



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**BIOFILME DE CEPAS AUTÓCTONES DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS*:  
INVESTIGAÇÃO NA INFECÇÃO CANINA AGUDA E EFEITO DISRUPTIVO  
*IN VITRO* POR ANTIBIÓTICOS E ÁCIDO p-CUMÁRICO**

**CARLA SILVA DIAS**

Médica Veterinária

**Salvador - BA**

**2025**

**CARLA SILVA DIAS**

**BIOFILME DE CEPAS AUTÓCTONES DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS*:  
INVESTIGAÇÃO NA INFECÇÃO CANINA AGUDA E EFEITO DISRUPTIVO  
*IN VITRO* POR ANTIBIÓTICOS E ÁCIDO p-CUMÁRICO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da Bahia, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Profa. Dra. Melissa Hanzen Pinna Valentim

**Salvador - BA**

**2025**

Dados internacionais de catalogação-na-publicação  
(SIBI/UFBA/Biblioteca Universitária Reitor Macedo Costa)

Dias, Carla Silva.

Biofilme de cepas autóctones de *Leptospira interrogans*: investigação na infecção canina aguda e efeito destrutivo in vitro por antibióticos e ácido p-cumarico / Carla Silva Dias. - 2025.  
91 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Melissa Hanzen Pinna Valentim.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2025.

1. Medicina veterinária. 2. Microbiologia veterinária. 3. Doenças transmissíveis em animais. 4. Leptospirose em animais. 5. *Leptospira*. I. Valentim, Melissa Hanzen Pinna. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

CDD - 636.0896  
CDU - 636.09

**Biofilme de cepas autóctones de *Leptospira interrogans*: investigação na infecção canina aguda e efeito disruptivo *in vitro* por antibióticos e ácido p-cumárico**

**CARLA SILVA DIAS**


**Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos**

Salvador, 07 de fevereiro de 2025


Comissão examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 **MELISSA HANZEN PINNA VALENTIM**  
Data: 11/02/2025 15:06:40-0300  
verifique em <https://validar.itl.gov.br>


**Dra. Melissa Hanzen Pinna Valentim**  
**Presidente**  
**UFBA**

Documento assinado digitalmente  
 **WALTER LILENBAUM**  
Data: 14/02/2025 13:32:03-0300  
verifique em <https://validar.itl.gov.br>


**Dr. Walter Lilenbaum**  
**UFF**

Documento assinado digitalmente  
 **FELIPE FORNAZARI**  
Data: 13/02/2025 14:48:53-0300  
verifique em <https://validar.itl.gov.br>

**Dr. Felipe Fornazari**  
**UNESP**

Documento assinado digitalmente  
 **ALESSANDRA ESTRELA DA SILVA LIMA**  
Data: 14/02/2025 14:52:21-0300  
verifique em <https://validar.itl.gov.br>

**Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima**  
**UFBA**

Documento assinado digitalmente  
 **ANA LUCIA TABEL OLLER DO NASCIMENTO**  
Data: 11/02/2025 15:27:49-0300  
verifique em <https://validar.itl.gov.br>

**Dra. Ana Lúcia Tabet Oller Nascimento**  
**Instituto Butantan**

“Toda a sabedoria humana está contida nas seguintes palavras: esperar e ter esperança.”

O Conde de Monte Cristo – Alexandre Dumas

Dedico este trabalho à minha família, que acolheu mais uma de minhas jornadas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Professora Melissa Hanzen Pinna Valentim, por mais uma etapa de parceria, onde segurou minha mão e mostrou os caminhos da ciência em prol da evolução da saúde. Por ter visto potencial em mim quando eu mesma não fui capaz. Obrigada por todo o incentivo, a ajuda e o acolhimento profissional e pessoal.

À Dra. Karine Damasceno (LAPEX - Fiocruz/BA), por tornar possível a realização das histotécnicas, por ceder pacientemente seu tempo e expertise. Sendo sempre uma experiência enriquecedora nossas reuniões e o contato com a sua equipe, em especial Júlia e Eduarda.

Ao Dr. Cláudio Figueira (SME - Fiocruz/BA), pela inestimável expertise no processamento e obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura, indispensáveis para a qualidade das análises de disrupção deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde (ICS - UFBA), em especial aos Professores Bruno Guimarães da Fonseca dos Santos e Ricardo Portela, por viabilizarem as análises de susceptibilidade antimicrobiana, assim como, por cederem gentilmente o agente natural avaliado.

À equipe do Laboratório de Bacterioses (LABAC) da UFBA, incluindo estagiários, monitores e ICs, agradeço pelo convívio leve, pela troca diária de ideias, incentivo, carinho e muitos risos. Em especial à Marta Vasconcelos Bittencourt e Marinalva Gonsaga, por serem uma família fora de casa e pelo eterno estoque de café.

Agradeço ao Dr. Lucas Nogueira Paz, a quem recorro com minhas dúvidas e ideias. Obrigada pela parceria em artigos científicos, condução de experimentos e amizade. Que nossas colaborações sejam ainda mais extensas e produtivas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da Bahia, agradeço à oportunidade e o enriquecimento profissional e científico.

À fonte de fomento, FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pela concessão de bolsa de doutorado.

À minha família, sempre paciente quando priorizo os estudos. Sempre com vocês e por vocês.

## RESUMO

DIAS, C. S. **Biofilme de cepas autóctones de *Leptospira interrogans*: investigação na infecção canina aguda e efeito disruptivo *in vitro* por antibióticos e ácido p-cumárico.** Salvador, 2025. 91 pg. Tese (Doutor(a) em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia.

Leptospirose é uma doença infecciosa de caráter zoonótico, causada por bactérias do gênero *Leptospira*. Os cães são altamente susceptíveis, com comprometimento renal relevante para a clínica e a epidemiologia. *Leptospira* é capaz de formar biofilmes no ambiente, em hospedeiros crônicos e *in vitro*, mas essa característica não foi investigada em infecções agudas. A formação de biofilmes representa uma ameaça à Saúde Única, pois está associada a falhas terapêuticas e à manutenção da circulação de bactérias patogênicas entre humano-animal-ambiente. Este estudo objetivou investigar biofilmes no parênquima renal de cães naturalmente infectados com leptospirose aguda. Empregou-se imunohistoquímica anti-LipL32 e colorações de Alcian Blue e ácido periódico de Schiff, para identificação de leptospirosas e marcação de substâncias da matriz exopolimérica. Adicionalmente, quatro cepas (C20, C29, C51 e C82), isoladas desses cães, foram submetidas a ensaios de susceptibilidade antimicrobiana nas formas planctônica e de biofilme (7 e 21 dias), utilizando doxiciclina, ciprofloxacina e ácido p-cumárico (p-CA), em concentrações entre 0,02µg/mL a 1,600µg/mL. Após a exposição aos antimicrobianos, a disrupção das arquiteturas dos biofilmes foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Não foi detectada marcação histológica de matriz extracelular, entretanto, foram observados biofilmes incipientes, na forma de agregados de *L. interrogans*. A maturidade dos biofilmes influenciou negativamente a eficácia dos antimicrobianos testados. Em comparação à forma planctônica, foi observada menor susceptibilidade antimicrobiana em biofilmes com apenas 7 dias. Em ambas as formas de crescimento o p-CA apresentou CIMs mais baixas em relação aos antibióticos. Apesar da heterogeneidade nas arquiteturas após disrupção, células bacterianas íntegras foram observadas em todos os tratamentos. Estes achados destacam a necessidade de investigar o papel de agregados bacterianos e a progressão de biofilmes *in vivo*, os mecanismos específicos de ação do p-CA em biofilmes de *L. interrogans* e combinações terapêuticas mais eficazes que as convencionais.

**Palavras-chave:** Leptospirose, biofilme, infecção aguda, colonização renal, resistência antimicrobiana, ácido p-cumárico

## ABSTRACT

DIAS, C. S. **Biofilm of autochthonous strains of *Leptospira interrogans*: investigation in acute canine infection and *in vitro* disruptive effect of antibiotics and p-coumaric acid.** Salvador, 2025. 91 pg. Tese (Doutora em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia.

Leptospirosis is a zoonotic infectious disease caused by bacteria of the genus *Leptospira*. Dogs are highly susceptible, often presenting renal impairment with clinical and epidemiological significance. *Leptospira* can form biofilms in the environment, in chronic hosts and *in vitro*, however, this feature has not been investigated in acute infections. Biofilm formation represents a One Health threat, as it is associated with therapeutic failures and the persistence of pathogenic bacteria in the human-animal-environment interface. This study aimed to investigate biofilms in the renal parenchyma of dogs naturally infected with acute leptospirosis. Anti-lipL32 immunohistochemistry and Alcian Bleu and periodic acid-Schiff staining were applied to identify *Leptospira* and detect components of the exopolysaccharide matrix. Additionally, four strains (C20, C29, C51 and C82), isolated from these dogs, were subjected to antimicrobial susceptibility assays in both planktonic and biofilm (7 and 21 days) forms, using doxycycline, ciprofloxacin and p-coumaric acid (p-CA) at concentrations ranging from 0,02µg/mL to 1,600µg/mL. After antimicrobial exposure, the disruption of biofilm architecture was evaluated by scanning electron microscopy. No histological staining of the extracellular matrix was detected; however, incipient biofilms, in the form of *L. interrogans* aggregates, were observed. Biofilm maturity negatively affected antimicrobial efficacy, with lower susceptibility observed in biofilms as early as 7 days compared to planktonic forms. In both growth conditions, p-CA exhibited lower MICs than the tested antibiotics. Despite variations in biofilm architecture after disruption, intact bacterial cells were present in all treatments. These findings highlight the need to investigate the role of bacterial aggregates in *in vivo* biofilm progression, the specific mechanisms of p-CA action in *L. interrogans* biofilms, and more effective therapeutic combinations than conventional treatments.

**Keywords:** Leptospirosis, biofilm, acute infection, renal colonization, antimicrobial resistance, p-coumaric acid

## LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Representação esquemática do desenho de estudo sobre formação de biofilme em parênquima renal de cães naturalmente infectados por <i>L. interrogans</i> e análise <i>in vitro</i> de disrupção de biofilmes por antimicrobianos e ácido p-cumárico.....	34
Figura 2	Investigação de leptospiras (lipL32) em diferentes estruturas renais de cães (C20, C29, C51 e C82) com quadro agudo de leptospirose.....	42
Figura 3	Comparação de imunomarcção de lipL32 em parênquima renal de cão (C20) e hamsters infectados com <i>L. interrogans</i> , com tempo de evolução clínica de 5 dias.....	42
Figura 4	Alterações histopatológicas de parênquima renal de cães (C20, C29, C51 e C82) com infecção aguda por <i>L. interrogans</i> .....	43
Figura 5	Imunomarcção para lipL32 e formação de biofilme em parênquima renal de cão (C29) com quadro agudo de leptospirose.....	44
Figura 6	Imunomarcção para lipL32 e formação renal de biofilme em parênquima renal de cão (C82) com quadro agudo de leptospirose.....	44
Figura 7	Investigação de formação de biofilme por agregado bacteriano e imunomarcção por lipL32 em parênquima renal de cão C20 com infecção aguda por <i>L. interrogans</i> , sg <i>Icterohaemorrhagiae</i> .....	45
Figura 8	Fotomicrografias representativas de Microscopia Eletrônica de Varredura demonstrando biofilmes não tratados de <i>L. interrogans</i> (C20, C29, C51 e C82) em diferentes tempos de incubação.....	48
Figura 9	Efeitos da doxiciclina em biofilme (cepa C20) de <i>L. interrogans</i> : observações estruturais.....	49
Figura 10	Efeitos da doxiciclina em biofilme (cepa C29) de <i>L. interrogans</i> : observações estruturais.....	50
Figura 11	Efeitos da doxiciclina em biofilme (cepa C51) de <i>L. interrogans</i> : observações estruturais.....	51
Figura 12	Efeitos da doxiciclina em biofilme (cepa C82) de <i>L. interrogans</i> : observações estruturais.....	52
Figura 13	Efeitos da ciprofloxacina em biofilme (cepa C20) de <i>L. interrogans</i> : observações estruturais.....	53

Figura 14	Efeitos da ciprofloxacina em biofilme (cepa C29) de <i>L. interrogans</i> : observações estruturais.....	54
Figura 15	Efeitos da ciprofloxacina em biofilme (cepa C51) de <i>L. interrogans</i> : observações estruturais.....	55
Figura 16	Efeitos da ciprofloxacina em biofilme (cepa C82) de <i>L. interrogans</i> : observações estruturais.....	56
Figura 17	Efeitos do ácido p-cumárico em biofilme (cepa C20) de <i>L. interrogans</i> : observações estruturais.....	57
Figura 18	Efeitos do ácido p-cumárico em biofilme (cepa C29) de <i>L. interrogans</i> : observações estruturais.....	58
Figura 19	Efeitos do ácido p-cumárico em biofilme (cepa C51) de <i>L. interrogans</i> : observações estruturais.....	59
Figura 20	Efeitos do ácido p-cumárico em biofilme (cepa C82) de <i>L. interrogans</i> : observações estruturais.....	60
Figura 21	Efeitos do ácido p-cumárico em biofilme (cepa C20) de <i>L. interrogans</i> : observações estruturais.....	61
Figura 22	Efeitos do ácido p-cumárico em biofilme (cepa C82) de <i>L. interrogans</i> : observações estruturais.....	62

