

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Curso de Graduação em Biotecnologia**



**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Utilização de resazurina para quantificação de leptospiras *in vitro***

**Guilherme Augusto Rosa**

**Pelotas, 2019**

**Guilherme Augusto Rosa**

**Utilização de resazurina para quantificação de leptospiras *in vitro***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Alan John Alexander McBride

Coorientador: Dra. Carolina Rodrigues Félix

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

R788u Rosa, Guilherme Augusto

Utilização de resazurina para quantificação de leptospiras *in vitro* / Guilherme Augusto Rosa ; Alan John Alexander McBride, orientador ; Carolina Rodrigues Félix, coorientadora. — Pelotas, 2019.

40 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. *Leptospira* spp.. 2. Resazurina. 3. Quantificação. 4. Fluorescência. I. McBride, Alan John Alexander, orient. II. Félix, Carolina Rodrigues, coorient. III. Título.

CDD : 614.56

Guilherme Augusto Rosa

Utilização de resazurina para quantificação de leptospiras *in vitro*

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 26/11/2019

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alan John Alexander McBride (Orientador, Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Dra. Carolina Rodrigues Félix (Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

MSc. Liana Nunes Barbosa (Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

## **Agradecimentos**

Aos meus pais Décio e Neiva, por todo o apoio e fé que depositam em mim, me incentivando a não desistir e perseguir meus objetivos.

Aos meus irmãos Deise e Douglas, pelas experiências compartilhadas e pelo ótimo exemplo de pessoas que sempre foram para mim.

À minha sobrinha e afiliado, Livia e Matheus, por me lembrarem os bons momentos da minha infância e por me contagiarem com sua alegria.

Aos meus queridos avôs, tios e primos, pelo carinho e laços que compartilhamos e por me mostrarem o significado de “família”.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, dispostos a me fazer rir e a me ajudar, especialmente Arthur, Gabriel e Liana, pela força e apoio essenciais nesta reta final.

Aos colegas Christian, Darling, Gabriela, Giuli e Pamela do Curso de Graduação em Biotecnologia, por fazerem parte deste processo e sempre estarem ao meu lado durante toda nossa trajetória.

Aos queridos colegas do Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Carolina, Elias, Gabriela, Liana e Vitor, por todo o conhecimento e experiências que compartilhamos, por criarem um ambiente de trabalho tão calmo e afetuoso e por sempre facilitarem a rotina de trabalho com seu bom humor.

Aos meus estimados orientadores, Alan, Carolina e Liana, por todo o seu incentivo e competência em me guiarem neste trabalho, e por todo o conhecimento agregado que me concederam.

Palavras não descrevem a importância de todos vocês ao iluminar meu caminho para que eu pudesse segui-lo. O título é dado a mim, mas a conquista pertence a todos nós.

Obrigado por tudo e todos!

*“Tudo o que temos de decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado.” - Gandalf*

*J. R. R. Tolkien*

## Resumo

ROSA, Guilherme Augusto. **Utilização da resazurina para a quantificação de leptospiras *in vitro***. Orientador: Alan John Alexander McBride. 2019. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

O gênero *Leptospira* possui 64 espécies descritas, sendo as bactérias patogênicas deste gênero responsáveis pela leptospirose. A leptospirose possui altas taxas de morbidade e mortalidade em humanos, causando milhares de mortes e milhões de casos graves por ano. Embora seja uma doença relevante, os conhecimentos para manipulação experimental deste patógeno são pouco desenvolvidos, o que se traduz em poucas técnicas de manipulação em condições *in vitro* e experimentais. A falta de desenvolvimento nesta área tem seu impacto até em técnicas simples, como a quantificação de leptospiras. As metodologias alternativas não superam o padrão ouro, apresentando diversas desvantagens. O próprio padrão ouro não é uma técnica de simples execução, sendo um processo tecnicamente exigente, trabalhoso, demorado, demandando pessoal altamente treinado para a sua execução. O objetivo geral deste trabalho é avaliar uma nova metodologia de quantificação de leptospiras a partir do uso da resazurina. A resazurina é um corante azul, que ao contato com o metabolismo de respiração celular, sofre reações de redução e é convertida em resorufina. Esta segunda molécula possui cor rosada e propriedades fluorescentes, o que permite a detecção de metabolismo em uma amostra. Avaliou-se neste trabalho metodologias para experimentos visuais, utilizando leptospiras vivas e leptospiras inativadas termicamente, com diferentes concentrações de resazurina, e metodologias para experimentos com fluorimetria, utilizando diversas concentrações diferentes de leptospiras vivas coradas. Os experimentos visuais demonstraram que a resazurina apenas reage com leptospiras vivas, sendo apenas perceptíveis as reações de mudança da tonalidade azul para a rosa após 3 horas de incubação, a 37 °C, na concentração de  $10^8$  leptospiras/ml com concentrações de 10 e 25 µg/ml de resazurina. Observou-se que concentrações maiores que  $2,5 \times 10^8$  leptospiras/ml estimulavam o efeito da reação de troca de cor de forma mais rápida e intensa que as concentrações menores, exemplificando o papel da concentração de leptospiras. Os experimentos com fluorimetria demonstraram que foi possível detectar a presença de  $1 \times 10^5$  leptospiras/ml em solução, embora não haja diferenças de emissão de fluorescência até a concentração de  $5 \times 10^7$  leptospiras/ml. Também demonstrou-se que, embora possível identificar em quais escalas logarítmicas a amostra pode estar, não houve precisão para indicar em quais extremos do log encontra-se a amostra. Em conclusão, a resazurina apenas reagiu com leptospiras vivas, sendo o mais adequado para a visualização da reação concentrações  $\geq 2,5 \times 10^8$  leptospiras/ml. Em concentrações menores, é necessário período de incubação superior a 3 horas. As concentrações finais de resazurina de 10 e 25 µg/ml foram ideais para as reações visuais, enquanto as concentrações de 50 e 100 µg/ml mostraram-se inadequadas para testes com fluorimetria. A concentração final de 25 µg/ml foi a mais adequada, sendo capaz de definir em qual escala logarítmica a cultura está, a partir da concentração de  $7,5 \times 10^6$  leptospiras/ml.

**Palavras-chave:** *Leptospira* spp.; quantificação; resazurina; fluorescência.

## Abstract

ROSA, Guilherme Augusto. **The use of resazurin for the *in vitro* quantification of leptospires**. Orientador: Alan John Alexander McBride. 2019. 41 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

The *Leptospira* genus now contains 64 species and the pathogenic bacteria of this genus are responsible for leptospirosis. Leptospirosis has high rates of morbidity and mortality in humans, causing thousands of deaths and millions of serious cases yearly. Although it is an important disease, knowledge on the experimental handling of this pathogen is limited, resulting in few techniques for the *in vitro* and experimental handling. The lack of development in this area has an impact on even the most of simple techniques, such as the quantification of leptospires. The alternative methods do not better the the gold standard and have several disadvantages. The gold standard is not simple technique, it is a technically demanding, laborious and time consuming process that requires highly trained personnel for its execution. The main objective of this work was to evaluate a new method for counting leptospires using resazurin. Resazurin is a blue dye that, in presence of the cellular respiration, is reduced to resorufin. This second molecule is a pink coloured dye with fluorescent properties, allowing the detection of metabolism in a sample. In this study, for the manual visual methods were evaluated using live and thermally inactivated leptospires. Different concentrations of resazurin were used in the fluorimetry experiments for the detection of several different concentrations of live stained leptospires. The visual experiments showed that resazurin only reacts with live leptospires and that the colour-change was only observed after 3 hours of incubation at 37 °C; with  $1 \times 10^8$  leptospires/ml and 10 or 25 µg/ml of resazurin. Concentrations  $>2.5 \times 10^8$  leptospires/ml resulted in a more intense and faster colour change compared to the lower concentrations, highlighting the role of leptospire concentration. The fluorimetry experiments showed that it was possible to detect the presence of  $1 \times 10^5$  leptospires/ml in solution, although there was no differences in fluorescence up to  $5 \times 10^7$  leptospires/ml. It was also shown that, although it was possible to identify the logarithmic scale of the sample, it was not possible to attain a more accurate reading. In conclusion, resazurin only reacted with live leptospires, specifically for concentrations of  $2.5 \times 10^8$  leptospires/ml or greater. At lower concentrations, it was necessary to increase the incubation period to over 3 hours. Concentrations of resazurin between 10 and 25 µg/ml were ideal for the visual reactions, while concentrations of 50 and 100 µg/ml were inadequate for the fluorimetry experiments. A final concentration of 25 µg/ml was capable of determining which logarithmic scale the culture was when the concentration of leptospires was  $>7.5 \times 10^6$ /ml.

