estirpes, animal ou humano, na região, na virulência das cepas, bem como cepas de
18 laboratórios que perderam sua virulência. Vale ressaltar que independente das variações CIM e
19 da espécie de *Leptospira*, o uso de antibióticos é eficaz no tratamento da leptospirose, porém
20 apresentam toxicidade [15].

21 Atualmente, não existe uma metodologia padrão para avaliar a atividade *in vitro* de
22 agentes antimicrobianos contra espécies de *Leptospira* [23]. O valor MIC nos dias atuais é o
23 melhor parâmetro disponível para refletir a eficácia de um antimicrobiano contra cepas
24 bacterianas [29], entretanto não há diretrizes de suscetibilidade e *break-point* publicadas para
25 *Leptospira* spp. Os resultados MIC encontrados são compatíveis com relatos anteriores de
26 suscetibilidade da *Leptospira* à penicilina G, estreptomicina, doxiciclina e tetraciclina pelo
27 método de microdiluição em caldo [16] e pelo método de macrodiluição [30].

28 Assim como encontrado nesta pesquisa, Correia et al. [30] verificaram menor MIC para
29 penicilina G (0,02 U/mL) e maiores para estreptomicina, doxiciclina e tetraciclina (1,56 µg/mL)
30 em estirpes de *Leptospira* isoladas de bovinos. Em outra pesquisa também foi possível verificar
31 maior efetividade da penicilina G (0,06 U/mL) em comparação aos outros tratamentos,
32 doxiciclina 1 µg/mL, estreptomicina 2 µg/mL, e tetraciclina 2 µg/mL [16], sendo mais difícil a
33 bactéria desenvolver resistência. Possivelmente porque a penicilina G é utilizada somente em
34 casos graves da leptospirose, possui baixo espectro de ação, e raramente é usado como droga

1 única para o tratamento da leptospirose [31]. Sendo um antibiótico bactericida age na formação
 2 da parede de peptidoglicano inibindo a ligação das transpeptidases [32]. Um terço das cepas
 3 apresentaram suscetibilidade reduzida à penicilina G, sendo assim o autor a considerou como
 4 má escolha para o tratamento da leptospirose bovina [30].

5 Não foi verificado diferença dos CIMs entre as cepas dos sorovares Australis, Bataviae
 6 Canicola, Javanica de *Leptospira* para doxiciclina (3,13 µg/mL) e penicilina G (0,39 U/mL)
 7 [32]. Porém em outras pesquisas verificaram-se diferenças no MIC das diferentes espécies
 8 corroborando com os atuais resultados. Correia e colaboradores [30] encontraram variações no
 9 MIC para as espécies *L. interrogans*, *L. noguchii* e *L. santarosai* nos seguintes tratamentos
 10 respectivamente, penicilina G (0,02; 0,01-0,05; 0,01-0,78 U/mL), estreptomicina (0,39; 0,39-
 11 12,5; 0,39-50 µg/mL), doxiciclina (0,2-0,39; 0,2-12,5; 0,39-6,25 µg/mL) e tetraciclina (0,2-
 12 0,39; 0,2-3,13; 0,39-12,5 µg/mL). Divergências nos valores de MIC foi relatado para espécie
 13 *L. kirschneri*, *L. interrogans* em que a tetraciclina apresentou maior MIC seguido da doxiciclina
 14 e maior eficiência encontrado para penicilina G [15].

15 É interessante notar que dentre os antimicrobianos, a doxiciclina e a tetraciclina tiveram
 16 MICs mais altos entre as cepas de *Leptospira* testadas, exceto penicilina G na espécie *L.*
 17 *noguchi* sorovar Panama (50 µg/mL). Isso se justifica por serem antibióticos bacteriostáticos,
 18 sua utilização deve ser cautelosa, uma vez que não são as melhores escolhas de tratamento
 19 segundo estes autores [16,30]. Em cepas obtidas do Egito também foi detectado MICs mais
 20 altos para doxiciclina e tetraciclina [15].