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 1 Clínica, patologia e tratamento de cães com leptospirose aguda e características dos isolados (C20, C29, C51 e C82) de <i>Leptospira interrogans</i> , sorogrupo Icterohaemorrhagiae.....	41
Tabela 2 Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) para doxiciclina, ciprofloxacina e ácido p-cumárico frente a biofilmes de <i>L. interrogans</i> com diferentes tempos de crescimento e células planctônicas.....	46
Tabela 3 Principais achados na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de biofilmes de <i>L. interrogans</i> (7 e 21 dias) após exposição à agentes antimicrobianos (doxiciclina, ciprofloxacina e p-CA) .....	63

## LISTA DE SIGLAS

AA	Azul de Alcian
AB	Alamar Blue
ANI	Análise da identidade média de nucleotídeos ( <i>Average Nucleotide Identity</i> )
c-di-GMP	Guanosina monofosfato (3'-5')-cíclica dimérica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DAB	3,3' – diaminobenzidina
DMSO	dimetilsulfóxido
eDNA	DNA extracelular
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substance</i>
IHQ	Imunohistoquímica
HAN	Hornsby-Alt-Nally
HE	Hematoxilina-eosina
IP	Intraperitoneal
LABAC	Laboratório de Bacterioses
LigB	<i>Leptospiral Immunoglobulin-like B</i>
LipL	Lipoproteína de membrana de <i>Leptospira</i>
Loa	<i>Leptospiral outer-membrane adhesin</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAT	<i>Microscopic Agglutination Test</i>
OIE	<i>World Organization for Animal Health</i>
PAS	Ácido periódico-Schiff
p-CA	Ácido p-cumárico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
QS	Quorum Sensing
TSA	Tese de Susceptibilidade Antimicrobiana

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	17
2.1 LEPTOSPIROSE.....	17
2.1.1 Agente etiológico e Classificação.....	17
2.1.2 Epidemiologia.....	18
2.1.3 Patogenia e Clínica.....	20
2.1.4 Diagnóstico.....	22
2.1.5 Tratamento.....	23
2.2 BIOFILMES.....	24
2.2.1 Biofilmes e Saúde Única.....	25
2.2.2 Biofilmes e Resistência Antimicrobiana.....	29
2.2.3 Biofilme por <i>Leptospira</i> spp.....	30
2.3 ÁCIDO p-CUMÁRICO.....	32
<b>3 HIPÓTESE.....</b>	33
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	33
4.1 OBJETIVO GERAL.....	33
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	34
5.1 DESENHO DO ESTUDO.....	34
5.2 CEPAS AUTÓCTONES.....	35
5.3 INVESTIGAÇÃO DE BIOFILME RENAL <i>in vivo</i> .....	35
5.4 AVALIAÇÃO DA DISRUPÇÃO DE BIOFILME DE <i>L. INTERROGANS</i> .....	36
5.4.1 Formação de biofilme <i>in vitro</i> .....	36
5.4.2 Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (TSA) da forma planctônica ao ácido o-cumárico.....	37
5.4.3 Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (TSA) de biofilmes de <i>L. interrogans</i> .....	38
5.4.4 Observação microscópica de disrupção de biofilmes por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	39

<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
6.1 INVESTIGAÇÃO DE BIOFILME EM PATÊNQUIMA RENAL DE CÃES COM INFECÇÃO AGUDA.....	40
6.2 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>L. INTERROGANS</i> NAS FORMAS PLANCTÔNICA E BIOFILME.....	45
6.3 DISRUPÇÃO DE BIOFILMES DE <i>L. INTERROGANS</i> POR DOXICICLINA, CIPROFLOXACINA E p-CA.....	46
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
7.1 INVESTIGAÇÃO DE BIOFILME RENAL <i>in vivo</i> .....	64
7.2 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>L. INTERROGANS</i> NAS FORMAS PLANCTÔNICA E BIOFILME FRENTE A DIFERENTES AGENTES.....	67
7.3 DISRUPÇÃO DE BIOFILMES DE <i>L. INTERROGANS</i> .....	68
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>9 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose altamente transmissível com ampla distribuição mundial e incidência em diversos cenários epidemiológicos (rural, urbano, silvestre) (COSTA et al., 2015). Causada por bactérias do gênero *Leptospira*, ubíquas no ambiente, acomete humanos e diversas espécies animais. Estes podem atuar como hospedeiros incidentais e/ou carreadores crônicos do microrganismo, integrando a interface de transmissão homem-animal-ambiente com significativas implicações para a Saúde Única (ELLIS, 2015. PICARDEAU, 2020). Globalmente, estima-se que ocorram mais de 1,03 milhão de casos humanos anualmente, com uma tendência crescente em áreas tropicais e subtropicais devido a fatores climáticos e socioeconômicos (COSTA et al., 2015). No Brasil, entre 2007 e 2023, foram confirmados, em média, 3400 casos, com uma taxa de letalidade de 9% (BRASIL, 2024).

A doença clínica em cães demonstra a patogenia multissistêmica da infecção, que se reflete em disfunções em vários sistemas do corpo (MAGNIN et al., 2020). Os sinais clínicos variam de sintomas leves a complicações graves, como síndrome hepatorenal, uveíte, hemorragias, intussuscepção, cardiopatias, poliartrite, abortamento, síndrome pulmonar (SCHULLER et al., 2015; PAZ et al., 2021a). A doença aguda grave necessita de abordagens terapêuticas com elevados custos para os responsáveis, os quais, por vezes, estão associados a condições de baixa renda em áreas urbanas (ESTEVES et al., 2023). Em cães, estima-se elevada prevalência de sintomáticos e assintomáticos, de modo que o papel desta espécie como fonte de infecção tem sido progressivamente investigado (RICARDO et al., 2024; DI AZEVEDO et al., 2023).

Em cães e humanos, a infecção ocorre através da exposição às cepas patogênicas, por contato direto ou indireto, liberadas por hospedeiros infectados (SYKES et al., 2023). Apesar das variações geográficas entre hospedeiros de manutenção e sorogrupos associados, no ambiente urbano, ratos sinantrópicos ainda são considerados o principal hospedeiro reservatório para leptospirosas, associados principalmente à transmissão do sorogrupo (sg) *Icterohaemorrhagiae* para humanos e cães (MARTINS; LILENBAUM, 2013). Entretanto, o isolamento de *Leptospira* sp. a partir de amostras de urina de cães sugere a capacidade de liberação ativa de espécies patogênicas no ambiente (GOH et al., 2021). Desse modo, o estudo dos diversos aspectos da patogênese que possam estar associados à contaminação do ambiente a partir de cães representa relevante investigação do real papel desta espécie na transmissão com risco zoonótico (RICARDO et al., 2024).

Apesar de existirem avanços sobre a interação *Leptospira*-hospedeiro, os diversos mecanismos de infectividade e patogênese ainda não são totalmente compreendidos (TAKAHASHI; TEIXEIRA; NASCIMENTO, 2022). Um desses mecanismos implicados na colonização renal é a formação de biofilme bacteriano, que em espécies carreadoras pode favorecer a evasão do sistema imune e a colonização renal crônica (SANTOS et al., 2021). Os biofilmes são matrizes de substâncias exopoliméricas constituídas por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, que promovem adesão às superfícies e a outras células (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Infecções bacterianas crônicas associadas a biofilmes apresentam maiores riscos à saúde devido à resistência às defesas do hospedeiro e à terapia antimicrobiana (OLSEN, 2015). Há uma crescente busca por evidências de biofilmes em infecções clínicas agudas causadas por outras espécies bacterianas (KOLPEN et al., 2022). Na leptospirose, as pesquisas no ambiente e ensaios *in vitro* apresentaram dados relevantes, porém ainda pela perspectiva de hospedeiros crônicos (SANTOS et al., 2021; THIBEAUX et al., 2020; VINOD KUMAR et al., 2016a).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo multidisciplinar de *Leptospira* em diversas espécies animais, incluindo cães (DE CARVALHO et al., 2023; DIAS et al., 2021; PAZ et al., 2021b; PAZ et al., 2025). Este tipo de abordagem culminou, até o momento, na obtenção de 17 isolados autóctones de *Leptospira* sp., a partir de cães com doença aguda e diferentes desfechos clínicos; dos quais descrevemos análises epidemiológicas, clínicas e patológicas. Através do sequenciamento, por análises filogenéticas e de similaridade genômica, quatro isolados (C20, C29, C51 e C82) foram identificados como cepas de *Leptospira interrogans*. Adicionalmente, análise genômica comparativa evidenciou a circulação de cepas altamente relacionadas em cães, roedores e humanos, no mesmo cenário epidemiológico, ressaltando o relevante papel que os cães desempenham na saúde pública (PAZ et al., 2025).

Ao estudar estas cepas, De Carvalho e colaboradores (2023) observaram a formação de biofilme maduro, *in vitro*, em apenas sete dias de incubação e um reduzido perfil de susceptibilidade a agentes antimicrobianos comumente utilizados para o tratamento da leptospirose em cães. Já PAZ e colaboradores (2025) detectaram a presença de 23 genes potencialmente associados à formação de biofilme. A identificação de biofilmes nos rins de animais colonizados por *Leptospira* em infecção aguda auxiliará na compreensão dos mecanismos de infecção do patógeno. A investigação de novas estratégias de interrupção de biofilmes tende a criar abordagens a problemática da resistência antimicrobiana. Ademais, a

compreensão destes mecanismos somados ao prévio isolamento de cepas locais permitirá o desenvolvimento de estratégias de controle da leptospirose voltadas para a realidade brasileira.

Considerando a forte associação entre resistência antimicrobiana e infecções por biofilmes, há uma crescente busca pela caracterização de atividades inibitórias e/ou disruptivas de agentes antimicrobianos naturais sobre biofilmes bacterianos. Compostos naturais possuem vantagens como maior biodisponibilidade, menor toxicidade, potenciais efeitos sinérgicos e reduzidas concentrações inibitórias mínimas (CIMS) (JANTORN et al., 2023). O ácido p-cumárico, um polifenol derivado do metabolismo de plantas (FERREIRA et al., 2019), demonstra potencial como candidato promissor para ruptura de biofilmes bacterianos, com eficácia comprovada em diversos patógenos e em diferentes contextos (AHMAD et al., 2024; DU et al., 2023).

Dado a complexidade da leptospirose e seu impacto significativo na saúde pública e animal, é essencial aprofundar o entendimento sobre os mecanismos de infecção e resistência. Este estudo visa explorar a formação de biofilmes por *Leptospira interrogans* em infecções agudas, uma área ainda pouco investigada, mas de extrema importância devido à sua associação com falhas terapêuticas. Adicionalmente, as técnicas empregadas na identificação de biofilmes focam em estágios mais maduros dessas estruturas, sendo frequentemente relacionadas a infecções crônicas. Ao investigar as interações entre o patógeno e o hospedeiro, bem como a eficácia de diferentes abordagens terapêuticas, esperamos contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle e tratamento da leptospirose. Assim, este estudo não apenas amplia o conhecimento científico sobre a patogênese da leptospirose, mas também visa fornecer subsídios para políticas de saúde pública que possam mitigar o impacto desta doença em populações vulneráveis.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 LEPTOSPIROSE**

#### **2.1.1 Agente etiológico e Classificação**

Leptospiras são bactérias aeróbias, pertencentes à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira*. Consideradas Gram-negativas, possuem lipopolissacarídeos na superfície de sua membrana externa e apresentam-se como bactérias espiraladas, compostas por dois flagelos periplasmáticos (responsáveis pela motilidade),

extremidades em forma de gancho, delgadas (0,1 µm de diâmetro) e comprimento entre 6 e 20 µm (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Como bactérias fastidiosas, *Leptospira* necessita de condições especiais para crescimento *in vitro*, incluindo temperatura entre 28 e 30 °C e pH entre 6,8 e 7,4 (BHARTI et al., 2003). Entretanto, Hornsby e colaboradores (2020) obtiveram crescimento a 37 °C utilizando o meio de cultura diferencial Hornsby-Alt-Nally (HAN). No ambiente, *Leptospira* pode sobreviver e manter a virulência por 40 dias; em água doce, no entanto, pode persistir por até 20 meses, a depender da cepa (BIERQUE et al., 2020). Dentre seus principais requisitos nutricionais estão fontes de carbono, nitrogênio, vitaminas e suplementos que podem incluir o cálcio, magnésio, ferro, cobre, manganês, glicerol, tiamina, biotina, fosfato e sulfato (FAINE et al., 1999). Em espécies patogênicas, o tempo de geração é de seis a oito horas, com produção de 6 a 8 x 10<sup>9</sup> leptospiras por mL (CAMERON, 2015).

A classificação das leptospiras pode ser realizada com base em suas características sorológicas ou moleculares. A sorológica, de acordo com seus determinantes antigênicos, é baseada no polimorfismo dos carboidratos que compõem os lipopolissacarídeos de sua membrana externa, sendo reconhecidos mais de 300 sorovares distintos (PICARDEAU, 2020). Apesar de contribuir para o estudo da epidemiologia e seu uso ser mais viável quando do diagnóstico na rotina clínica, o desenvolvimento de técnicas moleculares impulsionou a sua substituição pela classificação genotípica, onde as leptospiras são agrupadas em diferentes espécies genômicas com DNA relacionado (SCHULER et al., 2015). Atualmente, 69 espécies foram descritas geneticamente, divididas em patogênicas (subclado P1), intermediárias (subclado P2) e saprofíticas (subclados S1 e S2) (CASANOVAS-MASSANA et al., 2020; FERNANDES et al., 2022; KORBA et al., 2021; VINCENT et al., 2019).