**Keywords:** *Leptospira* spp.; quantification; resazurin; fluorescence.



## Sumário

1.	Introdução .....	9
1.1.	Objetivos .....	10
1.1.1.	Objetivo geral .....	10
1.1.2.	Objetivos específicos .....	10
2.	Revisão bibliográfica .....	11
2.1.	Leptospirose .....	11
2.2.	Gênero <i>Leptospira</i> .....	12
2.3.	Quantificação de leptosprias .....	13
2.4.	Resazurina .....	14
3.	Metodologia .....	16
3.1.	Leptospiras .....	16
3.2.	Experimentos visuais com resazurina .....	16
3.3.	Experimentos fluorimétricos com resazurina .....	17
3.4.	Experimentos de fluorescência ao longo do período de cultivo .....	18
3.5.	Análise dos dados .....	18
4.	Resultados.....	20
4.1.	Resultados dos experimentos visuais .....	20
4.2.	Resultados dos experimentos com fluorimetria .....	22
4.3.	Resultados dos experimentos de fluorescência ao longo do período de cultivo .....	26
5.	Discussão .....	29
6.	Conclusão .....	32
	Referências.....	33

## 1. Introdução

O gênero *Leptospira* pertence à família Leptospiraceae. Está compreendido na ordem Spirochaetales e possui 64 espécies descritas (Adler, 2015; Vincent et al., 2019). As espécies patogênicas deste gênero são o agente etiológico da leptospirose (Ahmed et al., 2006; Picardeau et al., 2017; Thibeaux et al., 2018; Vincent et al., 2019), uma importante zoonose negligenciada de distribuição mundial (Picardeau et al., 2014), presente em todos os continentes habitados (Adler e De La Pena Moctezuma, 2010). Quando acomete humanos, a leptospirose apresenta altos índices de morbidade e mortalidade, estimando-se mais de 59 mil mortes e um milhão de casos graves por ano (Costa et al., 2015). Embora seja uma doença relevante, o conhecimento sobre o agente etiológico é pouco desenvolvido. Percebe-se a ausência de informação principalmente no âmbito de técnicas para manipulação do microrganismo em condições *in vitro* e experimentais. Técnicas elucidadas em outros microrganismos não se traduzem bem quando testadas em leptospirosas. Isso inclui até técnicas mais simples, como a quantificação de leptospirosas para quaisquer fins, apresentando pouca variabilidade e inovação. O padrão ouro na quantificação de leptospirosas é a contagem manual, e utiliza-se microscopia de campo escuro com o auxílio da câmara de Petroff-Hausser. É um processo tecnicamente exigente, trabalhoso e demorado que demanda pessoal altamente treinado para obter resultados confiáveis (Murray et al., 2010).

Existem métodos alternativos para a quantificação de leptospirosas, mas estes ainda apresentam diversas desvantagens. Uma destas metodologias alternativas descrita mais recentemente é a citometria de fluxo (Fontana, 2017). Esse método não apresenta ganho de sensibilidade significativo quando comparado à microscopia de campo escuro, e necessita de equipamentos e insumos caros. Tal método, embora eficaz, se mostra custoso, principalmente quando há a necessidade de leitura e quantificação de um grande número de amostras, o que pode dificultar o acesso e amplo uso dessa metodologia por pesquisadores.

A resazurina, principalmente utilizada em testes de viabilidade celular, é um corante de baixo custo, não-citotóxico, com capacidades de emissão de fluorescência após sofrer redução (Twigg, 1945; Rampersad, 2012). As metodologias utilizando resazurina são de fácil aplicação, e podem ser adaptadas para analisar diversas amostras biológicas. Este corante já foi aplicado com sucesso

para quantificar unidades formadoras de colônias em biofilmes de outras espécies bacterianas (Peeters et al., 2008; Driessche et al., 2014), o que torna a resazurina uma interessante alternativa para a quantificação de leptospiros.

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo geral**

- Avaliar uma metodologia de quantificação de leptospiros a partir do uso de resazurina.

### **1.1.2. Objetivos específicos**

- Avaliar se a resazurina é capaz de reagir somente com leptospiros vivos;
- Avaliar quais concentrações de resazurina, partindo de 10 µg/ml até 250 µg/ml, são eficazes para aplicação nas análises de fluorescência;
- Determinar a leitura da fluorescência em amostras com diferentes concentrações bacterianas, a partir de  $1 \times 10^5$  até  $7,5 \times 10^8$  leptospiros/ml;
- Demonstrar se existem diferenças nas leituras de fluorescência conforme aumenta a concentração bacteriana nas amostras;
- Estabelecer um valor de fluorescência padrão correspondente a concentração de leptospiros/ml presentes em cada amostra.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Leptospirose

A leptospirose está presente em todos os continentes habitados, sendo a única exceção a Antártida (Adler e De La Pena Moctezuma, 2010). É uma importante zoonose negligenciada de distribuição mundial (Picardeau et al., 2014). Mundialmente, estima-se mais de 59 mil mortes e um milhão de casos graves por ano (Costa et al., 2015). No Brasil, desde 2007 até julho de 2019, foram relatados mais de 72.000 casos de leptospirose e mais de 6.800 óbitos, sendo cerca de 6000 casos e 300 óbitos no Rio Grande do Sul (Brasil, 2019). Estima-se que o número real de casos de leptospirose seja bem maior que o número relatado, pois trata-se de uma doença facilmente confundida por outras doenças febris, e também por não ser uma doença de notificação compulsória (Haake e Levett, 2015).

A leptospirose é mais incidente em regiões tropicais, onde a sua ocorrência está associada com épocas chuvosas e o aumento de enchentes. As condições sanitárias precárias em países menos desenvolvidos, e a grande população de roedores infectados em meio urbano facilitam ainda mais a transmissão da doença nestas regiões (Haake e Levett, 2015). Isso deve-se principalmente pela capacidade do patógeno em sobreviver em ambientes úmidos, o que potencializa o risco de exposição nestas circunstâncias e a infecção de animais suscetíveis (Haake et al., 2002; Bharti et al., 2003). Em países desenvolvidos, a leptospirose é considerada uma doença ocupacional, normalmente relacionada com a prática de esportes, atividades recreativas e viagens turísticas (McBride et al., 2005; Pappas et al., 2008; Haake e Levett, 2015).

A transmissão da doença se dá principalmente através da penetração da bactéria em pele ou mucosa após o contato direto com urina e tecidos contaminados, ou contato indireto por solo ou água contaminados por urina (Haake e Levett, 2015). Diferentes hospedeiros reservatórios são responsáveis pelo patógeno em circulação em cada cenário epidemiológico particular (Haake e Levett, 2015). A bactéria possui um caráter generalista, com vários reservatórios selvagens ou domésticos, especialmente pequenos roedores, pequenos

marsupiais, bovinos, suínos e cães (Adler e De La Pena Moctezuma, 2010). O humano é considerado um hospedeiro acidental (Levett, 2001; Bharti et al., 2003; Evangelista e Coburn, 2010; OMS, 2011; Haake e Levett, 2015). Sendo assim, o contato com água ou solo contaminado se dá por atividades ocupacionais ou recreativas, dependendo do cenário epidemiológico. Ocupações que apresentam um risco considerado elevado são veterinários e outros profissionais que lidam diretamente com animais infectados, atividades como trabalhos realizados ao ar livre, exercícios militares e agricultura em regiões tropicais em períodos de alta pluviosidade, sendo o último exemplo o mais expressivo numericamente (Haake e Levett, 2015).

A leptospirose apresenta um desenvolvimento e manifestações clínicas variadas em humanos, e a gravidade destas manifestações é relacionada à cepa e/ou ao sorovar envolvido, tamanho do inóculo, bem como a idade, estado de saúde e imunidade do indivíduo infectado (Ko et al., 2009; Evangelista e Coburn, 2010). Após um período de incubação médio de 5 a 14 dias (Ko et al., 2009), a fase inicial da leptospirose em humanos apresenta-se tipicamente como uma doença febril inespecífica, causando febre aguda, mialgia e dores de cabeça (Haake e Levett, 2015). Entretanto, de 5 a 15% dos casos, pode haver progressão para manifestações graves de leptospirose, como a Síndrome de Weil. Esta clássica manifestação da leptospirose severa caracteriza-se por sintomas como disfunção hepática e icterícia, insuficiência renal aguda, hemorragia pulmonar, miocardite e meningoencefalite (Ko et al., 2009). Alternativamente, a Síndrome hemorrágica pulmonar grave associada à leptospirose, também uma forma severa de leptospirose, possui taxa de mortalidade acima de 50%, podendo ocorrer morte 72 horas após o surgimento dos sintomas (Ko et al., 2009; Sondergaard et al., 2016).

## **2.2. Gênero *Leptospira***

O gênero *Leptospira* pertence à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e possui 64 espécies (Adler, 2015; Vincent et al., 2019). As bactérias desse gênero possuem morfologia fina e espiralada, com motilidade impulsionada por dois endoflagelos localizados nas duas extremidades do seu periplasma (Murray, 2015). Seu comprimento varia de 10 a 20  $\mu\text{m}$ , e possuem

cerca de 0,15  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Também podem apresentar uma ou duas das suas extremidades em forma de gancho (Picardeau, 2017).

As espécies patogênicas deste gênero possuem a capacidade de infectar diversos hospedeiros mamíferos devido ao seu caráter generalista, e algumas espécies podem sobreviver no ambiente por longos períodos de tempo (Adler e De La Pena Moctezuma, 2010; Cameron, 2015; Picardeau, 2017). As espécies patogênicas possuem 260 diferentes sorovares associados, e 60 diferentes sorovares de espécies saprófitas (Adler e De La Pena Moctezuma, 2009). Dentre todas as espécies do gênero, há mais de 300 sorovares (Adler, 2015; Picardeau, 2017; Thibeaux et al., 2018), distribuídos em 18 sorogrupos (Levett, 2015).