21 Fontes alternativas eficientes de tratamento para leptospirose como o própolis (*Trigona*
 22 *thoracia* Propolis) já foram propostas [32], entretanto pesquisas que testaram a eficiência de
 23 nanopartícula de prata para espécies de *Leptospira* ainda não se tem relatos. Diante dos
 24 resultados 80% das cepas apresentaram CIMs elevados para ZnO:9Ag, embora apresentassem
 25 também efeito anti-*Leptospira*, torna-se uma boa opção terapêutica para leptospirose. A
 26 nanopartícula óxido de zinco dopado com prata (ZnO:9Ag) pode ser potencialmente usada
 27 como agente antibacteriano contra *Leptospira* spp.

28 O uso da prata como alternativa terapêutica foi muito utilizada para tratar pacientes com
 29 feridas abertas e queimaduras. Com o advento da nanotecnologia, a prata voltou a ser usada,
 30 mas agora na forma de nanopartículas [33]. Nanopartículas de prata (AgNPs) exibem potencial
 31 contra bactérias Gram-negativas, com atividade bem consolidada contra cepas multirresistente
 32 e biofilmes de bactérias *Pseudomonas aeruginosa* [34]. Especificamente a nanopartícula óxido
 33 de zinco dopado com prata (ZnO:9Ag) apresentou uma boa opção para controle de bactérias
 34 patogênicas (*Salmonella* spp.) de importância na saúde pública e na cadeia produtiva avícola

[21]. A ação antibacteriana favorável contra *Leptospira* está baseada também em outros trabalhos que verificaram o quanto é significativo a ação de nanopartículas metálicas (ZnO/Ag) contra bactérias patogênicas como *E. coli*, além de atuar contra fungos, são efetivas também em práticas industriais e agrícolas [35].

Nesta pesquisa descobrimos que a nanopartícula ZnO:9Ag no geral foi mais eficaz no ensaio de viabilidade celular que os antimicrobianos testados (penicilina G, estreptomicina, doxiciclina e tetraciclina) para as cinco espécies de *Leptospira*, inviabilizando o crescimento da espiroqueta. Diversas pesquisas descreveram o desempenho citotóxico das nanopartículas de prata contra bactérias patogênicas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *S. Typhimurium*) pelo ensaio do MTT [36]. O ensaio é utilizado como teste de citotoxicidade *in vitro* em culturas celulares, sendo considerado um teste rápido e objetivo. A citotoxicidade é um dos ensaios básicos de avaliação de substâncias tóxicas [37,38].

As espécies de *Leptospira* foram sensíveis a nanopartícula de prata (ZnO:9Ag), pois exibe características marcantes devido à grande área de superfície o que permite o maior contato com os microrganismos provocando sua morte, mesmo em baixas concentrações [34]. Outros autores também afirmaram que o mecanismo de ação das nanopartículas está relacionado ao contato direto com a parede celular bacteriana, seguido de penetração no citoplasma e morte celular [28].

A penetração das AgNPs em bactérias Gram-negativas pode ser considerada mais fácil do que em Gram-positivas, pois a parede celular de peptidoglicano é formada por uma camada mais fina [39], o que provavelmente facilitou sua entrada na célula devido a interação da ZnO:9Ag com a membrana da *Leptospira*. Segundo Khorrami et al. [40], a interação de AgNPs com membranas celulares é basicamente um dos mecanismos de atividade antimicrobiana. De acordo com Coriolino et al. [34], as nanopartículas de prata podem aderir à membrana citoplasmática e à parede celular, causando ruptura, e posteriormente penetram dentro das células, interagem com as estruturas intracelulares e induzem produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, provocando a morte celular.

Em comparação aos tratamentos tradicionais, ZnO:9Ag de forma geral foi o tratamento que apresentou menor porcentagem de viabilidade celular na concentração 100 µg/mL, mostrando ser um excelente agente antibacteriano, causando efeito citotóxico em espécies patogênicas de *Leptospira*. As espécies mais sensíveis na maior concentração da nanopartícula são *L. interrogans* sorovar Copenhageni, *Icterohaemorrhagiae*, *Hardjoprajitno*, *L. noguchii* sorovar Panama, *L. kirschneri* sorovar Grippotyphosa, resultado importante pois são sorovares

1 envolvidos em episódios graves de leptospirose. Penicilina G e estreptomicina também tiveram
2 resultados de efetividade compatíveis com os da literatura, normalmente são utilizados em
3 conjunto, pois apresentam efeito sinérgico uma vez que estreptomicina retira o estado de
4 portador renal [31].