### 2.1.2 Epidemiologia

A leptospirose é amplamente reconhecida como uma doença infecciosa negligenciada, cuja transmissão requer a continuada circulação enzoótica do organismo entre hospedeiros reservatórios (KO; GOARANT; PICARDEA, 2009). Cães e diversas outras espécies animais (domésticas e selvagens), assim como os humanos, podem ser infectados (COSTA et al., 2015). Em cães, a transmissão ocorre mais comumente através do contato direto com animais infectados e sua urina, ou indiretamente pelo contato com solo ou água contaminados com leptospiras (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Na população canina do Brasil algumas características foram consideradas relevantes e associadas a maiores índices de

infecção, como comportamento errante, responsáveis com baixas condições socioeconômicas e áreas urbanas de inundação (SOHN-HAUSNER et al., 2023).

A natureza subclínica e muitas vezes branda da infecção em cães, os sinais inespecíficos da doença, a baixa notificação por parte de médicos veterinários e as dificuldades inerentes às técnicas diagnósticas parecem contribuir para a subestimação da real incidência (GRAYZEL et al., 2016). Em humanos, mais de 1 milhão de pessoas foram infectados, com cerca de 60 mil mortes por ano no mundo todo; o Brasil foi responsável por quase metade dos casos de leptospirose da América Latina (COSTA et al., 2015), demonstrando a relevância para a saúde pública.

Na epidemiologia da leptospirose, diferentes sorogrupos demonstram adaptabilidade a hospedeiros específicos, conhecidos como hospedeiros de manutenção (SCHULLER et al., 2015). A exemplo, os roedores (gênero *Rattus*) que atuam como reservatórios para o sg *Icterohaemorrhagiae*, cães para o sorovar (sv) *Canicola*, bovinos para o sv *Hardjo* e equinos para Bratislava. Entretanto, estudos demonstram uma maior complexidade na interação sorovares e hospedeiros, incluindo para os cães, infecções subclínicas e crônicas por outros sorovares, detecção do sorovar *Canicola* em cães com doença aguda e o envolvimento de outras espécies animais (roedores, equinos e suínos) como carreadores do sv *Canicola* (BOEY; SHIOKAWA; RAJEEV, 2019; GRILLOVA et al., 2023; MENY et al., 2022).

Diferentes regiões possuem variáveis dinâmicas no ciclo de transmissão - hospedeiros reservatórios, clima, fatores socioeconômicos e condições ambientais (GRIEBSCH et al., 2022) - que devem ser consideradas. Mesmo que em áreas urbanas os roedores, em particular o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*), sejam considerados a principal fonte de infecção direta ou indireta para humanos e caninos (MARTINS; LILENBAUM, 2013), a dinâmica interação entre diferentes hospedeiros e cepas infectantes mostra a importância da identificação e do estudo de cepas autóctones. No Brasil, cães e humanos são altamente expostos ao sg *Icterohaemorrhagiae* (sv *Icterohaemorrhagiae* e sv *Copenhageni*) do qual os roedores urbanos são os principais reservatórios (DI AZEVEDO et al., 2023).

A ampla circulação de cães entre diferentes ambientes os torna mais susceptíveis à diversas fontes ambientais de contaminação, podendo indicar seu papel como conectores entre fontes de infecção e humanos (SANT'ANNA et al., 2017). Embora a transmissão direta de leptospirose de cães para humanos ainda seja um tema debatido, a documentação de superimposição entre casos caninos e humanos no Brasil (BENITEZ et al., 2021) sugere que os cães podem desempenhar um papel relevante na contaminação de ambientes habitados por humanos (SOHN-HAUSNER et al., 2023). Além disso, cães podem atuar como hospedeiros

reservatórios, excretando leptospiros viáveis pela urina por longos períodos e contribuindo para a epidemiologia e disseminação da doença (GOH et al., 2021).

Ainda que cães e humanos frequentemente coabitem os mesmos cenários epidemiológicos, interpretá-los exclusivamente como vítimas de uma mesma fonte de infecção e sentinelas para a leptospirose humana pode negligenciar seu possível papel como transmissores de *Leptospira* para humanos e outros animais (DI AZEVEDO et al., 2023). Embora a transmissão direta entre cães e humanos seja considerada incomum, uma meta-análise recente (DI AZEVEDO et al., 2023) indicou a circulação de um grupo geneticamente homogêneo de leptospiros, incluindo sequências idênticas à *L. interrogans* Fiocruz L1-130, reforçando a necessidade de mais estudos para compreender o risco zoonótico associado à interação entre cães e humanos.

Similarmente, o estudo do genoma de cepas do sg *Icterohaemorrhagiae* isoladas a partir de cães e seres humanos, todas provenientes do mesmo cenário epidemiológico, revelou elevada similaridade no conteúdo genômico, sugerindo a relevância de cepas autóctones de animais para a saúde pública (PAZ et al., 2025). No Brasil, o estado da Bahia possui elevadas taxas de positividade (ESTEVES et al., 2023), sendo fonte dos isolados caninos utilizados no presente estudo. Todos estes fatores reforçam a necessidade de mais estudos buscando entender as dinâmicas da transmissão da leptospirose em diferentes cenários epidemiológicos.

A aplicação de técnicas moleculares para o estudo de *Leptospira* auxilia o entendimento da interação bactéria-bactéria, bactéria-ambiente e bactéria-hospedeiro (MURRAY, 2015). Particularmente, a análise genômica permite a identificação precisa das espécies circulantes com implicações clínicas, de saúde pública, epidemiológica, assim como na prevenção e no controle. A obtenção de isolados autóctones e o sequenciamento completo de seus genomas favorecem a identificação mais robusta das espécies circulantes, fornecendo também informações relacionada à evolução, genes de virulência e de resistência a antimicrobianos, genômica comparativa e regiões gênicas regulatórias (PAZ et al., 2025).

### **2.1.3 Patogenia e Clínica**

A infecção canina por leptospiros patogênicos manifesta-se como uma doença multissistêmica, caracterizada por elevados graus de lesão tecidual em múltiplos órgãos de hospedeiros suscetíveis após a exposição ao agente infeccioso. Em hospedeiros reservatórios, a infecção pode resultar em colonização renal persistente com liberação intermitente de leptospiros pela urina (DE OLIVEIRA et al., 2022). Por seu caráter multissistêmico, com uma

ampla gama de apresentações clínicas, a dicotomia da infecção tende a posicionar em polos opostos a doença aguda e a crônica (SYKES et al., 2023).

Após a exposição, leptospiras entram no organismo do hospedeiro através de injúrias na pele e de membranas mucosas, iniciando a leptospiremia com disseminação via hematogena (SURDEL et al., 2022). A disseminação pelo hospedeiro é atribuída à capacidade de rápida translocação por junções intercelulares (TOKUMON et al., 2023) que, junto à mecanismos de evasão do sistema imune, estabelecem infecção em diversos órgãos, onde continuam a se replicar e causam lesão tecidual (SIQUEIRA et al., 2017). Com o estabelecimento da colonização renal, as espiroquetas são eliminadas através da urina, contaminando o ambiente e constituindo fonte de infecção (GOH et al., 2021).

Clinicamente, a leptospirose canina é reportada como doença que varia de hiperaguda a crônica (SYKES et al., 2023). As manifestações clínicas mais comumente reconhecidas da leptospirose em cães relacionam-se à patogénia renal e hepática, com nefrite tubulointersticial e disfunção hepática. Tratando-se de doença multissistêmica, outras manifestações devem ser reconhecidas, incluindo a síndrome hemorrágica pulmonar, coagulopatias, vasculite, edema periférico, ascite, pancreatite, envolvimento ocular (uveíte, conjuntivite), miosite enterite, miocardite e até mesmo disfunções reprodutivas (PAZ et al., 2021; SYKES et al., 2023).

O desenvolvimento e a progressão da doença estão relacionados à virulência da cepa, susceptibilidade do hospedeiro e carga de inóculo infectante (ELLIS, 2015). Os variados graus de lesão tecidual nos hospedeiros são determinados por fatores específicos do patógeno (fatores de virulência), assim como pela interação patógeno-hospedeiro e consequente resposta à infecção. Fatores expressos por leptospiras são complexos, envolvendo processos como adesão, invasão, secreção e virulência (KAVELA et al., 2023). Interações patógeno-hospedeiro são, em geral, mediadas por proteínas expressas na membrana externa da bactéria (WUNDER et al., 2016b).

A adesão à componentes celulares dos hospedeiros se constitui importante etapa na patogênese, garantindo o ancoramento bacteriano, a invasão celular e a colonização tecidual (TAKAHASHI; TEIXEIRA; NASCIMENTO, 2022). Leptospiras expressam proteínas adesinas hábeis na ligação a diversos componentes como fibronectina, fibrinogênio, colágeno, laminina, plasminogênio e elastina (SAMROT et al., 2021). Endoflagelo e lipopolissacarídeo (LPS) de *Leptospira*, componentes da parede celular, caracterizam-se como relevantes fatores de virulência, pois, mutações em genes envolvidos na motilidade e na síntese do LPS resultaram em perda de virulência (LIAO et al., 2009; WUNDER et al., 2016b).

Na leptospirose, a variabilidade de manifestações da doença, de acordo com o sorovar infectante e a espécie do hospedeiro, constitui principal fator da heterogeneidade da patogenia (PUTZ; NALLY, 2020). A imunopatogênese, em especial a resposta inflamatória frente infecção por *Leptospira*, influencia o desfecho clínico da infecção (MARUOKA et al., 2021). O perfil de expressão de citocinas diverge entre a doença aguda e a crônica em diferentes modelos de infecção, tendo sido observada maior produção de citocinas anti-inflamatórias em infecções crônicas (MAISSEN-VILLIGER et al., 2016; MATSUI et al., 2016; MATSUI et al., 2017).

#### **2.1.4 Diagnóstico**

Devido a variabilidade dos sinais clínicos da leptospirose canina e das limitações dos testes disponíveis, o diagnóstico deve abranger, preferencialmente, a combinação de um ensaio sorológico e um teste de detecção do organismo (SYKES et al., 2023). O teste de soroaglutinação microscópica (MAT) é amplamente empregado para diagnóstico clínico, entretanto, dentre suas limitações destaca-se a necessidade de amostras das fases aguda e convalescente, pois a soroconversão com produção de anticorpos tende a ocorrer de 7 a 14 dias após a infecção (OIE, 2021). Adicionalmente, os títulos no MAT são indicativos de exposição prévia, muitas vezes não podendo ser diferenciados de títulos vacinais em cães (SYKES et al., 2023). Por se tratar de uma técnica sorogrupo-específica, recomenda-se a inclusão de cepas relevantes para a região estudada no painel de antígenos empregados no MAT, a fim de aumentar a sensibilidade e reduzir possíveis resultados falso-negativos (SYKES et al., 2023).

A detecção direta através de cultivo e isolamento possui a vantagem da posterior identificação de espécie e sorovar infectantes, provendo informações relevantes para a epidemiologia que podem ser utilizadas para elaboração de vacinas (CAMERON, 2015). Entretanto, leptospirosas possuem crescimento fastidioso e requerem meios especiais para crescimento com incubação por até seis meses para obtenção de um isolado clínico (REAGAN; SYKES, 2019).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica molecular amplamente disponível em laboratórios veterinários e é capaz de detectar o DNA de *Leptospira* antes do desenvolvimento de uma resposta por anticorpos, tornando-a mais sensível que o MAT, em estágios iniciais de infecção (REAGAN; SYKES, 2019). Em amostras de urina, resultados também devem ser interpretados em conjunto com o quadro clínico devido a excreção

intermitente da bactéria e a possibilidade de contaminantes e/ou inibidores da PCR na amostra (SYKES et al., 2023).

### 2.1.5 Tratamento

Em cães, o tratamento da leptospirose envolve o uso de antibioticoterapia para eliminação da bactéria em conjunto com tratamento de suporte para reduzir o dano à órgãos como os rins e fígado (GRIEBSCH et al., 2022). O tratamento antimicrobiano deve ser empregado o mais cedo o possível no curso da infecção, considerando-se que a leptospirose canina possui elevada taxa de letalidade (MIOTTO et al., 2018). Entretanto, frequentemente o diagnóstico é baseado nas apresentações clínicas inespecíficas enquanto veterinários aguardam o resultado de testes diagnósticos, o que resulta no emprego de agentes de amplo espectro (SUEPAUL et al., 2015).

Para caninos, recomenda-se a administração intravenosa inicial de derivados de penicilina para resolução da fase de leptospiremia, seguida da administração oral de doxiciclina com o objetivo de eliminar a persistência renal e prevenir o status de carreador crônico (SCHULLER et al., 2015; SYKES et al., 2023). Apesar de não haver um tempo de tratamento ótimo, estima-se o uso de doxiciclina por 14 dias (SYKES et al., 2023).

Chakraborty e colaboradores (2011) estudaram os efeitos da ampicilina, estreptomicina e ciprofloxacina em *Leptospira*, observando modificações na estrutura celular (degradação de membrana, formação de vesículas membranares, irregularidades do espiralado, perda de ganchos, desprendimento de flagelo e edema celular), principalmente em porções terminais. Como as porções terminais são tidas como o sítio mais ativo de metabolismo, de síntese proteica e de parede celular de leptospiros, hipotetizou-se que o dano celular pelas drogas testadas se origina nestes locais (CHAKRABORTY et al., 2011).