### **2.3. Quantificação de leptospiras**

A quantificação padrão de leptospiras atualmente é realizada manualmente através do uso de microscopia de campo escuro com o auxílio da câmara de Petroff-Hausser. Devido à alta motilidade das leptospiras dentro de um mesmo campo ou entre os campos da câmara, a contagem utilizando a Petroff-Hausser é demorada, requer operadores bem treinados e falta reprodutibilidade (Murray et al., 2010). Além disso, é um processo que demanda muita atenção do operador e que se torna cansativo quando há um número elevado de amostras para contagem. Ainda que possua tais limitações, a microscopia de campo escuro com câmara de Petroff-Hausser se mantém como padrão ouro para a quantificação de leptospiras. Dentro destas limitações, diversos pesquisadores já buscaram outras técnicas alternativas para a quantificação de leptospiras.

Muitas das técnicas desenvolvidas apresentam claras vantagens quando comparadas ao padrão ouro, mas possuem limitações que tornam seu uso pouco convencional, caro, ou útil apenas em situações onde a concentração de leptospiras já está muito elevada. A metodologia de quantificação por densidade óptica é rápida e extremamente simples, porém incapaz de discriminar leptospiras vivas e mortas. Além disso, leptospiras possuem baixa capacidade de absorção de luz, e em consequência desta característica, apenas concentrações celulares de pelo menos  $10^7$  leptospiras/ml (Schreier et al., 2009), são necessárias para que obtenha-se uma densidade óptica detectável.

Outras metodologias incluem a utilização de contador Coulter (Humberd et al., 2005), citometria de fluxo (Fontana et al., 2017), e PCR quantitativo em tempo real (Lambert et al., 2012; Lourdault et al., 2009). Tais técnicas permitem uma leitura rápida e com maior sensibilidade de detecção, algumas até se equiparando em questões de sensibilidade com o padrão ouro. Porém, o uso de insumos caros nas metodologias de citometria de fluxo, bem como PCR quantitativo em tempo real, torna custosa a leitura de múltiplas amostras. Da mesma forma, ambas técnicas exigem pessoal treinado para suas execuções. Destas técnicas alternativas, a única capaz de diferenciar entre leptospirosas vivas de mortas é a citometria de fluxo.

#### **2.4. Resazurina**

A resazurina é uma molécula de coloração azulada, e utilizada pela primeira vez em análises biológicas de quantificação bacteriana no leite (Weselsky, 1871; Pesch e Simmert, 1929). Foi utilizada pela primeira vez para leituras com fluorescência em 1964 (Guilbault e Kramer, 1964). É uma substância estável e não-citotóxica, que quando em contato com o metabolismo de respiração celular, é reduzida para uma segunda molécula, a resorufina (Twigg, 1945; Guilbault e Kramer, 1964; Barnes et al., 1980; Page et al., 1993).

Dentre as principais diferenças entre a resazurina e a resorufina, está o fato de que a resazurina, originalmente, não apresenta propriedades fluorescentes. Após a exposição ao metabolismo celular, e a sua conseqüente redução à resorufina, esta segunda molécula possui tais características. A excitação entre os comprimentos de onda de 530 a 570 nm fazem a resorufina emitir sinais nos comprimentos de onda de 590 a 620 nm (Barnes et al., 1980; Page et al., 1993; Rampersad, 2012). Além disto, a diferença também se dá em questão de cor. O forte tom azulado inicial da resazurina é substituído proporcionalmente por tons roxos até tons rosados, conforme esta molécula é reduzida para resorufina (Pesch e Simmert, 1929; Twigg, 1945). Isso permite a diferenciação de amostras por colorimetria (Ahmed et al., 1994; Zhi-Jun et al., 1997; Zalata et al., 2002; Borra et al., 2009) ou por fluorimetria (Guilbault e Kramer, 1964; Guilbault e Kramer, 1965; Page et al., 1993), bem como diversas análises biológicas.

O fato da resazurina não ser tóxica e apresentar mudança de cor e fluorescência gradualmente conforme é reduzida é um dos principais motivos desta molécula ser empregada em diversas metodologias de avaliação de citotoxicidade (Mosmann, 1983; Nociari et al., 1998; O'Brien et al., 2000), monitoramento da saúde celular (Ahmed et al., 1994; O'Brien et al., 2000) e de função e controle do ciclo celular (Farinelli et al., 1996; White et al., 1996; Mizuno et al., 2004; Durrant et al., 2008; Yang et al., 2008; Yao et al., 2012; Rampersad, 2012). Da mesma forma, o seu uso já foi empregado em diversas linhagens celulares, incluindo fibroblastos (Voytik-Harbin et al., 1998), linhagens imortalizadas e células cancerígenas (Page et al., 1993; Nakayama et al., 1997; Al-Nasiry et al., 2007), linfócitos humanos e de camundongos (Ahmed et al., 1994; de Fries et al., 1995), culturas primárias de células neuronais (White et al., 1996) e diversas outras linhagens de células mamíferas (Bols et al., 2003; Davoren et al., 2005; Rampersad, 2012).

A resazurina também mostrou-se eficaz em testes de suscetibilidade antimicrobiana (Yajko et al., 1995; Lozano-Chiu et al., 1998; Rampersad, 2012). Também já foi utilizada em diversas espécies de bactérias, leveduras, fungos (Peeters et al., 2008; Driessche et al., 2014; Fai et al., 2009; Monteiro et al., 2012), incluindo o seu uso para a quantificação de biofilme em diversas espécies bacterianas, com um bom grau de detecção, de  $10^3$  até  $10^7$  unidades formadoras de colônia, em *Staphylococcus aureus* (Peeters et al., 2008; Driessche et al., 2014).



### **3. Metodologia**

#### **3.1. Leptospiras**

A cepa bacteriana utilizada nos experimentos foi a cepa não patogênica Castellon 3 de *Leptospira borgpetersenii* sorogrupo Ballum sorovar Castellonis. Descongelou-se 1 ml da cepa, proveniente do banco de cepas do Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas da Universidade Federal de Pelotas, em 5 ml de meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH++) (Ellinghausen e McCullough, 1965; Johnson e Harris, 1967; Grassmann et al., 2015), suplementado albumina de soro bovino e soro de coelho estéril. Após um período de sete dias em recuperação do descongelamento, a cultura passou a ser utilizada nos experimentos.

A manutenção *in vitro* desta cepa se deu por repiques semanais em meio EMJH++ e cultivada a 28 °C em estufa incubadora biológica. A avaliação da qualidade da cultura foi realizada previamente a cada repique, sendo este sempre realizado com uma cultura com leptospiras móveis, sem vestígios de células mortas e contaminantes, e em fase exponencial de crescimento bacteriano.

#### **3.2. Experimentos visuais com resazurina**

Para determinar se há reação da resazurina apenas com leptospiras vivas, sem interferência das bactérias mortas, realizou-se experimentos visuais, utilizando cultura de leptospiras e resazurina. O objetivo deste experimento é observar se a presença de leptospiras mortas em uma amostra gera reações que poderiam ser interpretadas como o metabolismo de leptospiras vivas.

Para os testes utilizamos leptospiras vivas, previamente observadas e contadas em microscopia de campo escuro com auxílio da câmara de Petroff-Hausser. Após a quantificação das bactérias, estas foram diluídas em meio EMJH++, levando em consideração a concentração final desejada. Separou-se a cultura em dois grupos: i) células vivas, que apenas receberiam a solução de resazurina e ii) células mortas, que passariam por um tratamento de inativação térmica a 56 °C por 20 minutos, e após o fim deste tratamento, receberia a solução

de resazurina. Também utilizou-se um controle de reação, apenas com resazurina e meio de cultura estéril, com ausência de microrganismos na amostra. As amostras do grupo (i) foram feitas em duplicata. Realizou-se este experimento por 3 vezes.

Utilizamos a concentração final bacteriana de  $1 \times 10^8$  leptospiras/ml, com as concentrações finais de 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  e 250  $\mu\text{g/ml}$  de resazurina, onde para cada amostra, adicionou-se 1:5 de solução com resazurina e 4:5 de cultura de leptospiras. Após a inativação térmica das leptospiras, e a adição das soluções de resazurina nas 4 diferentes concentrações finais nos grupos de leptospiras vivas e mortas, bem como no controle, iniciou-se um período de incubação de 3 horas a 37 °C, para todas as amostras, simultaneamente. A cada hora, observou-se o andamento da reação e as amostras foram fotografadas para registrar qualquer mudança de cor.

### **3.3. Experimentos fluorimétricos com resazurina**

Para os experimentos fluorimétricos com resazurina, contou-se leptospiras para obter as concentrações finais desejadas de  $1 \times 10^5$  leptospiras/ml até  $7,5 \times 10^8$  leptospiras/ml. Utilizou-se 3 diferentes concentrações finais pré-definidas de resazurina, de 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  e 100  $\mu\text{g/ml}$ . Realizou-se três experimentos pilotos, cada um com uma dessas concentrações pré-estabelecidas de resazurina, para verificar qual das concentrações se demonstrava mais eficaz em termos de sensibilidade e amplitude de fluorescência. Através da leitura, procurou-se estipular a concentração de resazurina que apresenta a maior diferença entre cada escala de concentração de leptospiras, e também qual possui maior sensibilidade, em questão de detectar com maior precisão as concentrações mais baixas de leptospiras.