5 O aumento da permeabilidade de membrana e liberação do conteúdo intracelular das
6 espécies de *Leptospira* estão intimamente relacionados com o aumento da concentração (25, 50
7 e 100 µg/mL) dos tratamentos tradicionais amplamente utilizados na clínica veterinária
8 (doxiciclina, estreptomicina) e ZnO:9Ag. Foi possível verificar que estes tratamentos causaram
9 alterações na membrana celular, modificando a permeabilidade e consequentemente aumento
10 da liberação do conteúdo intracelular.

11 No entanto como mencionado anteriormente as nanopartículas de prata interagem com
12 a membrana celular principalmente de bactérias Gram-negativas devido a presença de
13 lipopolissacarídeos carregados negativamente, facilitando a atração da prata, tornando-as
14 bactérias mais sensíveis. Com isso as nanopartículas de prata adentram ao interior das células,
15 causando alterações estruturais na membrana e, consequentemente, afetam sua permeabilidade
16 [41].

17 Segundo Bapat et al. [42], a morte celular é decorrente da formação de depressões e
18 perfurações na membrana, gerando radicais livres, o que leva à liberação de organelas celulares,
19 extravasamento de componentes subcelulares e ainda interfere na cadeia respiratória. Esta
20 suposição ainda foi confirmada, pois pesquisadores observaram surgimento de pigmentos como
21 beta-caroteno, em bactérias submetidas ao tratamento com nanopartículas de prata, sendo,
22 portanto, um mecanismo de defesa encontrado contra o estresse oxidativo [40]. O vazamento
23 de componentes intracelulares sugere que o efeito importante do ZnO:9Ag em espécies
24 patogênicas de *Leptospira* pode ser o dano a membrana e a perda da integridade.

25 Interessante fato observado neste trabalho foi que ZnO:9Ag diferiu do controle na
26 menor concentração 25 µg/mL no teste de permeabilidade de membrana para *L. interrogans*
27 sorovar Copenhageni, mostrando ser uma excelente opção capaz alterar de forma significativa
28 a permeabilidade celular, e consequentemente a morte bacteriana. Ação de agentes
29 antimicrobianos que visam alterar ou destruir membranas bacterianas é altamente atraente pois
30 há menor probabilidade de bactérias gerar resistência a esse mecanismo [25]. Sabendo que o
31 sorovar Copenhageni faz parte do sorogrupo Icterohaemorrhagiae, epidemiologicamente é um
32 dos mais importantes em termos de saúde pública, relacionado a casos mais graves de
33 leptospirose tanto em humanos como em cães [43,44], o que torna este resultado de extrema
34 relevância e inovação para o tratamento de leptospirose.

Outro parâmetro essencial que deve ser avaliado na formulação de novas drogas terapêuticas é a segurança [45]. A avaliação da toxicidade dos fármacos é uma das etapas imprescindíveis na formulação de novos agentes antimicrobianos, normalmente é realizada em animais de laboratórios, porém nos últimos anos vem sendo substituídas por modelos alternativos [46,47]. O embrião de galinha (EG) torna-se um modelo *in vivo* bastante atrativo, capaz de reproduzir resultados confiáveis acerca da toxicidade, biocompatibilidade de novos fármacos, devido seu baixo custo, simplicidade ao manipular, além das questões éticas serem bem menos burocráticas [48,49]. Diante das vantagens optamos por utilizar EG para testar a segurança da ZnO:9Ag.

A nanopartícula de prata (AgNP) não causou variação no peso dos embriões de galinha em relação ao controle, nem diminuiu a porcentagem de viabilidade (mortalidade) dos embriões. Os resultados deste trabalho corroboram com a meta-análise [50], os quais afirmaram que toxicidade da AgNP não foi verificada no parâmetro peso corpóreo em modelo *in vivo* de camundongos na dose de 10 mg/kg após injeção intraperitoneal, e ao menos induziu sintomas nocivos aos animais. Já em outros estudos a toxicidade e a biocompatibilidade da AgNP foram avaliadas *in vivo* e em tempo real usando embriões de peixe-zebra, sugeriam que a toxicidade induzida pela AgNP é dose-dependente, o que dificultou o desenvolvimento normal do embrião [51].