A literatura reporta resultados conflitantes sobre a eficácia do tratamento de leptospirose em cães. Já foi reportada excreção persistente de leptospiros, confirmada por PCR, mesmo após antibioticoterapia. Entre os agentes empregados estão doxiciclina, amoxicilina, enrofloxacina e ampicilina (JUVET et al., 2011; MAURO; HARKIN, 2019; RATET et al., 2014). Em contraste, Sharun e colaboradores (2019) reportaram sucesso no uso das recomendações de penicilina e doxiciclina (14 dias). McCallum e colaboradores (2019) observaram infecção persistente apesar de tratamento (entre 14 e 21 dias) com doxiciclina.

O número de ensaios clínicos randomizados que avaliam a eficácia das terapias frente à leptospirose permanece limitado. Ressalta-se que diferentes critérios foram utilizados para

confirmar o sucesso do tratamento, incluindo PCR de urina ou sangue, MAT e tentativas de cultivo bacteriano (MAURO; HARKIN, 2019). Consequentemente, essa variabilidade de critérios para determinar o sucesso terapêutico pode contribuir para falhas no tratamento, favorecendo o estabelecimento de infecções crônicas e a consequente colonização renal persistente.

O uso otimizado de antimicrobianos traz benefício ao paciente e à saúde pública ao minimizar a contribuição para a problemática da resistência antimicrobiana. Ainda são escassos os estudos sobre a susceptibilidade de isolados de *Leptospira* em cães, devido, principalmente, às dificuldades no isolamento desta espiroqueta. No entanto, alguns estudos relataram concentrações inibitórias mínimas (CIMs) que sustentam o uso de antimicrobianos em pacientes clínicos, como ampicilina, azitromicina, doxiciclina, eritromicina e ciprofloxacina (CHAKRABORTY et al., 2010; MUARRY; HOSPENTHAL 2004; RESSNER et al., 2008). Outros indicaram CIMs bastante elevadas para doxiciclina, droga de preferência para a resolução da leptospirúria (CHAKRABORTY et al., 2010; MUARRY; HOSPENTHAL 2004; RESSNER et al., 2008; SUEPAUL et al., 2015).

É importante ressaltar que os estudos em susceptibilidade antimicrobiana foram realizados com poucas variedades de isolados de *Leptospira*, geralmente envolvendo cepas mantidas em laboratório. Adicionalmente, esses resultados podem variar entre regiões geográficas e espécies bacterianas, evidenciando a necessidade de resultados que reflitam cenários distintos, com emprego de isolados ambientais e clínicos (TROTT; ABRAHAM; ADLER, 2018).

## 2.2 BIOFILMES

Atribuíam-se às bactérias um único modo de crescimento - planctônico - caracterizado por organismos solitários e livres. Posteriormente, foi reconhecido o crescimento bacteriano em forma de biofilmes (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978). van Leeuwenhoek, criador do primeiro microscópio, observou pela primeira vez, em 1684, agregados em placa bacteriana; em publicação de 1833, foi descrito o crescimento bacteriano em superfície com formação de aglomerados (DONLAN; COSTERON, 2002). A primeira evidência de biofilmes clínicos, como são reconhecidos atualmente, ocorreu em 1917 em esfregaço de escarro de um paciente com fibrose cística (HOIBY, 1977). Entretanto, foi em 1978 que a teoria da formação de biofilmes foi postulada a partir da observação de ecossistemas aquáticos onde a maioria das

bactérias parecia crescer em biofilmes contidos em uma matriz e aderidos a superfícies (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978).

Biofilmes são tradicionalmente descritos como agregados microbianos fixados a uma superfície biótica ou abiótica, contidos em uma matriz extracelular autoproduzida (COSTERTON et al., 1995). A introdução da tecnologia de microscopia confocal de varredura e o avanço na aplicação de vários métodos moleculares permitiram a investigação mais completa de biofilmes, incluindo a caracterização de suas estruturas e o estudo da regulação gênica (LAWRENCE et al., 1991). Ademais, o envolvimento do biofilme tem sido cada vez mais reconhecido em novas infecções e doenças, de modo que a definição de biofilme tende a ser refinada de acordo com novas descobertas (SHARMA et al., 2023).

Devido a variabilidade em sua estrutura e composição nos diferentes nichos ecológicos, a definição de biofilme tem sido mantida de forma mais genérica, como células microbianas imobilizadas em uma matriz extracelular de polímeros. Este arranjo atua como um ecossistema funcional e altamente dinâmico, homeostaticamente regulado, que interage com o ambiente e se adapta a ele, formando estruturas complexas (FLEMMING; WUERTZ, 2019).

A formação do biofilme e seu desenvolvimento em fenótipo maduro é um processo composto por várias etapas, sendo dependente de algumas variáveis como os tipos de microrganismos em sua composição, a superfície de fixação, disposição de nutrientes, pH, temperatura e expressão de genes (SHARMA et al., 2023). Cinco estágios estão envolvidos neste processo: fixação a uma superfície, formação de agregados/microcolônias, produção de matriz extracelular polimérica, maturação e dispersão (DUTTA et al., 2021).

A adesão inicial ocorre por intermédio de estruturas bacterianas (como flagelo ou pili), a um substrato (receptor) em sistemas biológicos, referida como fixação reversível (GUPTA et al., 2016). Segue-se o movimento de microrganismos em proximidade, formando co-agregados celulares e iniciando a produção de matriz (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Bactérias expressam adesinas altamente específicas para esse processo de aderência célula-célula e para receptores na matriz; a matriz mantém presos colonizadores iniciais e atua como receptora para a adesão de mais microrganismos (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

O acúmulo de células culmina na formação de microcolônias mais estáveis, propícias para a multiplicação e divisão celulares (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Nestas comunidades iniciais já ocorre o processo de Quorum Sensing (QS). QS é um sistema de comunicação célula-a-célula no qual moléculas de sinalização coordenam comportamentos bacterianos, como a formação de biofilme e a expressão de mecanismos de patogenicidade

(DUTTA et al., 2021). Desse modo, as células coordenam seus estilos de vida como um grupo através de vias de sinalização para troca de substratos, distribuição de produtos metabólicos e excreção de produtos do metabolismo bacteriano (DUTTA et al., 2021). Em *Leptospira*, foi proposto um papel do QS na regulação da formação de biofilmes, tanto no ambiente quanto em hospedeiros animais (SANTOS et al., 2021). Entender como essas moléculas respondem e como elas influenciam o comportamento de leptospiras pode fornecer novos alvos terapêuticos para a disrupção de biofilmes.

Conforme ocorre acúmulo de células nas microcolônias, a produção de substância extracelular polimérica (EPS, do inglês *Extracellular Polymeric Substance*) atua como um “cimento”, mantendo a adesão irreversível do biofilme (GUPTA et al., 2016). A EPS é altamente hidratada e desempenha papéis essenciais na estrutura, na proteção dos organismos componentes e atuando como um sistema digestivo, a depender do(s) tipo(s) bacteriano(s) que compõem o biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Esta matriz é composta por polissacarídeos, proteínas, lipídeos, ácido nucléico e substâncias inorgânicas. O DNA extracelular (eDNA) é o principal componente da EPS, responsável principalmente pela arquitetura dos biofilmes, mas participa também na transferência gênica, no reparo de DNA e QS (DUTTA et al., 2021).

A conseqüente maturação do biofilme em uma arquitetura complexa culmina no desenvolvimento de canais por onde se movem livremente nutrientes, oxigênio e sais inorgânicos, e por onde ocorre a remoção de produtos metabólicos (ZHAO et al., 2023). A última etapa é referida como dispersão, que consiste na separação de células bacterianas da massa principal do biofilme, através de mecanismos físicos (erosão) e químicos (trocas de substratos, nutrientes, colonização de novos sítios) (DUTTA et al., 2021). A dispersão é valiosa para a promoção de diversidade genética, escape de ambientes desfavoráveis e colonização de novos nichos, constituindo uma relevante estratégia de sobrevivência (SHARMA et al., 2023).

Ressalta-se que o modelo típico de cinco passos atribuído à formação de biofilme é extrapolado a partir de estudos utilizando *Pseudomonas aeruginosa* como modelos de biofilmes. Este modelo de desenvolvimento ainda considera a necessidade de adesão a uma superfície como etapa crucial. Entretanto, o papel de agregados bacterianos não fixados vem recebendo crescente atenção (KRAGH; TOLKER-NIELSEN; LICHTENBERG, 2023; SAUER et al., 2022). Sauer e colaboradores (2022) propuseram então a expansão do modelo conceitual de formação de biofilme, considerando o envolvimento de três eventos: agregação, crescimento e dispersão. Neste modelo, sugere-se independência do processo de fixação a uma superfície biótica ou abiótica e considera a agregação como o evento central (SAUER et al., 2022). Os

autores destacam que o modelo tradicional não considera relevantes aspectos, incluindo a composição dos microrganismos, os diferentes ambientes circundantes das células, a diferença entre microambientes *in vitro* e *in vivo* e, principalmente, o fato de que muitos biofilmes bacterianos não foram investigados em cenários clínicos. Assim, são necessários estudos *in vivo* buscando elucidar as características de agregados bacterianos e dos microambientes que possam estar envolvidas na patogênese da infecção e na tolerância a antimicrobianos.

### 2.2.1 Biofilmes e Saúde Única

A estrutura dos biofilmes confere proteção bacteriana em ambientes hostis (dentro ou fora do hospedeiro), fator que favorece a sobrevivência e conseguinte disseminação bacteriana (JACQUES; MALOUIN, 2022). Como o conceito de Saúde Única abrange a interface humano-animal-ambiente (CDC, 2023; WHO, 2019), diversas infecções bacterianas zoonóticas, a exemplo da leptospirose, navega por todos estes cenários de forma integrada. Ademais, por serem encontrados em uma variedade de ambientes naturais (marinho, água fresca, efluentes) e condições clínicas (infecções em humanos e animais) (JACQUES; MALOUIN, 2022), os biofilmes estão intimamente conectados ao conceito de Saúde Única.

A abordagem proposta pela Saúde Única, que visa a quebra das barreiras que ainda separam a medicina humana, veterinária e as ciências ambientais (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2018) de aspectos socioeconômicos, concilia com o ciclo de transmissão da leptospirose e de outras zoonoses. Doenças causadas por patógenos como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria* e *Escherichia coli*, destacam-se por sua capacidade de produzir biofilmes e são também comumente disseminadas nesta interface de ambiente compartilhado entre animais e humanos (JACQUES; MALOUIN, 2022).

O avanço no estudo de genomas bacterianos documentou a presença de uma gama de genes envolvidos na formação, regulação e modulação de biofilmes, demonstrando que a maquinaria para produção de matriz extracelular, apesar de seu elevado custo energético, está presente em quase todos os genomas (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Ademais, a conservação destes genes ao longo da evolução sugere que a formação de biofilme é crítica para o ciclo de vida da maioria das bactérias, tanto dentro do hospedeiro quanto em interações entre hospedeiros (JACQUES; MALOUIN, 2022). Assim como na Saúde Única, o estudo dos biofilmes deve apresentar uma abordagem multidisciplinar, incluindo estratégias para sua identificação, controle e prevenção e, conseqüentemente, prevenir a persistência e a disseminação de patógenos entre ambientes, animais e pessoas (JACQUES; MALOUIN, 2022).

Enquanto as formas planctônicas contribuem para a proliferação e disseminação, são as populações bacterianas sésseis que permitem a persistência no hospedeiro e no ambiente (CLUTTERBUCK et al., 2007). Tanto na medicina humana quanto na veterinária, o desafio para diagnosticar e tratar infecções por biofilmes mostra sua relevância para a saúde. Além das propriedades protetivas contra a ação de agentes antimicrobianos, a matriz do biofilme também confere proteção contra células do sistema imune através de ação antifagocítica (SHARMA et al., 2019). Adicionalmente, a resposta imune contínua contra o biofilme pode causar injúrias ao parênquima local, pois, mesmo que células fagocíticas sejam incapazes de eliminar bactérias protegidas dentro do biofilme, a produção prolongada de citocinas promove uma resposta inflamatória exacerbada e elevados níveis de proteases no local (CLUTTERBUCK et al., 2007).

Na medicina humana, infecções por biofilmes estão associadas a maiores morbidade e mortalidade, a exemplo de infecções em cateteres (PELLING et al., 2019), fibrose cística (MARTIN WATERS; GRASEMANN, 2021), endocardite (LERCHE et al., 2021) e cárie dentária (MEYER et al., 2021). Na medicina veterinária, biofilmes impactam tanto animais de produção quanto de companhia, com envolvimento em diversas enfermidades. Entre elas, mastite bovina, feridas em equinos, doenças do trato urinário em cães e gatos, doenças gastrintestinais, periodontites, otites, dermatites e complicações associadas a implantes ortopédicos (NESSE; OSLAND; VESTBY, 2023).

Pye e colaboradores (2013) observaram que 40% dos isolados de *P. aeruginosa* obtidos de amostras clínicas de otite canina eram capazes de produzir biofilme, o que estava associado a uma aumentada resistência à polimixina B, neomicina, gentamicina e enrofloxacina, em comparação com suas formas planctônicas. Em uropatógenos, a produção de biofilmes foi associada à resistência antimicrobiana, maior morbidade e recorrência de infecções em cães (SHIMIZU; HARADA, 2017). A formação de biofilme também já foi documentada em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina (PEDERSEN et al., 2021) e em ambientes de processamento de alimentos (DE SOUZA et al., 2014). Ademais, *Mycobacterium avium*, um patógeno associado à contaminação de alimentos e infecções em animais e humanos, foi reportado na forma de biofilmes em sistemas de água potável (FALKINHAM; NORTON; LECHEVALLIER, 2001).