Adicionou-se resazurina na proporção de 1:5 em cultura de leptospiras, completando o volume final de 3 ml, em duplicatas. Após adicionar resazurina em todas as amostras a serem lidas, incubou-se a reação por 3 horas a 37 °C. Simultaneamente, utilizou-se como o branco das leituras, para a remoção de *background*, uma solução de resazurina na mesma proporção e concentração final utilizada nas leituras, de 1:5 de resazurina em meio EMJH base estéril, sem cultivo

de leptospiras. Ao fim do período de incubação, realizou-se a leitura de fluorescência de cada uma das amostras, para as leituras excitação de 540 nm e emissão em 590 nm em fluorímetro Shimadzu<sup>TM</sup>, modelo RF-5301 PC. Foram realizados três experimentos utilizando a melhor concentração de resazurina, a partir dos resultados obtidos nos experimentos pilotos.

### **3.4. Experimentos com fluorescência ao longo do período de cultivo**

Para avaliar como comporta-se a emissão de fluorescência de uma cultura ao longo da toda sua fase exponencial, e também a amplitude do perfil de fluorescência nas menores concentrações de leptospiras, foram realizadas leituras diárias das culturas acrescidas de resazurina. Para isso, iniciou-se duas culturas de leptospiras com o inóculos iniciais de  $10^5$  leptospiras/ml em 80 ml de meio EMJH++, dispostos em frascos de cultivo celular de 150 ml. Diariamente, retirou-se o volume de 2,4 ml destas culturas para as análises de fluorescência, e 100  $\mu$ l para a contagem em microscopia de campo escuro, de acordo com a técnica padrão ouro utilizando câmara de Petroff-Hausser.

As análises de fluorescência utilizaram resazurina na concentração final de 25  $\mu$ g/ml, adicionada na proporção de 1:5 de resazurina em cultura de leptospiras, completando o volume final de 3 ml para cada amostra. Utilizou-se como o branco das leituras, para a remoção de *background*, uma solução de resazurina na mesma proporção e concentração final utilizada nas leituras, de 1:5 de resazurina, em meio EMJH base estéril, sem cultivo de leptospiras. Incubou-se a reação por 3 horas a 37 °C. Após o período de incubação, realizou-se a leitura de fluorescência em fluorímetro, seguindo os padrões de comprimentos de onda de 540 nm para excitação e 590 nm para emissão.

### **3.5. Análise dos dados**

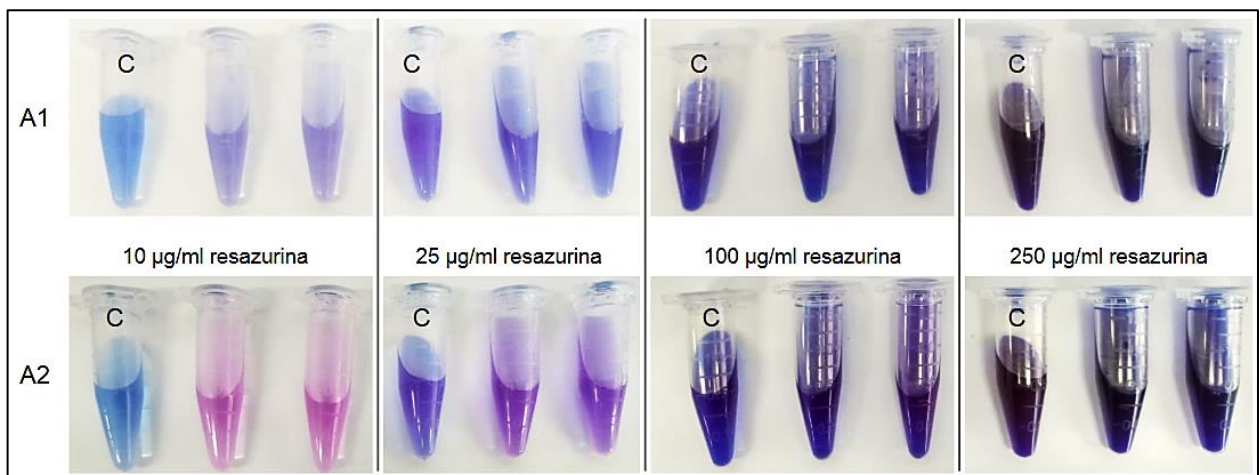
Os dados obtidos nos experimentos foram utilizados para a confecção de gráficos para a melhor análise dos resultados. Estes foram feitos através do software GraphPad Prism 7. Também utilizou-se esse software para análise estatística, realizando testes de tendência linear em regressão exponencial para os

dados obtidos, para avaliar se os dados obtidos se comportam de forma proporcional.

## 4. Resultados

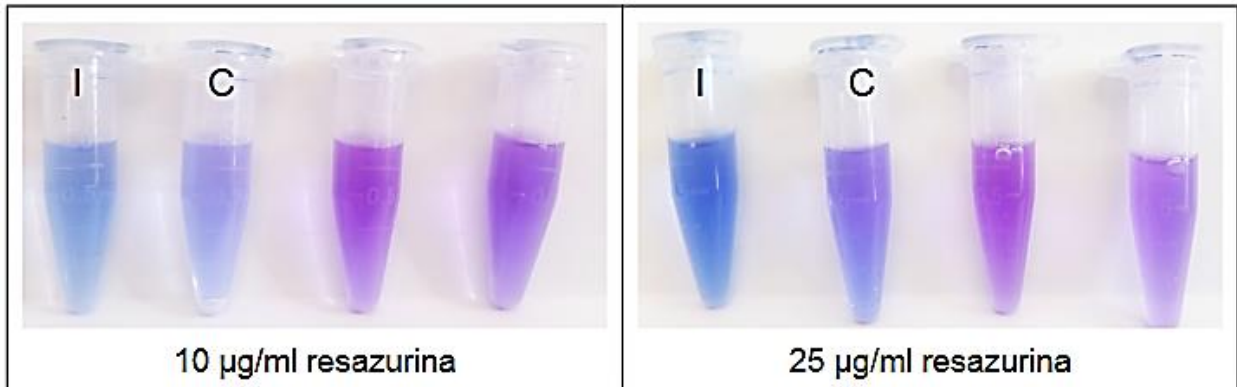
### 4.1. Resultados dos experimentos visuais

A partir dos experimentos para avaliar visualmente a ação da resazurina frente leptospiros vivas e mortas, observou-se que esta apenas reage e é convertida a resorufina quando em contato com leptospiros vivas, perceptível através da mudança de tonalidade da amostra. Nas primeiras duas horas de incubação, não há diferença indubitável de tonalidade. Após o período de incubação de 3 horas, a mudança de tonalidade da cor azul inicial (controles de reação) para tons de rosa e roxo foi perceptível em amostras com leptospiros vivas, como demonstrado na figura 1.



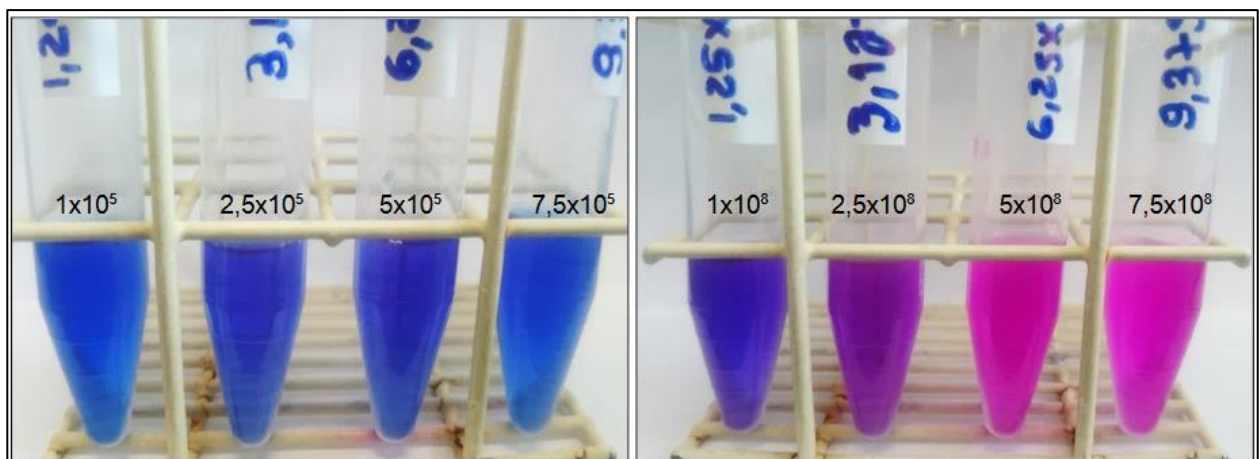
**Figura 1** – Avaliação visual da reação de leptospiros vivas em diferentes concentrações de resazurina. A1) Amostras após uma hora de incubação; A2) Amostras após o período de incubação de 3 horas. As diferentes concentrações de resazurina/ml estão apresentadas nos conjuntos amostrais. As amostras marcadas com a letra C representam os controles das reações.