As petéquias no pericárdio observadas em um embrião do grupo D3 na análise macroscópica, está relacionada a possível aumento de frequência cardíaca, o que provavelmente pode gerar interrupção do desenvolvimento embrionário, resultando em eclosão prematura [47], porém no período do experimento não foi verificado nenhuma mortalidade embrionária decorrente da ação da nanopartícula ZnO:9Ag. Estudo integrado *in vitro*, *in silico* e *in vivo* revelaram que as nanopartículas de prata exerceram toxicidade de maneira dependente da dose, tipo de órgão e tamanho da partícula [52].

Além disso, a mensuração das enzimas hepáticas sugeriu um leve dano hepático pois somente a GGT foi diferente do controle. O fígado é particularmente um órgão vulnerável à toxicidade da nanopartícula de prata, sendo o alvo destinado a metabolização do nanocomposto. Estudo revelou que nanocarreadores de prata são depositados no fígado e produzem toxicidade hepática [42]. GGT é uma enzima considerada pouco sensível e inconsistente para o diagnóstico de dano hepático nas aves [53], portanto seu valor diagnóstico ainda é desconhecido.

Essa é a primeira pesquisa que utilizou nanopartículas de prata (ZnO:9Ag) com finalidade antimicrobiana em bactérias do gênero *Leptospira*, sendo considerada uma nova opção para o tratamento de leptospirose.

1 Conclusão

2

3 Os resultados mostram uma grande variação na suscetibilidade antimicrobiana das
 4 espécies de *Leptospira* à penicilina G, estreptomicina, doxiciclina, tetraciclina e nanopartícula
 5 óxido de zinco dopado com prata (ZnO:9Ag). ZnO:9Ag mostrou ser uma alternativa com
 6 grande potencial antibacteriano contra *Leptospira* spp., capaz de inibir seu crescimento, além
 7 ser seguro e pouco tóxico para o organismo. Como estudo pioneiro, apresentou resultados
 8 promissores e inovadores para o tratamento da leptospirose.

9

10 Referências

- 11 1. Posse, T. Medicamentos para o mundo: incentivando a inovação sem obstruir o acesso livre. *Sur*
 12 *Rev. Int. Direitos Hum.* **2008**, 5, 123–149.
- 13 2. Adler, B. Pathogenesis of Leptospirosis: Cellular and Molecular Aspects. *Vet. Microbiol.* **2014**,
 14 172, 353–358, doi:10.1016/j.vetmic.2014.06.015.
- 15 3. Martins, M.H. da M.; Spink, M.J.P. A leptospirose humana como doença duplamente
 16 negligenciada no Brasil. *Ciênc. Saúde Coletiva* **2020**, 25, 919–928, doi:10.1590/1413-
 17 81232020253.16442018.
- 18 4. Adler, B.; de la Peña Moctezuma, A. *Leptospira* and Leptospirosis. *Vet. Microbiol.* **2010**, 140,
 19 287–296, doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012.
- 20 5. Brito Monteiro, M.; Egídio de Sousa, I.; Piteira, M.; Coelho, S.; Freitas, P. Leptospirosis, a Re-
 21 Emerging Threat. *Cureus* **2021**, 13, e14295, doi:10.7759/cureus.14295.
- 22 6. Martins, G.; Lilenbaum, W. Control of Bovine Leptospirosis: Aspects for Consideration in a
 23 Tropical Environment. *Res. Vet. Sci.* **2017**, 112, 156–160, doi:10.1016/j.rvsc.2017.03.021.
- 24 7. Vitale, M.; Agnello, S.; Chetta, M.; Amato, B.; Vitale, G.; Bella, C.D.; Vicari, D.; Presti, V.D.M.L.
 25 Human Leptospirosis Cases in Palermo Italy. The Role of Rodents and Climate. *J. Infect. Public*
 26 *Health* **2018**, 11, 209–214, doi:10.1016/j.jiph.2017.07.024.
- 27 8. Rohilla, P.; Khurana, R.; Kumar, A.; Batra, K.; Gupta, R. Detection of *Leptospira* in Urine of
 28 Apparently Healthy Dogs by Quantitative Polymerase Chain Reaction in Haryana, India. *Vet.*
 29 *World* **2020**, 13, 2411–2415, doi:10.14202/vetworld.2020.2411-2415.
- 30 9. Levett, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, 14, 296–326, doi:10.1128/CMR.14.2.296-
 31 326.2001.
- 32 10. Mohammed, D.H.; Cohen, N.; Hakim, K.; Aziz, F.; Belahsen, R. LEPTOSPIRA: Morphology,
 33 Classification and Pathogenesis. *J. Bacteriol. Parasitol. ISSN2155-9597* **2011**, 2, 2:6,
 34 doi:10.4172/2155-9597.1000120.
- 35 11. Souza, A.A.T. de; Ferreira, F.C.; Rezende, H.D.; Arruda, J.F. de L.; Eça, P.M. da S. Seasonal
 36 Variation and Clinical and Epidemiological Aspects of Human Leptospirosis in the City of
 37 Itaperuna - RJ. *Rev. Médica Minas Gerais* **2014**, 24, doi:10.5935/2238-3182.20140046.
- 38 12. Boletim Epidemiológico - Número Especial, Mar.2021 - Doenças Tropicais Negligenciadas —
 39 Português (Brasil) Available online: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf/view)
 40 [conteudo/publicacoes/boletins/boletins-](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf/view)
 41 [epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf/view](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf/view) (accessed
 42 on 29 January 2022).
- 43 13. Sykes, J.E.; Hartmann, K.; Lunn, K.F.; Moore, G.E.; Stoddard, R.A.; Goldstein, R.E. 2010 ACVIM
 44 Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and
 45 Prevention. *J. Vet. Intern. Med.* **2011**, 25, 1–13, doi:10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x.
- 46 14. Gopi, C.; Sri, C.S.; Krupamai, G.; Magesh, A.R.; Dhanaraju, M.D. Recent Progress in the Treatment
 47 of Leptospirosis. *SN Compr. Clin. Med.* **2021**, 3, 1018–1025, doi:10.1007/s42399-021-00833-3.