Os biofilmes têm um impacto significativo na Saúde Única, comprometendo o tratamento de infecções, favorecendo a permanência de agentes infecciosos no ambiente e em hospedeiros, além de dificultar o diagnóstico precoce de infecções associadas a elevadas morbidade e mortalidade (JACQUES; MALOUIN, 2022). Portanto, compreender os

mecanismos envolvidos na sua formação, tanto no ambiente quanto em humanos e animais, é essencial para que sejam adotadas estratégias eficazes de controle e promoção da saúde.

### 2.2.2 Biofilmes e Resistência Antimicrobiana

A resistência antimicrobiana está no topo da lista de ameaças à saúde humana e animal (WHO, 2023) e encontra-se entre as principais ameaças globais à Saúde Única (PAHO, 2021). Mesmo em indivíduos imunologicamente competentes, a característica mais desafiadora de infecções associadas a biofilmes é a dificuldade em tratá-las (LICHTENBERG et al., 2023). As bactérias em biofilmes apresentam um fenótipo de resistência a antibióticos de 10 a 1000 vezes superior em comparação às bactérias na forma planctônica (SHARMA et al., 2019).

Diversos mecanismos operam em conjunto promovendo resistência e/ou tolerância a agentes antimicrobianos (OLSEN, 2015). Estes mecanismos podem ser divididos em diferentes categorias: (a) tolerância física, (b) tolerância fisiológica, (c) tolerância transcriptômica, (d) células persistentes e (e) QS (LICHTENBERG et al., 2023). Fisicamente, a matriz do biofilme restringe o acesso do agente antimicrobiano às bactérias dele. Além desta barreira de penetração, a EPS pode agir como um trocador iônico, sequestrando antibióticos hidrofóbicos e positivamente carregados, como os aminoglicosídeos (CLUTTERBUCK et al., 2007). O fenótipo fisiológico de crescimento lento, característico da maioria das bactérias em biofilmes, torna inativos alguns dos alvos de antimicrobianos, como a síntese proteica. Em biofilmes por *P. aeruginosa*, os antibióticos ciprofloxacina e tobramicina mostraram-se ativos somente na interface biofilme-ar, onde há elevadas concentrações de oxigênio (WALTERS et al., 2003).

A expressão de genes específicos também pode conferir reduzida sensibilidade. Por exemplo, níveis elevados de Guanosina monofosfato (3'-5')-cíclica dimérica (c-di-GMP) - associados com a produção de matriz em espécies Gram-negativas (ANDERSEN et al., 2021) - e a expressão de bombas de efluxo (GUPTA et al., 2014; LICHTENBERG et al., 2023). Adicionalmente, nas partes mais inferiores do biofilme encontra-se uma subpopulação de células metabolicamente menos ativas, chamadas persistentes. Estas células se diferenciaram em um estado dormente como forma de proteção, apresentando alta tolerância à ação de antibióticos (LEWIS, 2012). Elas são responsáveis por retomar o crescimento de biofilmes que sofrem algum processo de agressão e por repopular o sítio de infecção (PERCIVAL et al., 2011a).

Como biofilmes atuam como ambientes protetivos para células persistentes, sua presença deve também ser investigada em infecções agudas, onde a resistência antimicrobiana

é considerada a principal causa de recalcitrância (OLSEN, 2015). Entretanto, a dificuldade em detectar biofilmes prematuros prejudica o tratamento (NAG et al., 2021) e destaca a relevância da busca por estratégias de prevenção, controle e erradicação de biofilmes. Dentre as metodologias propostas estão a dispersão de biofilmes, degradação da matriz extracelular, bloqueio da adesão bacteriana, interferência na comunicação celular por QS e destruição de células persistentes (DIELTJENS et al., 2020; STEWART, 2015; VERDEROSA; TOTSIKA; FAIRFULL-SMITH, 2019).

### **2.2.3 Biofilme por *Leptospira* spp.**

A epidemiologia e a patogenia de *Leptospira* ancoram-se na colonização persistente de túbulos renais em hospedeiros reservatórios e na sobrevivência no ambiente externo (ANDRE-FONTAINE; AVIATI; THORIN, 2015). No entanto, outros sítios de colonização devem ser considerados na transmissão, como a rota genital, crescentemente investigada em pequenos ruminantes e bovinos (LOUREIRO; LILENBAUM, 2020; SANTOS et al., 2022) No ambiente, sua capacidade de sobreviver sugere a presença de sistemas regulatórios que permitem a adaptação aos desafios apresentados pelos diferentes estresses (THIBEAUX et al., 2020). Por exemplo, *L. interrogans* conserva energia para sobreviver em ambientes estressantes, através da redução da expressão de genes envolvidos em motilidade, produção de energia e metabolismo (DAVIGNON et al., 2024). Nos hospedeiros, a persistência crônica sugere a presença de fatores que previnem a ação do sistema imune e de agentes antimicrobianos (GEIBLER; WOLLANKE, 2021).

O impacto negativo da leptospirose na saúde humana e animal impulsionou a investigação de biofilmes por leptospirose em diferentes cenários. Leptospirose foram capazes de formar biofilmes *in vitro* (IRAOLA et al., 2016; RISTOW et al., 2008; THIBEAUX et al., 2020). Foram isoladas a partir de biofilmes ambientais inseridos em comunidade urbana com baixa sanitização, indicando função na manutenção ecológica do patógeno (DOS SANTOS RIBEIRO et al., 2023). Anteriormente, estudos evidenciaram biofilmes de *Leptospira* em plantações de arroz e esgotos (VINOD KUMAR et al., 2015). Em hospedeiros animais, evidenciou-se a presença de biofilme nos túbulos renais de *Rattus norvegicus* (SANTOS et al., 2021) e no humor vítreo de equinos com uveíte recorrente (ACKERMANN et al., 2021). Contudo, de acordo com a literatura consultada, não há relatos de formação de biofilme em cães acometidos por leptospirose aguda ou crônica.

Ristow e colaboradores (2008) investigaram a formação de biofilmes por *Leptospira* impulsionados pela capacidade de espécies saprofitas e patogênicas de sobreviver em ambientes aquáticos, um fator relevante para a transmissão da doença. Adicionalmente, acreditava-se que a colonização crônica de túbulos renais de hospedeiros de manutenção ocorria através da formação de agregados celulares. Nesse contexto, a investigação inicial da estrutura e dos possíveis mecanismos envolvidos na colonização renal de animais reservatórios foi de fundamental importância. Os autores observaram que 90% das cepas estudadas formavam biofilmes *in vitro*, com espécies patogênicas necessitando de períodos mais longos para atingir a maturação. Estruturalmente, os biofilmes apresentaram-se como microcolônias piramidais, multicelulares e organizadas em diversas camadas, com bactérias separadas por canais (RISTOW et al., 2008).

O tratamento da leptospirose pode ser desafiador, com respostas variadas frente a diferentes agentes antimicrobianos (MIRAGLIA et al., 2013; MORENO et al., 2016; SUEPAUL et al., 2015). Considerando que o tratamento deve ser iniciado assim que se apresente suspeita da doença, de modo a limitar a bacteremia e evitar a excreção urinária de leptospiros (SYKES et al., 2023), a associação de biofilmes com a resistência antimicrobiana impulsionou a investigação do perfil de susceptibilidade em leptospiros na forma de biofilme. De modo geral, leptospiros associadas a biofilmes apresentam maiores níveis de resistência *in vitro* (DE CARVALHO et al., 2023; VINOD KUMAR et al., 2016b; VINOD KUMAR et al., 2018).

Outras características investigadas em biofilmes por *L. interrogans* incluem o papel do eDNA e do sinalizador c-di-GMP (THIBEAUX et al., 2020). O eDNA mostrou-se crítico para a formação de biofilme coeso, sendo constituinte abundante no biofilme maduro; exposição do biofilme à DNase resultou na sua disrupção após 24h do tratamento. O mesmo estudo relatou que interferência no c-di-GMP de leptospira compromete a formação de biofilme, evidenciando o papel funcional da sinalização por c-di-GMP em *L. interrogans* (THIBEAUX et al., 2020).

Outra proteína essencial para a manutenção de biofilmes de *Leptospira* é a chaperonina GroEL (VINOD KUMAR et al., 2017). Sua expressão confere resistência a condições adversas, um fator crucial para a sobrevivência de leptospiros em ambientes hostis, como águas contaminadas. Adicionalmente, devido à sua alta imunogenicidade, a proteína GroEL foi sugerida como um potencial alvo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (VINOD KUMAR et al., 2017).

Estudos adicionais são necessários para entender fatores gênicos, ambientais e dos hospedeiros que possam estar associados à formação de biofilmes por leptospiros. Ademais, a

presença de biofilmes em leptospiros focou amplamente em sua influência no estabelecimento e manutenção de infecções crônicas e na persistência do patógeno no ambiente. A formação do biofilme, assim como a patogenia da leptospirose, é um processo dinâmico, o que justifica a investigação em outros cenários clínicos, assim como o estudo de outras espécies de leptospiros e de hospedeiros acidentais e carreadores.

### 2.3 ÁCIDO p-CUMÁRICO (p-CA)

O ácido p-CA é um polifenol derivado do metabolismo de plantas, amplamente encontrado em bebidas (café e vinho), cereais (aveia e trigo) e até mesmo em frutas (cerejas, maçãs e uvas) (FERREIRA et al., 2019; PEI et al., 2016). Metabólitos secundários, como o p-CA, têm atraído interesse devido às suas diversas propriedades biológicas, incluindo atividades antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, antitumoral e antimicrobiana (PEI et al., 2016). Além disso, o p-CA demonstrou potencial como agente antibiofilme. Ferreira e colaboradores (2021) observaram que p-CA em cristais líquidos apresentaram maior capacidade de erradicar biofilmes maduros de *Candida albicans* em comparação com a anfotericina B e fluconazol.

Estudos recentes reforçam a relevância do ácido p-cumárico como agente antibiofilmes bacterianos. Foi demonstrada sua capacidade de inibir a formação de biofilmes por *Streptococcus mutans*, reduzindo significativamente a virulência deste patógeno (AHMAD et al., 2024). Ademais, a incorporação de p-CA em scaffolds de poliuretano mostrou-se eficaz na disrupção de biofilmes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, destacando seu potencial em dispositivos biomédicos (DU et al., 2023). Outro estudo investigou sua capacidade de inibir o QS bacteriano, sugerindo aplicações para a preservação de alimentos (CHEN et al., 2020). Estas propriedades tornam o p-CA um promissor candidato para avaliação em estudos de disrupção de biofilmes bacterianos.

O elevado grau de resistência a antimicrobianos associado às infecções por biofilmes impulsiona a busca por métodos eficazes para dispersão destas comunidades multicelulares. Um dos principais fatores no combate a infecções por biofilmes é entender a fisiologia do seu desenvolvimento por diferentes microrganismos, de modo a selecionar agentes que atuem nas diferentes fases de sua formação (PERCIVAL et al., 2011b). Uma estratégia promissora é o uso de moléculas capazes de causar a disrupção da estrutura multicelular do biofilme, aumentando a efetividade de agentes antimicrobianos convencionais (antibióticos) e das células de defesa do hospedeiro, que passam a ter acesso facilitado às bactérias protegidas na matriz do biofilme (STEWART; COSTERTON, 2001).

A literatura reporta o estudo de agentes naturais com ação anti-biofilme ou anti-aderência bacteriana, incluindo extratos de alho em *P. aeruginosa* (BJARNSHOLT et al., 2005), polifenóis de oxicoco em *Porphyromonas gingivalis* (YAMANAKA et al., 2007) e *E. coli* (HOWELL, 2002), ácidos ginkgólicos em *E. coli* e *Staphylococcus aureus* (LEE et al., 2014). Entretanto, até o momento, não foram publicadas pesquisas objetivando a avaliação anti-biofilme de *Leptospira* por agentes naturais.

### **3 HIPÓTESE**

Cepas autóctones de *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae isoladas a partir de amostras de cães com infecção aguda formam biofilme em parênquima renal. Biofilmes maduros de *L. interrogans* com apenas sete dias de formação exigem maiores concentrações de antimicrobianos para sua disrupção em comparação com bactérias em sua forma planctônica. O antimicrobiano natural, ácido p-cumárico, tem o potencial de atuar na disrupção de biofilmes maduros de *L. interrogans*.

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Verificar a formação de biofilme em parênquima renal de cães naturalmente infectados por *Leptospira interrogans*, através de histotécnicas, assim como analisar a disrupção *in vitro* de biofilmes maduros, com sete dias de formação, por ação de agentes antimicrobianos.

#### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Investigar a formação de biofilme em parênquima renal de cães naturalmente infectados por *Leptospira interrogans*, em quadro agudo de infecção.

Determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas estudadas, na forma de biofilmes maduros, com sete dias frente à doxiciclina, ciprofloxacina e ácido p-cumárico.

Avaliar a arquitetura de biofilmes maduros (sete e 21 dias) após exposição à doxiciclina, ciprofloxacina e ácido p-cumárico, por microscopia eletrônica de varredura.