No experimento, a resazurina exposta a leptospiros inativadas termicamente não reage, de forma a ser convertida em resorufina. Após as duas primeiras horas de incubação, a diferença entre as leptospiros inativadas termicamente e vivas é pouco perceptível. Ao fim da terceira hora de incubação, é possível perceber que as amostras com leptospiros vivas tiveram mudança de tonalidade, como esperado, porém, as amostras com leptospiros inativadas termicamente permaneceram na mesma tonalidade, conforme representado na figura 2.



**Figura 2** – Avaliação visual da reação de leptospiros inativadas termicamente em diferentes concentrações de resazurina. Fotos comparativas após o período de incubação de três horas, sendo as amostras i) leptospiros inativadas termicamente, marcadas com a letra I; ii) controle apenas com meio, marcadas com a letra C; iii) duplicatas contendo leptospiros vivas.

No experimento realizado com diferentes concentrações de leptospiros vivas e concentração final de resazurina de 25 µg/ml, percebe-se que conforme há o aumento da concentração celular, a reação ocorre de forma mais rápida e mais intensa. A troca de tonalidade é acentuada conforme a resazurina é exposta a um grande número de leptospiros vivas. Os resultados deste experimento encontram-se representados na figura 3. A troca de tonalidade do azul para o rosa ou roxo também é muito influenciada pela concentração bacteriana na amostra. Após o período de incubação de 3 horas, concentrações celulares altas apresentam uma tonalidade rosada muito intensa.



**Figura 3** – Avaliação visual da intensidade da reação com diferentes concentrações de leptospiros vivas. Comparação do aumento da intensidade dos tons rosas conforme a concentração de leptospiros na amostra após o período de incubação.

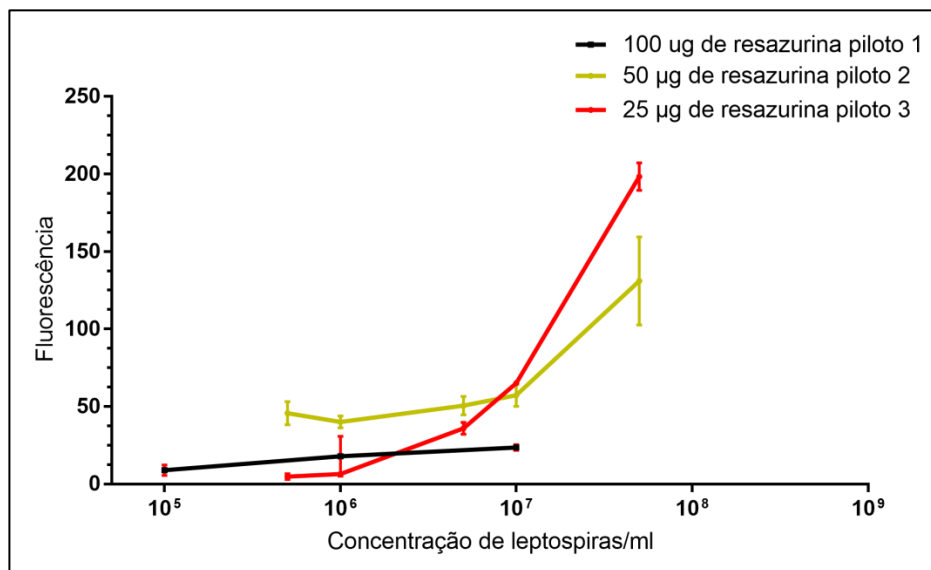
A partir destes experimentos visuais representado pela figura 1, determinou-se que as concentrações de resazurina mais adequadas para estes testes são as

concentrações de 10 µg/ml e 25 µg/ml, pois são as concentrações que melhor apresentam diferença visual após três horas de incubação. Igualmente observável que, quando inativadas, as leptospiras são incapazes de realizar estas trocas de tonalidade, a partir da conversão da resazurina em resorufina, como representado na figura 2. Também é possível perceber que a concentração celular está diretamente ligada com a velocidade que a reação ocorre, sendo altas concentrações celulares responsáveis por uma maior troca de tonalidade em menos tempo, como observado na figura 3.

#### 4.2. Resultados dos experimentos com fluorimetria

Inicialmente, três experimentos pilotos utilizando as concentrações de finais de 25 µg/ml, 50 µg/ml e 100 µg/ml de resazurina foram realizados.

O piloto 1, utilizando a concentração de 100 µg/ml apresentou leituras de fluorescência muito baixas, e muita variabilidade entre elas, o que torna esta concentração pouco promissora para os testes reais, visto que a leitura obtida não representa com precisão a concentração da amostra. Testes futuros com esta concentração foram descontinuados. As leituras médias de fluorescência obtidas foram de 8,8, 17,9, 23,5, para as concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  leptospiras/ml, respectivamente, conforme representado na figura 4.



**Figura 4** – Gráfico representando as leituras de emissão de fluorescência dos experimentos piloto 1, 2 e 3, utilizando a concentração final de 100, 50 e 25 µg/ml de resazurina, respectivamente. As linhas representam as médias das duplicatas, e as barras o desvio padrão entre as amostras.

A concentração de 50 µg/ml do piloto 2 demonstrou-se já com maior resolução que a concentração de 100 µg/ml, com valores de fluorescência com uma maior amplitude de diferença entre as menores concentrações e as maiores, sendo os valores médios obtidos de 45,6, 40,1, 50,5, 57,2 e 131,0, para as concentrações celulares de  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  e  $5 \times 10^7$  leptospiras/ml, respectivamente, conforme representado na figura 5. Finalmente, a concentração de 25 µg/ml do piloto 3 aumentou ainda mais esta amplitude, já observada na concentração de 50 µg/ml. Os valores médios de fluorescência obtidos foram de 4,8, 6,4, 36,0, 65,1, 198,3, para as concentrações celulares de  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  e  $5 \times 10^7$  leptospiras/ml. As leituras apresentaram maiores diferenças entre as diferentes escalas de concentração, e também a diferença entre cada escala torna-se perceptível mais cedo, conforme representado na figura 4.

As concentrações que possuem maior amplitude de sinal, com a diferença mais expressiva entre as menores e as maiores emissões de fluorescência obtidas são as concentrações de 25 µg/ml e 50 µg/ml de resazurina. A concentração de 25 µg/ml se demonstrou melhor em questão de identidade entre cada escala de concentração de leptospiras e apresentou menor variabilidade, sendo. A partir dos resultados obtidos nesses experimentos pilotos, definiu-se a concentração 25 µg/ml de mais adequada para a proposta de diferenciação da concentração de bactérias nas amostras.

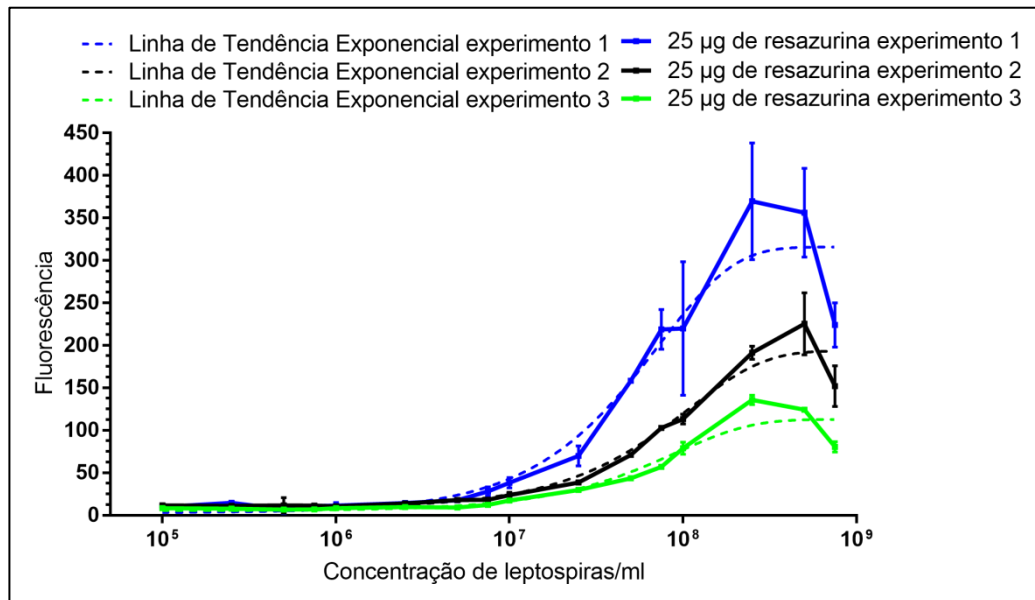
A partir dos resultados obtidos nesses experimentos pilotos, definiu-se a concentração de 25 µg/ml como a mais adequada para a proposta de diferenciação da concentração de bactérias nas amostras, pois é a concentração que melhor difere as concentrações celulares, e também possui a maior amplitude de sinal. Realizou-se 3 repetições do experimento com a concentração de 25 µg/ml.