15. Ressler, R.A.; Griffith, M.E.; Beckius, M.L.; Pimentel, G.; Miller, R.S.; Mende, K.; Fraser, S.L.; Galloway, R.L.; Hospenthal, D.R.; Murray, C.K. Antimicrobial Susceptibilities of Geographically Diverse Clinical Human Isolates of *Leptospira*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 2750–2754, doi:10.1128/AAC.00044-08.
16. Liegeon, G.; Delory, T.; Picardeau, M. Antibiotic Susceptibilities of Livestock Isolates of *Leptospira*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2018**, *51*, 693–699, doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.12.024.
17. Freire, N.B.; Pires, L.C.S.R.; Oliveira, H.P.; Costa, M.M. Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata sobre isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de organismos aquáticos. *Pesqui. Veterinária Bras.* **2018**, *38*, 244–249, doi:10.1590/1678-5150-pvb-4805.
18. Muthusamy, N.; Kanniah, P.; Vijayakumar, P.; Murugan, U.; Raj, D.S.; Sankaran, U. Green-Inspired Fabrication of Silver Nanoparticles and Examine Its Potential In-Vitro Cytotoxic and Antibacterial Activities. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2021**, *31*, 4693–4709, doi:10.1007/s10904-021-02082-2.
19. Viana, A.V.; Viana, D. dos S.F.; Figueirêdo, G.S. de; Brito, J.E. de; Viana, V.G.F.; Junior, V.G.F.V. Potencial antimicrobiano das nanopartículas de prata estabilizadas em curcumina e extrato de folhas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). *Res. Soc. Dev.* **2021**, *10*, e47610918364–e47610918364, doi:10.33448/rsd-v10i9.18364.
20. Thammawithan, S.; Siritongsuk, P.; Nasompag, S.; Daduang, S.; Klaynongsruang, S.; Prapasarakul, N.; Patramanon, R. A Biological Study of Anisotropic Silver Nanoparticles and Their Antimicrobial Application for Topical Use. *Vet. Sci.* **2021**, *8*, 177, doi:10.3390/vetsci8090177.
21. Fonseca, B.; Silva, P.; Silva, A.C.; Dantas, N.; Paula, A.; Olivieri, O.; Beletti, M.; Rossi, D.; Goulart, L. Nanocomposite of Ag-Doped ZnO and AgO Nanocrystals as a Preventive Measure to Control Biofilm Formation in Eggshell and *Salmonella* Spp. Entry Into Eggs. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, doi:10.3389/fmicb.2019.00217.
22. M07: Dilution AST for Aerobically Grown Bacteria - CLSI Available online: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/> (accessed on 31 January 2022).
23. Murray, C.K.; Hospenthal, D.R. Broth Microdilution Susceptibility Testing for *Leptospira* Spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1548–1552, doi:10.1128/AAC.48.5.1548-1552.2004.
24. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63, doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
25. Devi, K.P.; Nisha, S.A.; Sakthivel, R.; Pandian, S.K. Eugenol (an Essential Oil of Clove) Acts as an Antibacterial Agent against *Salmonella* Typhi by Disrupting the Cellular Membrane. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *130*, 107–115, doi:10.1016/j.jep.2010.04.025.
26. Bennis, S.; Chami, F.; Chami, N.; Bouchikhi, T.; Remmal, A. Surface Alteration of *Saccharomyces Cerevisiae* Induced by Thymol and Eugenol. *Lett. Appl. Microbiol.* **2004**, *38*, 454–458, doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01511.x.
27. Ribeiro, L.N. de M.; de Paula, E.; Rossi, D.A.; Monteiro, G.P.; Júnior, E.C.V.; Silva, R.R.; Franco, R.R.; Espíndola, F.S.; Goulart, L.R.; Fonseca, B.B. Hybrid Pectin-Liposome Formulation against Multi-Resistant Bacterial Strains. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, E769, doi:10.3390/pharmaceutics12080769.
28. Liao, C.; Li, Y.; Tjong, S.C. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 449, doi:10.3390/ijms20020449.
29. Kowalska-Krochmal, B.; Dudek-Wicher, R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathog. Basel Switz.* **2021**, *10*, 165, doi:10.3390/pathogens10020165.
30. Correia, L.; Loureiro, A.P.; Lilenbaum, W. Reduced Susceptibility in *Leptospiral* Strains of Bovine Origin Might Impair Antibiotic Therapy. *Epidemiol. Infect.* **2019**, *147*, e5, doi:10.1017/S0950268818002510.
31. Ellis, W.A. Animal Leptospirosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2015**, *387*, 99–137, doi:10.1007/978-3-662-45059-8_6.