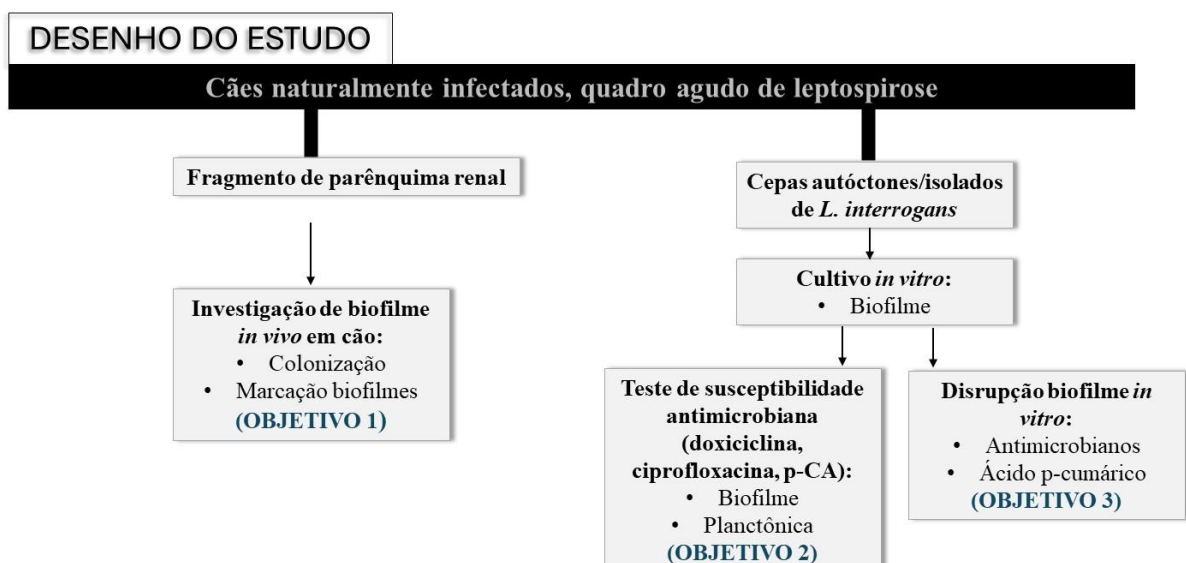
## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 DESENHO DO ESTUDO

O presente estudo faz parte de abordagem multidisciplinar adotada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bacterioses (LABAC – Universidade Federal da Bahia/UFBA), envolvendo a caracterização de cães com leptospirose e a obtenção de 17 isolados autóctones de *Leptospira* spp. Para tanto, foram incluídos cães atendidos no setor de clínica de pequenos animais do Hospital de Medicina Veterinária Renato R. de Medeiros Neto, UFBA. De todos os animais, mediante aceite de participação do responsável, foram coletadas amostras para diagnóstico de leptospirose (Anexo A).

A avaliação da formação de biofilme foi realizada a partir de parênquima renal de quatro cães naturalmente infectados, com desfecho clínico óbito. As atividades previstas foram aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA (autorização nº 06.2021 - Anexo B e nº 93/2023 - Anexo C). Adicionalmente, a partir do cultivo *in vitro*, foi realizado o teste de susceptibilidade antimicrobiana (planctônica e biofilme) e analisada a disrupção de biofilmes (sete e 21 dias) formado por cepas autóctones isoladas a partir de amostras clínicas (sangue e urina) destes mesmos cães, frente à doxiciclina ciprofloxacina e ácido p-cumárico (Figura 1).

**Figura 1** - Representação esquemática do desenho de estudo sobre formação de biofilme em parênquima renal de cães naturalmente infectados por *L. interrogans* e análise *in vitro* de disrupção de biofilmes por antimicrobianos e ácido p-cumárico.



## 5.2 CEPAS AUTÓCTONES

Para verificar a formação de biofilme, foram selecionadas quatro cepas autóctones de *Leptospira* (C20, C29, C51 e C82), obtidas pelo nosso grupo de pesquisa, a partir de amostras de sangue e urina de cães naturalmente infectados com quadro clínico de leptospirose aguda, oriundas do mesmo cenário epidemiológico (Anexo D). Estas foram mantidas congeladas a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o número de passagens em meio de cultura foi rigorosamente monitorado, tratando-se de cepas infectantes (ensaio em modelo hamster de infecção). Com base na caracterização sorológica (PAZ et al., 2021b) e molecular (ANI do inglês *Average Nucleotide Identity*), as cepas foram identificadas como *L. interrogans* sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* (PAZ et al., 2025).

## 5.3 INVESTIGAÇÃO DE BIOFILME RENAL *in vivo*

A formação de biofilme por *L. interrogans* foi investigada em fragmentos renais dos mesmos cães a partir dos quais obtivemos êxito no isolamento das cepas utilizadas neste estudo, referidos também como C20, C29, C52 e C82. A avaliação histológica para identificação da presença de biofilme foi realizada através do emprego de histotécnicas com colorações especiais e imunohistoquímica. Fragmentos de parênquima renal de aproximadamente  $2\text{ cm}^2$ , fixados em formol neutro tamponado 10%, foram utilizados para obtenção de cortes histológicos de  $3\text{ }\mu\text{m}$  para realização sequencial das seguintes histotécnicas, em cortes seriados: Hematoxilina-Eosina (HE), Imunohistoquímica (IHQ), Azul de Alcian (AA) e Ácido Periódico-Schiff (PAS).

Para detecção de biofilme, foi empregado o Azul de Alcian, que em pH 2,5 (ácido acético 3%) foi utilizado para marcar mucopolissacarídeos, ácidos sulfatados e carboxilados, sialomucinas (glicoproteínas) sulfatadas e carboxiladas presentes na matriz de biofilmes. A reação de coloração pelo PAS foi utilizada para demonstrar a presença de sialomucinas (glicoproteínas), substâncias mucoides neutras, membrana basal e glicogênio, conferindo a cor rosa escuro (ou magenta) quando presentes (CARSON; HLADIK, 2009).

A análise por imunohistoquímica foi realizada de acordo com Haake e colaboradores (2000), com modificações. Parafina foi removida dos fragmentos de parênquimas renais com banhos em xilol e as secções desidratadas com álcool. Para recuperação antigênica enzimática foi utilizada a tripsina (0,1% em 0,1 mol/L Tris HCl, pH 7,6), a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 30 minutos. Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3%, à

temperatura ambiente. Após bloqueio de ligações inespecíficas com albumina 1%, as secções foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti-LipL32 (gentilmente cedido pelo Dr. David A. Haake, Division of Infectious Diseases, VA Greater Los Angeles Healthcare System, CA, USA), presente somente em *Leptospira* patogênicas, na diluição de 1:50, a 4 °C, overnight.

Para etapas posteriores foram utilizados reagentes contidos no sistema de detecção polimerizada controlada - NovoLink Polymer Detection System (Leica). As reações enzimáticas foram reveladas com o uso de 3,3' - diaminobenzidina (DAB, Leica). Posteriormente, os cortes foram incubados por dois minutos com HE para contraste e revelação das estruturas do parênquima. Em seguida, os cortes foram cobertos com lamínulas, usando meio de montagem Entellan®.

Como controle positivo da reação foi utilizado fragmento de parênquima renal de hamster sírio infectado com *L. interrogans*, sg Icterohaemorrhagiae (isolada a partir do sangue do cão referido como C20 neste estudo), que evoluiu ao óbito após 4 dias de inoculação. Este método também foi utilizado para comprovar o status infectante das cepas estudadas. Como controle negativo da reação foram realizadas todas as etapas, exceto incubação com anticorpo primário anti-LipL32. Como controle negativo da espécie foi utilizado fragmento de parênquima renal de cão não infectado por *Leptospira*.

As lâminas foram avaliadas em microscópio trinocular de campo claro Nikon, modelo Eclipse Si (Nikon®) contendo sistema de aquisição de imagens com câmera digital (Prime Cam Intervisions WIFI 12 PRO, Prime Life Science®) e software de captura PrimeCam versão 5.1. Onde houve marcação por IHQ para a presença de LipL32, as imagens capturadas foram confrontadas com as colorações por AA e PAS para detecção de biofilme e HE para tentativa de colocalização (se marcação positiva por AA e ou PAS, a mesma área era observada por coloração HE). A presença de injúria tecidual renal nos parênquimas dos 4 cães foram previamente caracterizadas em PAZ et al., 2025.

## 5.4 AVALIAÇÃO DA DISRUPÇÃO DE BIOFILME DE *L. INTERROGANS*

### 5.4.1 Formação de biofilme *in vitro*

Todas as cepas estudadas (C20, C29, C51 e C82) pertencem à coleção de culturas do LABAC, mantidas congeladas em crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) 2,5% à -196 °C (NARDUCHE et al., 2016) e meio T80/40LH (JOHNSON; HARRIS, 1967). Com o objetivo de garantir a viabilidade e a qualidade dos experimentos, antes dos ensaios uma alíquota de

cada cepa foi descongelada e todo o conteúdo transferido para tubo de ensaio contendo 4,5 ml de meio para crescimento bacteriano. As culturas foram avaliadas quanto i) crescimento da população bacteriana até concentrações próximas a  $10^8$  leptospiras/mL em aproximadamente sete dias; ii) movimentação ativa das bactérias, caracterizada por vigorosa rotação; iii) ausência de crescimento de microrganismos contaminantes; iv) presença de auto aglutinação.

A formação de biofilme foi conduzida em placas de poliestireno com 96 poços, de baixa evaporação, específicas para cultura de células e tecidos (Nest Biotechnology®, Jiangsu, China), conforme descrito por De Carvalho e colaboradores (2023). Brevemente, as cepas foram cultivadas de acordo com suas curvas de crescimento (DE CARVALHO et al., 2023) até todas alcançarem a fase exponencial ( $1 \times 10^8$  leptospiras/mL) em dia específico para utilização nos experimentos, através de contagem em câmara de Petroff-Hausser (Hausser Scientific Company, PA, USA).

Todas as cepas foram padronizadas para obtenção de culturas com inóculos de suspensão bacteriana em concentração inicial de  $1 \times 10^6$  leptospiras/mL (DE CARVALHO et al., 2023). Posteriormente, 150 µl destas culturas foram dispensados no interior dos poços das placas de poliestireno, em triplicata, e incubadas a 30 °C sob condições estáticas e avaliadas em momentos distintos, conforme ensaio por disrupção com uso de antimicrobianos e ácido p-cumárico. Para minimizar a evaporação, os poços da periferia não foram utilizados, mas preenchidos com água destilada estéril.

#### **5.4.2 Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (TSA) da forma planctônica ao ácido p-cumárico**

Antes de determinar a susceptibilidade das cepas (C20, C29, C51 e C82) na forma de biofilmes, foi realizado o ensaio de susceptibilidade antimicrobiana de *L. interrogans* planctônica ao ácido p-cumárico conforme descrito por De Carvalho e colaboradores (2023), com breves modificações. O ensaio foi realizado através da técnica de microdiluição em caldo, que tem como objetivo determinar a concentração inibitória mínima (CIM) suficiente para inibição de crescimento bacteriano. Os resultados foram obtidos por meio de leituras das absorbâncias dos poços em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 570 e 600 nm e utilização do Alamar Blue (reagente que detecta crescimento celular).

O controle positivo de cada cepa (poços com leptospiras e sem adição de antimicrobianos) e negativo (poços somente com meio de cultivo) foram estabelecidos. 100µl de meio T80/40LH foram adicionados aos poços das placas. Diluições seriadas de ácido p-

cumárico (Sigma-Aldrich™ St. Louis, Missouri, USA) foram preparadas em etanol absoluto, resultando em concentrações finais variando de 0,02 a 1,600 µg/mL. Após este processo, alíquotas de 100 µl de cada cepa de *Leptospira* spp., em uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL, foram preparadas e distribuídas nos respectivos poços, com exceção dos poços destinados ao controle negativo, que receberam 100 µL de meio de cultura estéril. As placas foram incubadas por 24 horas a 30 °C sob exposição ao agente.

Para avaliar a viabilidade das leptospiiras na forma planctônica, adicionaram-se 20 µL de AB a cada poço, seguido de uma nova incubação por 90 minutos a 30° C. Após o período de exposição ao AB, o conteúdo dos poços foi transferido para uma outra placa de microtitulação para a leitura em espectrofotômetro. As densidades ópticas foram medidas nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. Com base na leitura das absorvâncias na fórmula fornecida pelo fabricante do AB, a CIM foi definida como a menor concentração do composto testado que resultou na redução em um valor igual ou inferior a 50% do AB, 90 minutos após a adição do reagente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

As porcentagens de reduções do AB foram obtidas, utilizando a fórmula a seguir:

$$\frac{(\epsilon_{ox})\lambda_2 A \lambda_1 - (\epsilon_{ox})\lambda_1 A \lambda_2}{(\epsilon_{RED})\lambda_1 A' \lambda_2 - (\epsilon_{RED})\lambda_2 A' \lambda_1} \times 100$$

Onde:  $\epsilon_{ox}$  = coeficiente de extinção molar do Alamar Blue (azul) na forma oxidada,  $\epsilon_{red}$  = coeficiente de extinção molar do Alamar Blue (rosa) na forma reduzida, A = absorvância dos poços testes, A' = absorvância dos poços controle negativo,  $\lambda_1 = 570\text{nm}$ , e  $\lambda_2 = 600\text{nm}$ .