As leituras de fluorescência média para os experimentos 1, 2 e 3 estão representados na tabela 1 e os resultados de cada experimento estão representados na figura 5.



**Tabela 1** – Leituras de fluorescência média obtidas das duplicatas das diferentes concentrações de leptospira a 25 µg/ml de resazurina por experimento.

Concentração de leptospiras/ml	Leituras de fluorescência médias		
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
$1 \times 10^5$	9,7	11,5	8,4
$2,5 \times 10^5$	14,6	11,0	7,8
$5 \times 10^5$	7,0	11,7	6,6
$7,5 \times 10^5$	10,7	11,4	6,9
$1 \times 10^6$	11,5	10,7	8,4
$2,5 \times 10^6$	14,4	13,9	9,7
$5 \times 10^6$	17,6	17,9	9,1
$7,5 \times 10^6$	28,1	18,1	12,2
$1 \times 10^7$	38,4	23,7	17,3
$2,5 \times 10^7$	69,9	38,7	29,8
$5 \times 10^7$	158,4	70,9	43,6
$7,5 \times 10^7$	218,6	102,8	56,9
$1 \times 10^8$	220,0	113,4	79,0
$2,5 \times 10^8$	369,7	191,2	135,9
$5 \times 10^8$	356,2	225,5	124,2
$7,5 \times 10^8$	224,0	152,0	80,5



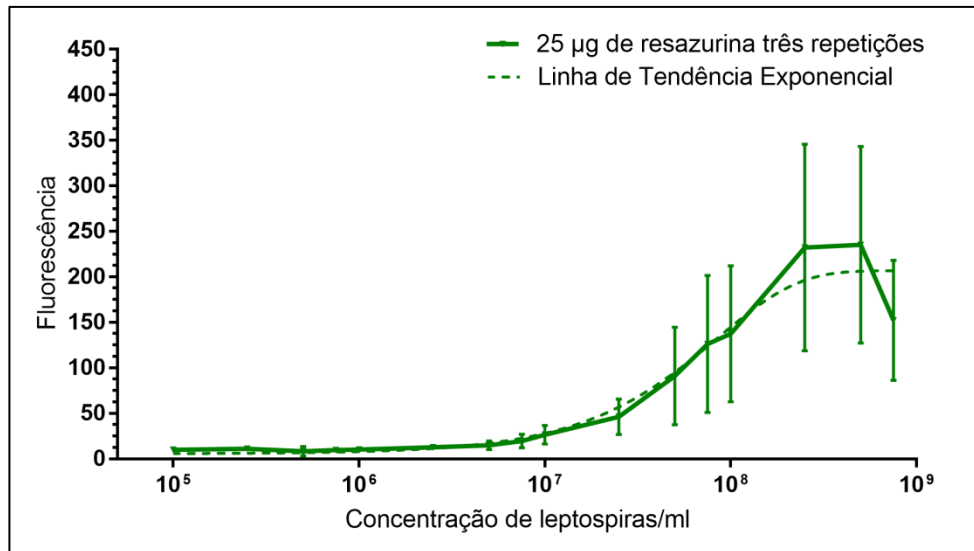
**Figura 5** – Gráfico representando as leituras de emissão de fluorescência das três repetições dos experimentos da concentração final de 25 µg/ml de resazurina. Em azul está representado o experimento 1, em preto o experimento 2, e em verde o experimento 3. As linhas representam as médias das duplicatas, e as barras o desvio padrão entre as amostras. As linhas pontilhadas representam as linhas de tendência em regressão exponencial, sendo o  $R^2$  igual a 0,9095 para o experimento 1, 0,9441 para o experimento 2 e 0,9185 para o experimento 3.

Todas as repetições se comportaram apresentando a mesma tendência, com curvas que apresentavam características semelhantes, por exemplo, apresentar maiores emissões médias de fluorescência a partir da concentração celular de  $1 \times 10^7$ , e apresentar quedas nas emissões médias de fluorescência a partir da concentração de  $2,5 \times 10^8$ . Porém, conjunto dos resultados dos experimentos 1, 2 e 3 apresentou muita variabilidade entre cada repetição, principalmente conforme a concentração celular das amostras aumenta. A grande divergência destas leituras representam que os resultados obtidos não indicam com clareza a concentração das amostras. Embora as curvas apresentem um padrão de comportamento, a emissão obtida apresenta uma amplitude muito grande para uma mesma concentração. Isso pode confundir a leitura de uma concentração com concentrações próximas dentro de uma mesma potência logarítmica. Em relação às concentrações menores, os valores de fluorescência obtidos são muito semelhantes, e apresentam pouca variabilidade em várias das escalas iniciais, apresentando pouca diferença entre uma escala e outra, o que torna a diferenciação entre essas escalas pouco confiável.

**Tabela 2** – Leituras de fluorescência médias dos experimentos combinados.

Concentração de leptospiras/ml	Leitura de fluorescência média
$1 \times 10^5$	9,9
$2,5 \times 10^5$	11,1
$5 \times 10^5$	8,5
$7,5 \times 10^5$	9,7
$1 \times 10^6$	10,2
$2,5 \times 10^6$	12,7
$5 \times 10^6$	14,9
$7,5 \times 10^6$	19,5
$1 \times 10^7$	26,5
$2,5 \times 10^7$	46,1
$5 \times 10^7$	91,0
$7,5 \times 10^7$	126,1
$1 \times 10^8$	137,5
$2,5 \times 10^8$	232,3
$5 \times 10^8$	235,3
$7,5 \times 10^8$	152,2

As leituras médias de fluorescência considerando os três experimentos estão representados na tabela 2, e os resultados obtidos a partir destes valores médios estão representados na figura 6.

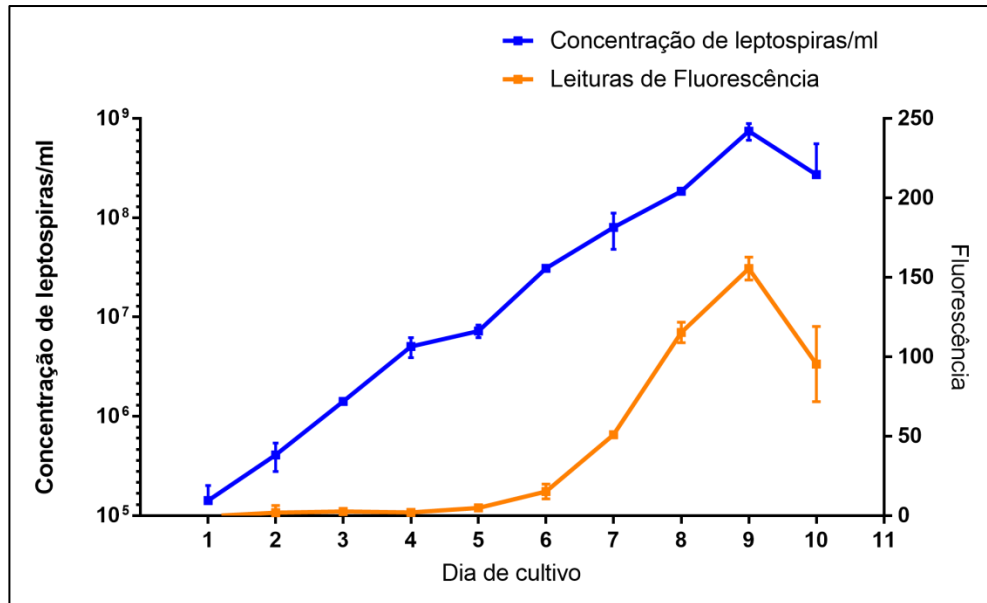


**Figura 6** – Gráfico representando as leituras de emissão de fluorescência das três repetições dos experimentos da concentração final de 25 µg/ml de resazurina. As linhas representam as médias das duplicatas de todos os 3 experimentos combinados, e as barras o desvio padrão entre as amostras. A linha pontilhada representa a linha de tendência em regressão exponencial, sendo o  $R^2$  encontrado igual a 0,6889.

#### 4.3. Resultados dos experimentos de fluorescência ao longo do período de cultivo

A partir do experimento acompanhando uma cultura de leptospiras ao longo do seu período de cultivo, foi possível testar se as leituras de fluorescência se comportariam de forma semelhante ao observado nos experimentos anteriores, realizados todos com as bactérias na mesma fase de cultivo.

Ao longo do período de cultivo, houve a contagem manual utilizando a câmara de Petroff-Hausser em microscopia de campo escuro para o acompanhamento da concentração bacteriana da cultura. Os resultados desta contagem estão representados na figura 7.



**Figura 7** – Gráfico representando as contagens e as leituras de fluorescência obtidas das culturas em duplicata ao longo do período de 10 dias de cultivo bacteriano. A linha azul representa as médias das contagens, e suas barras o desvio padrão entre as contagens. A linha laranja representa as leituras de fluorescência média obtidas, e as barras o desvio padrão entre as amostras.

As emissões de fluorescência médias obtidas para cada concentração de leptospiros durante todo o período de cultivo estão representadas na tabela 3, e também demonstrados na figura 7.