- 1 32. Ismail, S.R.; Ismail, S.; Deris, Z.Z.; Ismail, N. In Vitro Antileptospiral Activity of Trigona Thoracia
2 Propolis and Its Synergistic Effects with Commonly Prescribed Antibiotics. *IJUM Med. J. Malays.*
3 **2020**, *19*, doi:10.31436/ijum.v19i1.1317.
- 4 33. Politano, A.D.; Campbell, K.T.; Rosenberger, L.H.; Sawyer, R.G. Use of Silver in the Prevention and
5 Treatment of Infections: Silver Review. *Surg. Infect.* **2013**, *14*, 8–20, doi:10.1089/sur.2011.097.
- 6 34. de Lacerda Coriolano, D.; de Souza, J.B.; Bueno, E.V.; Medeiros, S.M. de F.R.; Cavalcanti, I.D.L.;
7 Cavalcanti, I.M.F. Antibacterial and Antibiofilm Potential of Silver Nanoparticles against
8 Antibiotic-Sensitive and Multidrug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Strains. *Braz. J. Microbiol.*
9 **2021**, *52*, 267–278, doi:10.1007/s42770-020-00406-x.
- 10 35. Sharma, R.; Kumar, S.; Singh, P.; Kapila, S. Structural, Morphological and Antimicrobial Study of
11 ZnO/Ag Nanoparticles. *Biomed. Pharmacol. J.* **2020**, *13*, 1645–1652, doi:10.13005/bpj/2039.
- 12 36. Salem, S.S.; EL-Belely, E.F.; Niedbała, G.; Alnoman, M.M.; Hassan, S.E.-D.; Eid, A.M.; Shaheen, T.I.;
13 Elkesh, A.; Fouda, A. Bactericidal and In-Vitro Cytotoxic Efficacy of Silver Nanoparticles (Ag-NPs)
14 Fabricated by Endophytic Actinomycetes and Their Use as Coating for the Textile Fabrics.
15 *Nanomaterials* **2020**, *10*, 2082, doi:10.3390/nano10102082.
- 16 37. Vajrabhaya, L.; Korsuwannawong, S. Cytotoxicity Evaluation of a Thai Herb Using Tetrazolium
17 (MTT) and Sulforhodamine B (SRB) Assays. *J. Anal. Sci. Technol.* **2018**, *9*, 15, doi:10.1186/s40543-
18 018-0146-0.
- 19 38. Twarużek, M.; Zastempowska, E.; Soszyczyńska, E.; Ałtyn, I. The Use of in Vitro Assays for the
20 Assessment of Cytotoxicity on the Example of MTT Test. *Acta Univ. Lodz. Folia Biol. Oecologica*
21 **2018**, *14*, 23–32, doi:10.1515/fobio-2017-0006.
- 22 39. Alqahtani, M.A.; Al Othman, M.R.; Mohammed, A.E. Bio Fabrication of Silver Nanoparticles with
23 Antibacterial and Cytotoxic Abilities Using Lichens. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 16781,
24 doi:10.1038/s41598-020-73683-z.
- 25 40. Khorrami, S.; Zarrabi, A.; Khaleghi, M.; Danaei, M.; Mozafari, M.R. Selective Cytotoxicity of Green
26 Synthesized Silver Nanoparticles against the MCF-7 Tumor Cell Line and Their Enhanced
27 Antioxidant and Antimicrobial Properties. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *13*, 8013–8025,
28 doi:10.2147/IJN.S189295.
- 29 41. Mikhailova, E.O. Silver Nanoparticles: Mechanism of Action and Probable Bio-Application. *J.*
30 *Funct. Biomater.* **2020**, *11*, 84, doi:10.3390/jfb11040084.
- 31 42. Bapat, R.A.; Chaubal, T.V.; Joshi, C.P.; Bapat, P.R.; Choudhury, H.; Pandey, M.; Gorain, B.;
32 Kesharwani, P. An Overview of Application of Silver Nanoparticles for Biomaterials in Dentistry.
33 *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2018**, *91*, 881–898, doi:10.1016/j.msec.2018.05.069.
- 34 43. Miotto, B.A.; Tozzi, B.F.; Penteado, M. de S.; Guilloux, A.G.A.; Moreno, L.Z.; Heinemann, M.B.;
35 Moreno, A.M.; Lilenbaum, W.; Hagiwara, M.K. Diagnosis of Acute Canine Leptospirosis Using
36 Multiple Laboratory Tests and Characterization of the Isolated Strains. *BMC Vet. Res.* **2018**, *14*,
37 222, doi:10.1186/s12917-018-1547-4.
- 38 44. Sevá, A.P.; Brandão, A.P.D.; Godoy, S.N.; Souza, G.O.; Souza Filho, A.F.; Jimenez-Villegas, T.;
39 Heinemann, M.B.; Ferreira, F. Seroprevalence and Incidence of *Leptospira* Spp. in Domestic Dogs
40 in the Southeast Region of São Paulo State, Brazil. *Pesqui. Veterinária Bras.* **2020**, *40*, 399–407,
41 doi:10.1590/1678-5150-PVB-6390.
- 42 45. Zosen, D.; Hadera, M.G.; Lumor, J.S.; Andersen, J.M.; Paulsen, R.E. Chicken Embryo as Animal
43 Model to Study Drug Distribution to the Developing Brain. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2021**,
44 *112*, 107105, doi:10.1016/j.vascn.2021.107105.
- 45 46. Shi, L.; Ko, M.L.; Huang, C.C.-Y.; Park, S.-Y.; Hong, M.-P.; Wu, C.; Ko, G.Y.-P. Chicken Embryos as a
46 Potential New Model for Early Onset Type I Diabetes. *J. Diabetes Res.* **2014**, *2014*, e354094,
47 doi:10.1155/2014/354094.
- 48 47. Hrubá, H.; Abdelsalam, E.E.E.; Anisimov, N.; Bandouchova, H.; Havelkova, B.; Heger, T.; Kanova,
49 M.; Kovacova, V.; Nemcova, M.; Piacek, V.; et al. Reproductive Toxicity of Fluoroquinolones in
50 Birds. *BMC Vet. Res.* **2019**, *15*, 209, doi:10.1186/s12917-019-1957-y.