### 5.4.3 Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (TSA) de biofilmes de *L. interrogans*

O ensaio de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado em todas as quatro cepas, conforme descrito por De Carvalho e colaboradores (2023), com modificações. Os controles positivos e negativos também foram estabelecidos. Brevemente, as bactérias em biofilme com sete dias de crescimento (biofilmes maduros) foram expostas a diluições seriadas de antimicrobianos (ciprofloxacina e doxiciclina) (Sigma-Aldrich™ St. Louis, Missouri, USA), variando entre 0,02 e 1.600,00 µg/mL. Para o ácido p-cumárico, todas as cepas testadas foram crescidas em biofilmes de sete e 21 dias, expostos a diluições seriadas do composto, variando entre 0,02 e 1.600,00 µg/mL.

Após completa formação de biofilme, o sobrenadante foi gentilmente aspirado e desprezado. Diluições seriadas dos compostos testados foram adicionadas aos poços correspondentes, em volume de 150 µl, nas concentrações acima especificadas. Os antimicrobianos doxiciclina e ciprofloxacina foram preparados em meio T80/40LH, enquanto as diluições seriadas do ácido p-cumárico foram preparadas em etanol absoluto. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas, a 30 °C sob exposição aos agentes. Após incubação, as bactérias em biofilme foram expostas a 20 µl de Alamar Blue (AB) em cada poço e posterior incubação por 6 horas a 30°C. Após a exposição ao AB, o conteúdo foi transferido para uma nova placa de microtitulação para a leitura no espectrofotômetro. As densidades ópticas foram lidas em espectrofotômetro (comprimentos de onda de 570 a 600 nm). Por meio das absorvâncias dos poços e sua inserção na fórmula disponibilizada pelo fabricante do AB, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração da droga que resultou na redução em um valor igual ou inferior a 50% do AB, após seis horas de exposição ao reagente.

#### **5.4.4 Observação microscópica de disrupção de biofilmes por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A partir dos resultados de susceptibilidade aos agentes testados, foram selecionadas, para cada cepa, uma concentração de cada antibiótico e do ácido p-cumárico eficazes para observação microscópica de disrupção dos biofilmes através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As cepas foram cultivadas como descrito na seção “5.4.1 Formação de biofilme *in vitro*”, com algumas modificações. Brevemente, inóculos de 1 mL de cultura em fase exponencial na concentração de  $1 \times 10^6$  leptospiras/mL foram adicionados em placas de 24 poços (Jetbiofil®, China), com fundo chato, específicas para cultura, cada poço contendo uma lamínula de vidro estéril de 12 mm de diâmetro. Após crescimento dos biofilmes de sete ou 21 dias, o sobrenadante foi removido, o biofilme lavado uma vez com PBS e posteriormente fixado com glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4 por 1 hora. Para os biofilmes com 21 dias de crescimento, a avaliação da disrupção pelo p-CA só foi realizada nas cepas C20 e C82.

Posteriormente, os biofilmes foram lavados três vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4, fixados com tetróxido de ósmio a 1% por 30 minutos e novamente lavados três vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4. Após fixação, os biofilmes foram desidratados através de uma série de concentrações de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%), e secados

utilizando o sistema de ponto crítico no equipamento CPD 030 (Leica, Wetzlar, Alemanha). As lamínulas foram coladas em *stubs* e metalizadas com ouro, formando uma camada de aproximadamente 25 nm. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura JSM-6390LV (Jeol, Tóquio, Japão), com operação em 10Kv.

Para análise dos efeitos disruptivos dos antimicrobianos sobre os biofilmes de *L. interrogans*, foi desenvolvida uma tabela específica (Tabela 3) contendo parâmetros descritivos observados por MEV. Esses parâmetros foram definidos com base nas características estruturais e morfológicas dos biofilmes e células que os compõem após a exposição aos tratamentos. Como não há um sistema padronizado na literatura para descrever a ruptura de biofilmes, inclusive de *Leptospira*, a criação desses critérios representa uma contribuição original deste estudo.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 INVESTIGAÇÃO DE BIOFILME EM PARÊNQUIMA RENAL DE CÃES COM INFECÇÃO AGUDA

Foram estudados fragmentos de parênquima renal obtidos de 4 cães (C20, C29, C51 e C82) diagnosticados com leptospirose aguda, caracterizados por manifestações clínicas, laboratoriais e histopatológicas de síndrome hepatorenal grave, capazes de formar biofilme *in vitro* (Tabela 1). A natureza grave das infecções resultou em desfecho clínico óbito em, no máximo, 24 horas após primeira consulta veterinária, de modo a serem instituídas abordagens terapêuticas de suporte, em sua maioria, por período curto empregando-se derivado de penicilina. Somente o animal C20 fez uso de doxiciclina por 24 horas (5 mg/kg, 2 doses).

**Tabela 1** – Clínica, patologia e tratamento de cães com leptospirose aguda e características dos isolados (C20, C29, C51 e C82) de *Leptospira interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae.

Cão	Origem do isolado	Caracterização molecular	PCR urina	PCR SgT	T.E.C (dias)	Clínica	Histopatologia	Tratamento
C20	Sangue	<i>L. interrogans</i>	+	-	5	Azotemia, anemia, disfunção hepática, icterícia, melena, anúria, vômito	Necrose e degeneração Inflamação mononuclear Regeneração tubular Congestão Hemorragia	Doxiciclina, VO (1dia)
C29	Urina	<i>L. interrogans</i>	-	-	4	Anemia, azotemia, disfunção hepática, icterícia, melena	Necrose e degeneração Inflamação mononuclear Cilindros hialinos/granulares Ectasia tubular Regeneração tubular Congestão	Benzilpenicilina, IV (menos de 8h)
C51	Sangue	<i>L. interrogans</i>	+	-	5	Azotemia, disfunção hepática, icterícia, anúria, convulsão	Necrose e degeneração Inflamação mononuclear Ectasia tubular Regeneração tubular Congestão Hemorragia	Benzilpenicilina, IV (menos de 8h)
C82	Sangue	<i>L. interrogans</i>	-	-	4	Icterícia, anúria	Inflamação mononuclear Necrose e degeneração Hemorragia	Suporte

FONTE: Adaptado de Dias e colaboradores (2021), Paz e colaboradores (2021) e Paz (2022).

SgT: Sangue Total

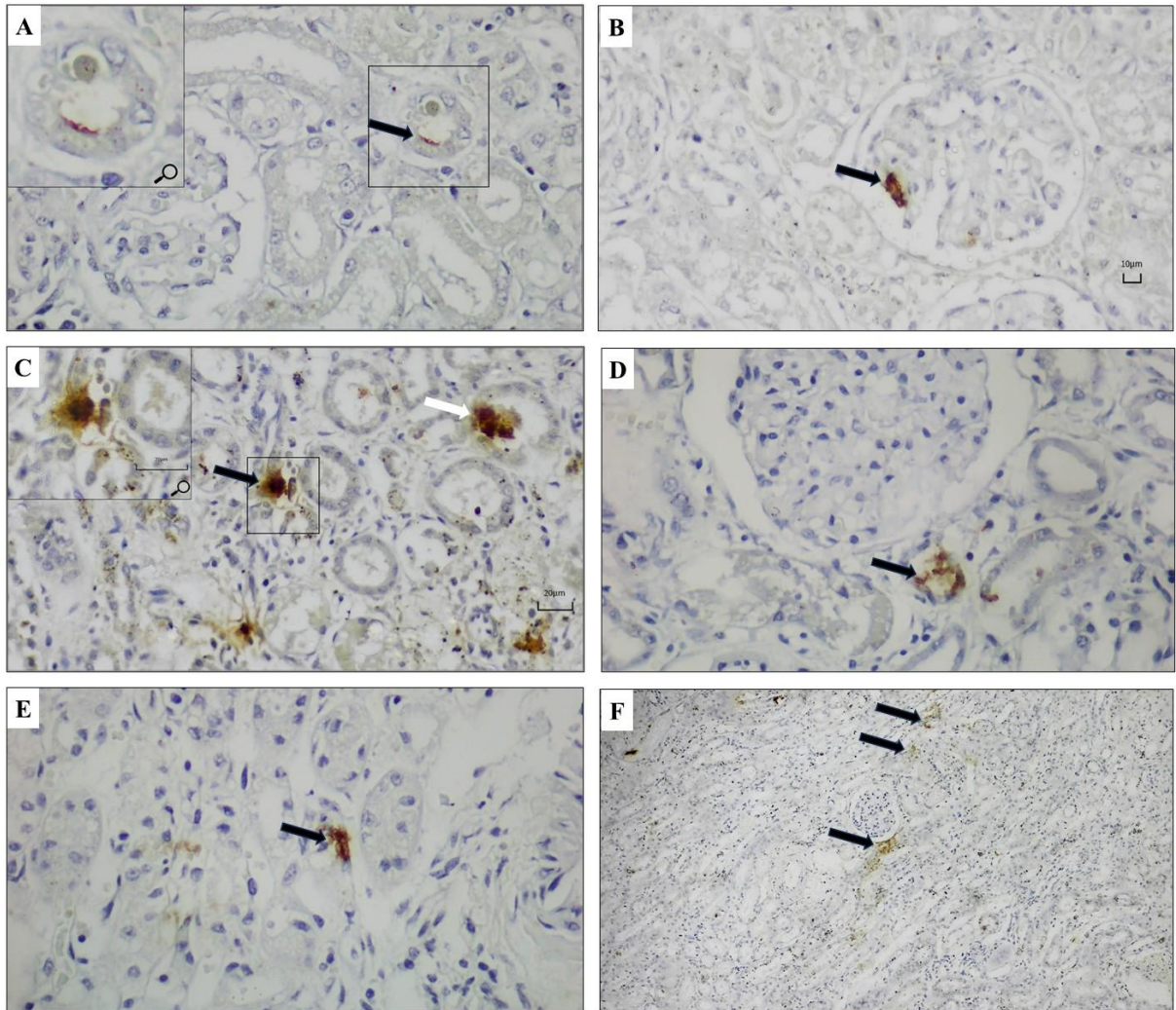
T.E.C.: Tempo de evolução clínica.

VO: Via oral.

IV: Via intravenosa.

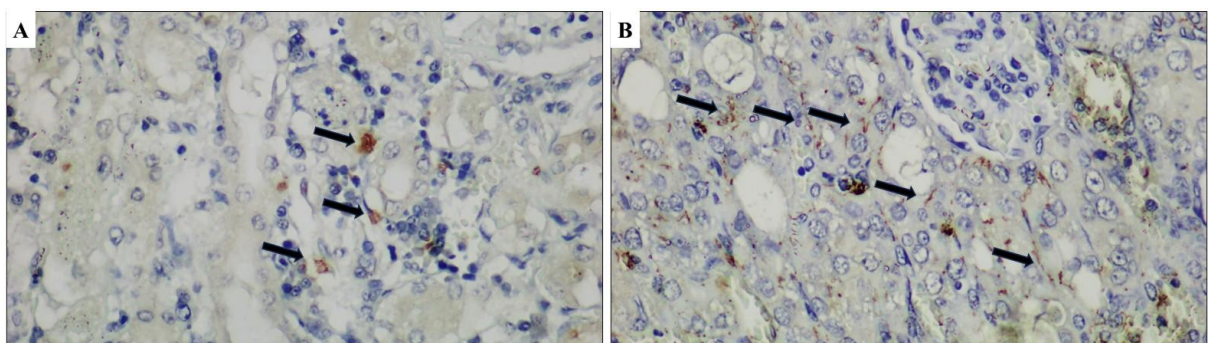
Imunohistoquímica anti LipL-32 evidenciou reatividade imunogênica em todos os fragmentos renais analisados, sendo observados depósitos granulares antigênicos reativos, agregados bacterianos e leptospiros intactas, com distribuição multifocal, em membranas apicais de células tubulares, no lúmen e espaços peritubulares (Figura 2). Em contraste, hamster infectado com a cepa C20 apresentou padrão de colonização mais intensa, com evidente marcação de numerosas leptospiros intactas em parênquima renal (Figura 3). Características histopatológicas comuns entre os parênquimas renais dos cães foram presença de infiltrados linfocíticos, necrose e degeneração tubular e hemorragia (Figura 4).

**Figura 2** – Investigação de leptospiras (lipL32) em diferentes estruturas renais de cães (C20, C29, C51 e C82) com quadro agudo de leptospirose.