**Tabela 3** – Leituras de fluorescência médias obtidas ao longo do período de cultivo.

Concentração de leptospiros/ml	Leitura de fluorescência média
$1,1 \times 10^5$	0
$3,26 \times 10^5$	2,583
$1,13 \times 10^6$	2,639
$4 \times 10^6$	2,046
$5,8 \times 10^6$	4,916
$2,48 \times 10^7$	15,263
$6,4 \times 10^7$	50,987
$1,48 \times 10^8$	115,341
$6 \times 10^8$	155,603
$4,96 \times 10^8$	95,387

Os valores obtidos a partir deste teste sugerem que a cultura se comporta de forma semelhante em suas diferentes fases. Independente da fase de crescimento bacteriano que as leptospiros encontram-se, as leituras de fluorescência apresentam

um comportamento semelhante aos dos outros testes realizados para cada diferente concentração celular quando utiliza-se a mesma concentração final de 25 µg/ml de resazurina. Também observou-se os mesmos problemas anteriores, de aumento na variabilidade das leituras de fluorescência conforme a concentração celular aproxima-se de valores acima de  $2 \times 10^8$  leptospiras/ml.

## 5. Discussão

Apesar de mais de 100 anos utilizando leptospiras para pesquisas científicas, pouco evoluiu com relação as técnicas empregadas, por exemplo, para quantificação desses microrganismos. A utilização da câmara de Petroff-Hausser é um passo importante para o desfecho de diversos experimentos com leptospiras, apesar de suas limitações. Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de abordagens alternativas para a quantificação de bactérias. Sabendo de tal necessidade acerca da quantificação de leptospiras, e considerando a simplicidade de uso da resazurina e sua aplicação em diversas áreas, empregou-se essa molécula para testar uma nova metodologia em quantificação de leptospiras.

A partir dos resultados obtidos nos testes visuais, comprovou-se que ela reage somente com leptospiras vivas, apresentando mudanças de tonalidade após 3 horas a partir da concentração de  $10^8$  leptospiras/ml, especialmente em concentrações acima de  $2,5 \times 10^8$  leptospiras/ml. Os resultados dos testes visuais demonstram com clareza o que é descrito na literatura, a respeito do metabolismo de respiração celular converter a resazurina em resorufina e isso ser detectável através da mudança de cor (Ahmed et al., 1994; Zhi-Jun et al., 1997; Zalata et al., 2002; Rampersad, 2012). Apenas as leptospiras que realmente estão com o metabolismo ativo irão reagir com a resazurina e reduzi-la a resorufina (Mosmann, 1983; Yajko et al., 1995; Lozano-Chiu et al., 1998; Nociari et al., 1998; O'Brien et al., 2000; Rampersad, 2012). Essa reação é proporcional tanto ao tempo quanto à concentração do microrganismo na amostra. Ao isolar a variável do tempo e trabalhar apenas com a variável da concentração celular, foi possível observar que maiores concentrações celulares eram capazes de deixar a amostra com uma tonalidade rosa muito intensa ao fim da incubação. Esta mudança de tonalidade escalava de acordo com o aumento da concentração celular, e tornava-se facilmente distinguível a olho nu nas concentrações acima de  $2,5 \times 10^8$ . Embora as concentrações menores tivessem mudança de cor, esta poderia não ser perceptível a olho nu. A concentração de  $1 \times 10^8$  leptospiras/ml, por exemplo, quando lê-se sua emissão em fluorescência, apresenta claras diferenças da concentração de  $1 \times 10^5$  leptospiras/ml. Porém, visualmente, a diferença de tonalidade é pouco perceptível a olho nu. A partir desta análise, percebe-se que a incubação por 3 horas não é o

suficiente para demonstrar todas as nuances da mudança de cor em concentrações celulares pequenas, e também concentrações celulares altas, de até  $1 \times 10^8$  leptospiras/ml, embora a partir da concentração de  $2,5 \times 10^8$  leptospiras/ml, e principalmente acima de  $5 \times 10^8$  leptospiras/ml, a diferença de cor torna-se muito evidente após uma incubação de 3 horas.

De forma semelhante, também observou-se o comportamento esperado da resazurina nos experimentos de fluorimetria. Após a exposição da resazurina com organismos vivos, neste caso leptospiras, as amostras passaram a emitir fluorescência detectável (Guilbault e Kramer, 1964; Guilbault e Kramer, 1965; Page et al., 1993; Rampersad, 2012; Driessche et al., 2014). A respeito da análise de fluorescência, percebe-se que a metodologia testada é incapaz de diferenciar concentrações celulares de  $1 \times 10^5$  até  $7,5 \times 10^6$  leptospiras/ml. Além disso, nas concentrações maiores percebe-se uma alta variabilidade no padrão de leitura, e também uma queda no valor de fluorescência obtido a partir do valor de  $2,5 \times 10^8$ , mesmo quando em testes visuais, estas concentrações apresentam uma coloração mais intensa que as anteriores. Apesar da metodologia ser capaz de perceber a presença de leptospiras em baixas concentrações bacterianas, uma vez que há emissão de fluorescência, esta não possui precisão para indicar qualquer que seja sua concentração. Em concentrações celulares mais altas, é possível ter uma ideia da escala logarítmica em que a cultura se encontra, porém os valores apresentam muita variabilidade para ser possível afirmar em qual extremidade de concentração dentro da mesma escala logarítmica se encontra a cultura. Futuras repetições e aperfeiçoamento da técnica são necessárias para determinar quais foram os motivos desta variabilidade. Quando aplicada para a quantificação através de fluorimetria em outros microorganismos, as medidas de fluorescência eram lidas em um leitor de placas a cada 5 minutos por 20 horas, ou até atingirem o limite estipulado pelo teste antes de voltarem ao período de incubação (Driessche et al., 2014). Por uma limitação de equipamento, nestes experimentos apresentados, a metodologia foi adaptada, de forma que a leitura de amostras acontecesse de forma manual e individualmente, o que mantém as amostras fora de incubação por períodos longos, acima de 30 minutos, o que influencia negativamente o teste. Além disto, nestes trabalhos, conforme o aumento da concentração de microorganismos, a fluorescência sempre escalou de forma linear (Peeters et al., 2008; Driessche et al.,

2014), o que não se demonstrou verdade nos testes realizados em leptospiras, onde a emissão de fluorescência começava a estacionar e declinar a partir da concentração de  $2,5 \times 10^8$  leptospiras/ml. Não encontrou-se na literatura possíveis causas a respeito do declínio da fluorescência nas concentrações acima de  $2,5 \times 10^8$  leptospiras/ml, embora a reação colorimétrica continue intensificando-se mesmo acima deste valor. Em outros trabalhos de quantificação bacteriana utilizando a fluorescência com resazurina, independente da concentração celular e dos valores de fluorescência obtidos, esses sempre se comportaram de forma proporcional, escalando conforme a concentração bacteriana da amostra (Peeters et al., 2008; Driessche et al., 2014). Talvez em função da própria turbidez da amostra, ou funções metabólicas das leptospiras alteradas em fases tardias de curvas de crescimento bacteriano (Navarro Llorens et al., 2010), o excesso de fluorescência seja mitigado, embora a reação de conversão de resazurina para resorufina continue acontecendo normalmente, conforme observado visualmente.

O experimento realizado ao longo do período de cultivo demonstrou que a emissão de fluorescência se comporta de forma semelhante durante o período de crescimento bacteriano, quando compara-se a emissão de fluorescência com as emissões obtidas nos outros experimentos, exceto quando a cultura atinge fases muito tardias de crescimento bacteriano, onde observou-se quedas nas emissões em fase estacionária. Através dos resultados obtidos, percebemos que as leituras se mantêm com os mesmos padrões já observados nos outros experimentos, porém apresentando menor variabilidade entre cada amostra, e também demonstrando as mesmas limitações da técnica em relação a concentrações acima de  $2,5 \times 10^8$ . Destaca-se nesse experimento o fato das leituras se comportarem de forma semelhante, principalmente acerca de amostras com alta concentração de leptospiras/ml, neste caso, próximas ou acima de  $6 \times 10^8$  bactérias, a fluorescência começa a antingir um platô e a apresentar quedas nos seus valores. Esta queda expressiva na leitura de fluorescência ocorreu simultaneamente com a transição para a fase estacionária e fase de declínio bacteriano, o que pode demonstrar que a alteração metabólica nas leptospiras faça com que a reação com a resazurina ocorra de forma menos eficiente quando em fases muito tardias de cultivo bacteriano.