48. Haselgrübler, R.; Stübl, F.; Essl, K.; Iken, M.; Schröder, K.; Weghuber, J. Gluc-HET, a Complementary Chick Embryo Model for the Characterization of Antidiabetic Compounds. *PLOS ONE* **2017**, *12*, e0182788, doi:10.1371/journal.pone.0182788.
49. Khosravi, A.; Sharifi, I.; Tavakkoli, H.; Keyhani, A.R.; Afgar, A.; Salari, Z.; Mosallanejad, S.S.; Bamorovat, M.; Sharifi, F.; Hassanzadeh, S.; et al. Vascular Apoptosis Associated with Meglumine Antimoniate: In Vivo Investigation of a Chick Embryo Model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *505*, 794–800, doi:10.1016/j.bbrc.2018.09.152.
50. Durán, N.; Marcato, P.D.; Conti, R.D.; Alves, O.L.; Costa, F.T.M.; Brocchi, M. Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria, Their Toxicity and Possible Mechanisms of Action. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 949–959, doi:10.1590/S0103-50532010000600002.
51. Lee, K.J.; Nallathamby, P.D.; Browning, L.M.; Osgood, C.J.; Xu, X.-H.N. In Vivo Imaging of Transport and Biocompatibility of Single Silver Nanoparticles in Early Development of Zebrafish Embryos. *ACS Nano* **2007**, *1*, 133–143, doi:10.1021/nn700048y.
52. Mao, B.-H.; Luo, Y.-K.; Wang, B.-J.; Chen, C.-W.; Cheng, F.-Y.; Lee, Y.-H.; Yan, S.-J.; Wang, Y.-J. Use of an in Silico Knowledge Discovery Approach to Determine Mechanistic Studies of Silver Nanoparticles-Induced Toxicity from in Vitro to in Vivo. *Part. Fibre Toxicol.* **2022**, *19*, 6, doi:10.1186/s12989-022-00447-0.
53. Harr, K.E. Clinical Chemistry of Companion Avian Species: A Review. *Vet. Clin. Pathol.* **2002**, *31*, 140–151, doi:10.1111/j.1939-165x.2002.tb00295.x.