## 6. Conclusão

- A resazurina reage apenas com leptospiras vivas, embora apenas 3 horas de reação não seja a mais adequada para se observar visualmente a reação em concentrações menores que  $2,5 \times 10^8$  leptospiras/ml, sendo necessário concentrações mais altas, ou período de incubação acima de 3 horas;
- As concentrações finais de resazurina de 10  $\mu\text{g/ml}$  e 25  $\mu\text{g/ml}$  são as mais adequadas para os testes visuais, pois são as que apresentam melhor contraste para a visualização da reação;
- As concentrações finais de resazurina de 50  $\mu\text{g/ml}$  e 100  $\mu\text{g/ml}$  não são adequadas para testes de fluorimetria, devido à sua pouca amplitude de fluorescência e alta variabilidade, incluindo em concentrações celulares abaixo de  $1 \times 10^7$  leptospiras/ml;
- A concentração final de 25  $\mu\text{g/ml}$  de resazurina é a mais adequada para testes de fluorimetria;
- A concentração final de 25  $\mu\text{g/ml}$  de resazurina pode definir em qual escala logarítmica está a cultura quando acima de  $7,5 \times 10^6$  leptospiras/ml, embora incapaz de indicar com exatidão em qual extremo de concentração a cultura se encontra;
- A concentração final de 25  $\mu\text{g/ml}$  de resazurina não permite que de  $1 \times 10^5$  até  $7,5 \times 10^6$  leptospiras/ml sejam distinguíveis entre si;
- A metodologia com resazurina pode ser apropriada para detecção de leptospiras vivas em uma amostra isolada;
- A aplicação de resazurina parece promissora para a quantificação em leptospiras, porém a técnica ainda precisa de aperfeiçoamento.

## Referências

- ADLER, B. e DE LA PENA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdan, v. 140, n. 3, p. 287-296, 2010.
- ADLER, B. Leptospira and Leptospirosis. 1. ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015. **Current topics in Microbiology and Immunology**, v.387, doi:10.1007/978-3-662-45059-8.
- AHMED, S. A.; et al. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, n. 2, p. 211–224, 1994.
- AHMED, N., et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, [s. l.], v.5, p. 28. 2006.
- AL-NASIRY, S.; et al. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1304–1309, 2007.
- BARNES, S.; SPENNEY, J. G. Stoichiometry of the nadh-oxidoreductase reaction for dehydrogenase determinations. **Clinica Chimica Acta**, v. 107, n. 3, p. 149–154, 1980.
- BHARTI, A. R.; et al. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, 2003.
- BOLS, N. C.; et al. Chapter 2 Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, v. 6, n. C, p. 43–84, 2005.

BORRA, R. C.; et al. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. **Brazilian Oral Research**, v. 23, n. 3, p. 255–262, 2009.

CAMERON, C. E. Leptospiral structure, physiology, and metabolism. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 21–41, 2015.

COSTA, F., et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v.9, n.9, p. e0003898. 2015.

DAVOREN, M.; *et al.* Assessing the potential of fish cell lines as tools for the cytotoxicity testing of estuarine sediment aqueous elutriates. **Toxicology in Vitro**, v. 19, n. 3, p. 421–431, 2005.

DE FRIES, R.; MITSUHASHI, M. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: Comparison of alamar blue™ assay to 3h-thymidine incorporation assay. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 9, n. 2, p. 89–95, 1995.

DRIESSCHE, F. Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 98, p. 31-34, 2014.

DURRANT, D.; et al. Mechanism of cell death induced by cis-3, 4', 5-trimethoxy-3'-aminostilbene in ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 110, n. 1, p. 110–117, 2008.

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. Leptospira as an emerging pathogen: A review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 1413–1425, 2010.

FAI, P. B.; GRANT, A. A rapid resazurin bioassay for assessing the toxicity of fungicides. **Chemosphere**, v. 74, n. 9, p. 1165–1170, 2009.

FARINELLI, S. E.; GREENE, L. A. Cell cycle blockers mimosine, cyclopirox, and deferoxamine prevent the death of PC12 cells and postmitotic sympathetic neurons after removal of trophic support. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 1150–1162, 1996.

FONTANA, C. Use of flow cytometry for rapid and accurate enumeration of live pathogenic *Leptospira* strains. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 132, n. 1, p. 34-40, 2017.

GRASSMANN, A., et al. Generation of Mammalian Host-adapted *Leptospira interrogans* by Cultivation in Peritoneal Dialysis Membrane Chamber Implantation in Rats. **Bio-protocol**, Sunnyvale, v.5, e1536, 2015.

GUILBAULT, G. G.; KRAMER, D. N. Fluorometric Procedure for Measuring the Activity of Dehydrogenases. **Analytical Chemistry**, v. 37, n. 10, p. 1219–1221, 1965.

GUILBAULT, G. G.; KRAMER, D. N. New Direct Fluorometric Method for Measuring Dehydrogenase Activity. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 13, p. 2497–2498, 1964.

HAAKE, D. A.; et al. Leptospirosis, Water Sports, and Chemoprophylaxis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 9, p. e40–e43, 2002.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 65–97, 2015.

HUMBERD, C. M; et al. Enumerating *Leptospira* Using the Coulter Counter. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, n. 5, p. 962–963, 2005.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736–747, 2009.

LAMBERT, A.; et al. Chemotactic behavior of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 23, p. 8467–8469, 2012.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001.

LOURDAULT, K.; AVIAT, F.; PICARDEAU, M. Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 648–655, 2009.

LOZANO-CHIU, M.; LANCASTER, M. V.; REX, J. H. Evaluation of a colorimetric method for detecting amphotericin B- resistant *Candida* isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 31, n. 3, p. 417–424, 1998.

MCBRIDE, A. J. A.; et al. Leptospirosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 18, n. 5, p. 376–86, 2005.

MIZUNO, R.; et al. Inhibition of MKP-1 expression potentiates JNK related apoptosis in renal cancer cells. **Journal of Urology**, v. 172, n. 2, p. 723–727, 2004.

MONTEIRO, M. C.; et al. A new approach to drug discovery: High-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 17, n. 4, p. 542–549, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MURRAY, G. L. The molecular basis of leptospiral pathogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 139–185, 2015.

MURRAY, G. L.; et al. Use of luminescent *Leptospira interrogans* for enumeration in biological assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 2037–2042, 2010.

NAKAYAMA, G. R.; et al. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, n. 2, p. 205–208, 1997.

NAVARRO LLORENS, J. M.; TORMO, A.; MARTÍNEZ-GARCÍA, E.. Stationary phase in gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 4, p. 476–495, 2010.

NOCIARI, M. M.; et al. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v. 213, n. 2, p. 157–167, 1998.

O'BRIEN, J.; et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000.

ORGANIZATION, W. H. Report of the second meeting of the Leptospirosis Burden. **Epidemiology Reference Group**. p.37. 2011

PAGE, B.; PAGE, M.; NOEL, C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. **International Journal of Oncology**, Athenes, v. 3, n. 3, p. 473–476, 1993.

PAPPAS, G.; et al. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 351–357, 2008.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 157–165, 2008.

PESCH, K. L.; SIMMERT, U. Untersuchungen über den Frischeitzustand der Milch. Bestimmung der Wasserstoffionen-Konzentration und der Reductionzeit. **Milchw Forsch**, v. 8, p. 551, 1929.

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? **Nat Rev Microbiol**, v.15, n. 5, p. 297-307, 2017.

RAMBERSAD, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 2012.

SAÚDE, M. D. (Brasil). **Leptospirose**: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. 2019. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/leptospirose>. Acesso em: 13 nov. 2019.

SCHREIER, S.; et al. Leptospirosis research: fast, easy and reliable enumeration of mobile leptospire. **Biological Research**, v. 42, n. 1, 2009.

SCHREIER, S.; TRIAMPO, W.; DOUNGCHAWEE, G.; et al. Leptospirosis research: Fast, easy and reliable enumeration of mobile leptospire. **Biological Research**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 5–12, 2009.

SONDERGAARD, M. M.; et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome with lower back pain as an initial symptom. **American Journal of Case Reports**, v. 17, p. 883–886, 2016.

THIBEAUX, R., et al. Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. **Microbial Genomics**, Londres, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2018.

TWIGG, R. S. Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin. **Nature**, v. 155, n. 3935, p. 401–402, 1945.

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**, [s. l.], v. 13, n. 5, 2019.

VOYTIK-HARBIN, S. L.; et al. Application and evaluation of the alamarblue assay for cell growth and survival of fibroblasts. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 34, n. 3, p. 239–246, 1998.

WESELSKY, P. Neue Derivate des Resorcins. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 4, n. 1, p. 32–33, 1871.

WHITE, M. J.; DICAPRIO, M.J.; GREENBERG, D. A. Assessment of neuronal viability with Alamar blue in cortical and granule cell cultures. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 70, n. 2, p. 195–200, 1996.

YAJKO, D. M.; et al. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2324–2327, 1995.

YANG, S. Y.; et al. Inducing apoptosis of human colon cancer cells by an IGF-I D domain analogue peptide. **Molecular Cancer**, v. 7, n. 1, p. 17, 2008.

YAO, K.; et al. Casein kinase 2 inhibition attenuates androgen receptor function and cell proliferation in prostate cancer cells. **Prostate**, v. 72, n. 13, p. 1423–1430, 2012.

YU, S. Y.; et al. Inducing apoptosis of human colon cancer cells by an IGF-I D domain analogue peptide. **Molecular Cancer**, v. 7, 2008.

ZALATA; L.; et al. The correlates and alleged biochemical background of the resazurin reduction test in semen. **International Journal of Andrology**, v. 21, n. 5, p. 289–294, 2002.



ZHI-JUN, Y; et al. A dye-based lymphocyte proliferation assay that permits multiple immunological analyses: mRNA, cytogenetic, apoptosis, and immunophenotyping studies. **Journal of Immunological Methods**, v. 210, n. 1, p. 25–39, 1997.