1 ANEXO A: Certificado da Comissão de ética na utilização de Animais – CEUA (nº A013/19)



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
- Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) -
 Rua Ceará, S/N - Bloco 2D, sala 08 - Campus Umuarama - Uberlândia-MG
 CEP 38405-315; e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br
 Telefone: 3225-8652



ANÁLISE FINAL Nº A013/19 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Projeto Pesquisa: “Isolamento e caracterização molecular de *Lepstospira* spp. em cães naturalmente infectados atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia”

Pesquisador Responsável: Anna Monteiro Correia Lima

Certificamos que o projeto não deve ser analisado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais – CEUA, pois não manipula diretamente animais vivos para colheita de amostras biológicas, estando de acordo com a legislação federal, “Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.” Portanto, este projeto de pesquisa não faz parte do escopo de avaliação da CEUA. Sem mais.

Uberlândia, 16 de Setembro de 2019.

Prof. Dr. Eucly Vilela Carneiro Girão
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Comissão de Ética na Utilização de Animais /UFU
 Coordenador da CEUA
 Portaria Nº 542 DE 10 DE MAIO DE 2019

1 ANEXO B: Certificado da Comissão de ética na utilização de Animais – CEUA (nº A022/21)

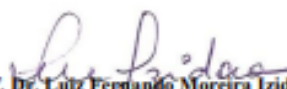
**ANÁLISE FINAL Nº A022/21 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS**

Projeto Pesquisa: “Utilização de embriões de galinha como modelo experimental para estudo toxicológicos de nanopartículas de prata”.

Pesquisador Responsável: Belchiolina Beatriz Fonseca

Declaro para os devidos fins, que o projeto intitulado “Utilização de embriões de galinha como modelo experimental para estudo toxicológicos de nanopartículas de prata” não manipula diretamente animais vivos para colheita de amostras biológicas. Desse modo, por não ferir a ética relacionada à experimentação animal e, estando em conformidade com a legislação federal, Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, não há necessidade de apreciação e aprovação pela Comissão de Ética na Utilização de Animais-CEUA.

Uberlândia, 20 de dezembro de 2021.


Prof. Dr. Lutz Fernando Moreira Izidoro
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comissão de Ética na Utilização de Animais
Coordenador da CEUA
Portaria R Nº 1114/2020