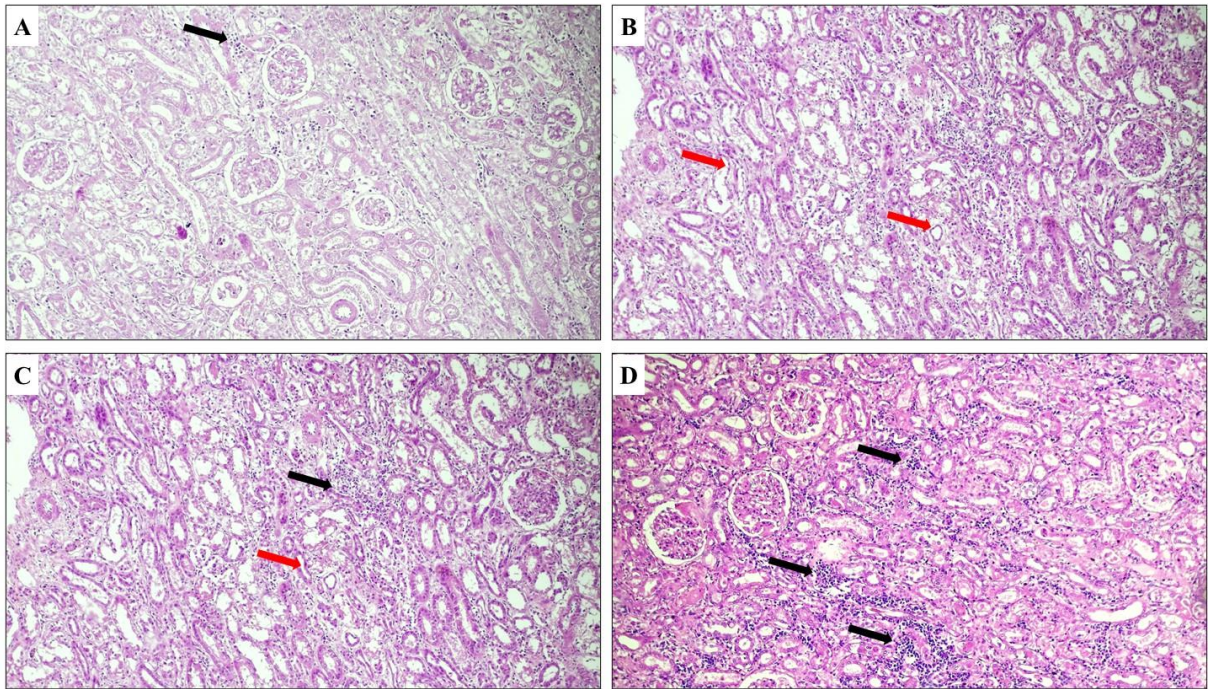
(A) Imunomarcações de leptospiras intactas, visíveis em membrana apical de túbulo proximal (seta), cão C20 - 400x. (B) Imunomarcações em glomérulo renal (seta), cão C20 - 400x. (C) Imunomarcações em túbulos coletores (seta branca) e espaços peritubulares (seta preta), cão C29 - 400 x. (D) Imunomarcações em membrana apical e lúmen tubular (seta), cão C29 - 400x. (E) Imunomarcações em membrana tubular (seta), cão C51 - 400x. (F) Fracasso de imunomarcações de depósitos granulares antigênicos em células tubulares da região cortical (setas), cão C82 - 100x.

**Figura 3** – Comparação de imunomarcações de lipL32 em parênquima renal de cão (C20) e hamsters infectados com *L. interrogans*, com tempo de evolução clínica de 5 dias.



(A) Imunomarcações menos densas (setas) em parênquima renal de cão C20, naturalmente infectado com *L. interrogans* - 400x. (B) Imunomarcações difusas e intensas de lipL32 em parênquima renal de hamster sírio experimentalmente infectado com *L. interrogans* (cepa C20) - 400x.

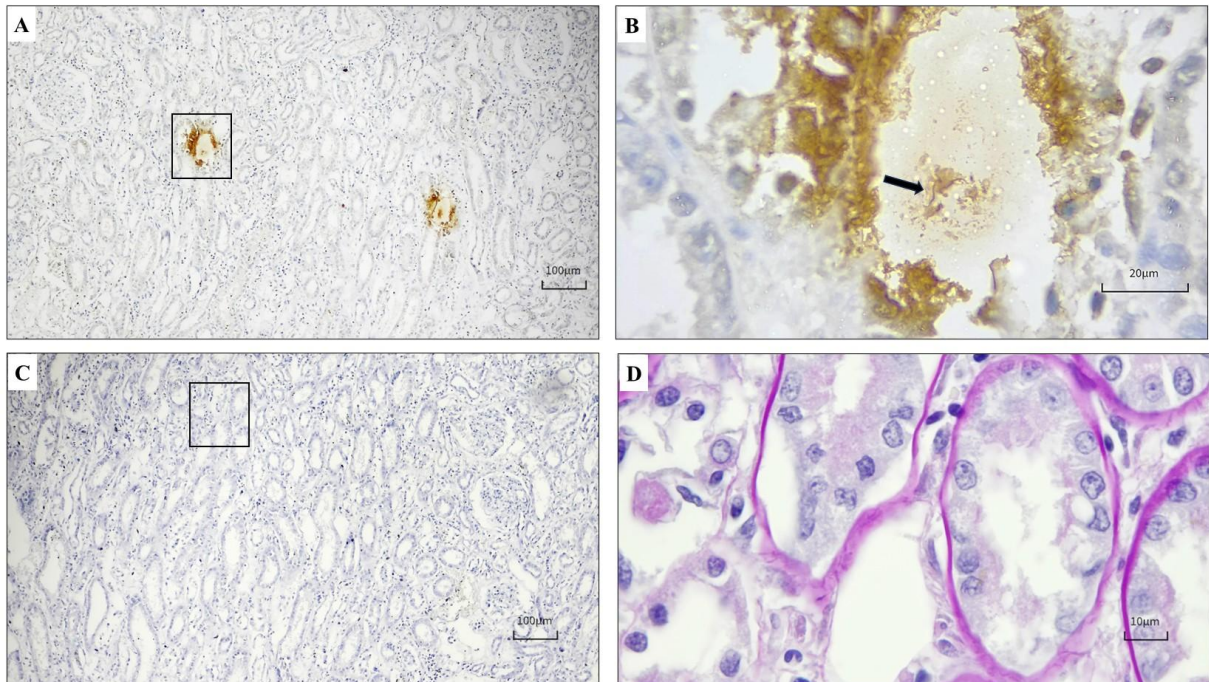
**Figura 4** – Alterações histopatológicas de parênquima renal de cães (C20, C29, C51 e C82) com infecção aguda por *L. interrogans*.



Fotomicrografias evidenciando infiltrados inflamatório mononuclear multifocais (setas pretas) e necrose tubular (setas vermelhas). (A) C20; (B) C29; (C) C51; (D) C82. Coloração HE. Magnificações 100x.

A investigação dos parênquimas renais não revelou a formação de biofilmes maduros através de marcação de substâncias mucoides por AA e PAS (Figuras 5 e 6). No fragmento renal C29 puderam ser observadas fortes marcações na IHQ em paredes tubulares, assim como leptospiras individuais no lúmen (Figuras 5A e 5B), entretanto, AA e PAS não evidenciaram marcações sugestivas de matriz de biofilme (Figuras 5C e 5D).

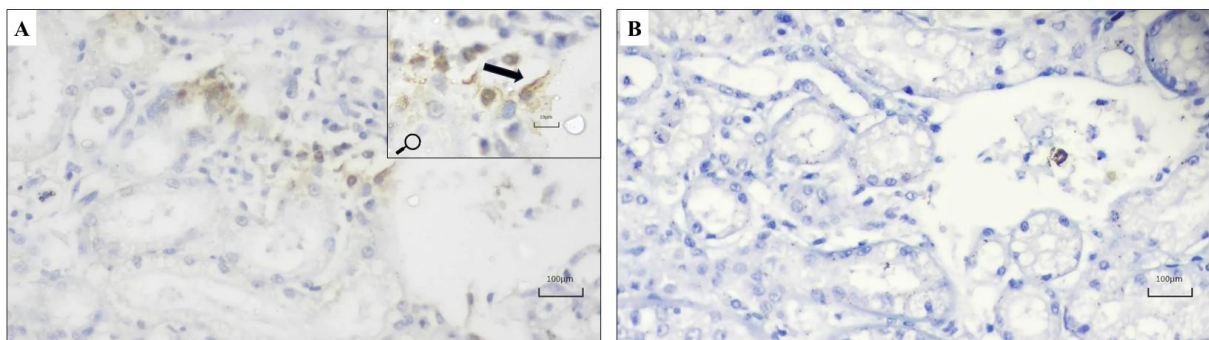
**Figura 5** - Imunomarcção para lipL32 e formação de biofilme em parênquima renal de cão (C29) com quadro agudo de leptospirose.



(A) Túbulos renais de cão C29 positivos para IHQ anti-LipL32 - 100x. (B) Intensa imunomarcção por IHQ em membrana tubular e presença de leptospiros intactas no lúmen (seta preta) – 1000x. (C) Parênquima renal de cão C29 negativo para coloração de AA - 100x. (D) Fotomicrografia de região ampliada, sem evidências de marcação de matriz por PAS - 1000 x.

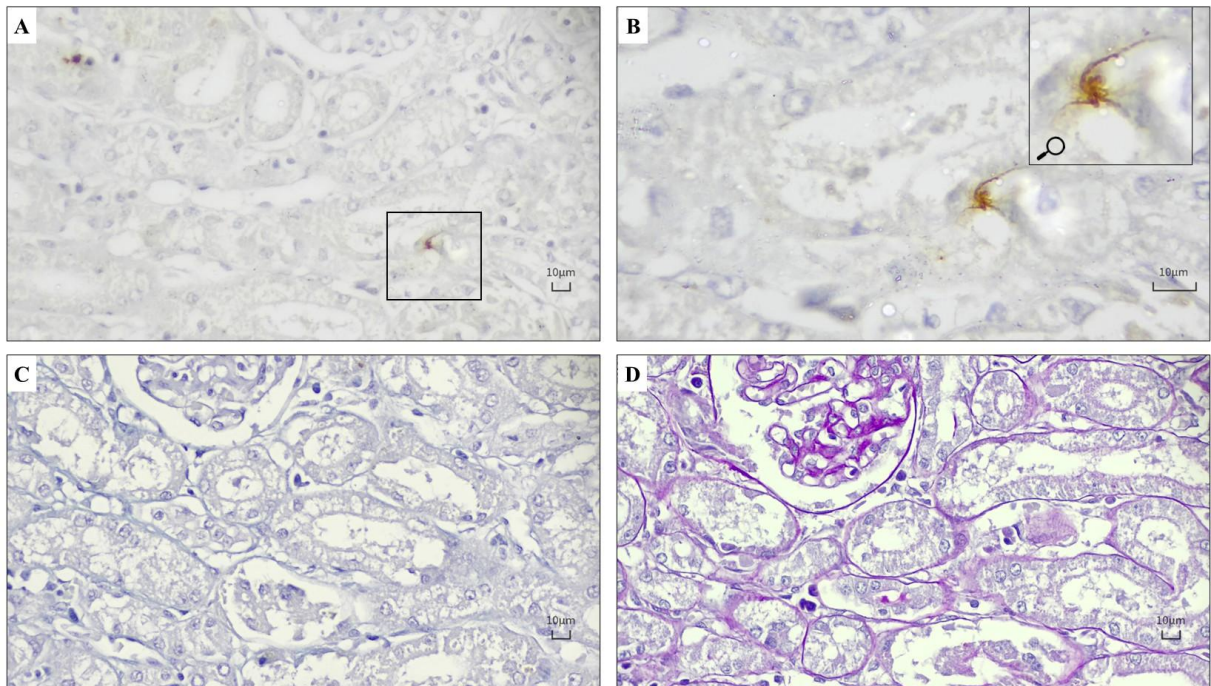
Em marcações de leptospiros individuais (C82) também não foi observada a formação de matriz extracelular, como pode ser notado na Figura 6. Notadamente, apesar da ausência de marcação de matriz de biofilme, foi possível observar agregado bacteriano com característica morfológica de fase inicial de formação de biofilme para a cepa C20 (Figura 7). Entretanto, também sem marcação positiva para as colorações de AA e PAS.

**Figura 6** - Imunomarcção para lipL32 e formação de biofilme em parênquima renal de cão (C82) com quadro agudo de leptospirose.



(A) Parênquima renal de cão C82 positivo para IHQ anti-LipL32 - 400x e 1000x. (B) Parênquima renal de cão C82 negativo para coloração de AA - 400x.

**Figura 7** - Investigação de formação de biofilme por agregado bacteriano e imunomarcação por lipL32 em parênquima renal de cão C20 com infecção aguda por *L. interrogans*, sg Icterohaemorrhagiae.



(A) Túbulos renais de cão C20 positivos para IHQ anti-LipL32 com evidência de agregado bacteriano - 400x. (B) Imunomarcação por IHQ de agregado de *L. interrogans* por C20 - 1000x. (C) Parênquima renal de cão C20 negativo para coloração de AA - 400x. (D) Parênquima renal de cão C20 sem evidências de marcação de matriz por PAS - 4000 x.

Os controles das histotécnicas podem ser observados no Anexo E. Controle positivo para reação de imunohistoquímica anti-LipL32 mostrou leptospiras intactas em parênquima renal de hamster infectado com a cepa C20. Controle negativo da reação não mostrou presença de marcações antigênicas em parênquima renal. Em controles positivos para AA e PAS puderam ser observadas marcações para mucopolissacarídeos em cartilagem de brônquio e membranas tubulares renais.

## 6.2 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *L. INTERROGANS* NAS FORMAS PLANCTÔNICA E BIOFILME

Os ensaios de susceptibilidade antimicrobiana revelaram diferenças entre as formas planctônicas e os biofilmes das cepas testadas de *L. interrogans* (Tabela 2). As CIMs das formas planctônicas indicaram alta susceptibilidade ao p-CA, com valores iguais ou inferiores ao limite mínimo de detecção (0,02 µg/mL), destacado sua eficácia contra essas formas bacterianas. Por outro lado, para os biofilmes tanto de sete quanto de 21 dias, as CIMs do p-CA variaram de 200 a 800 µg/mL, dependendo da cepa e do tempo de crescimento. Comparativamente, as CIMs para a doxiciclina e ciprofloxacina foram uniformemente mais elevadas (800 µg/mL - 1600

$\mu\text{g/mL}$ ) contra biofilmes de sete dias, reforçando o melhor desempenho antimicrobiano do p-CA contra bactérias em biofilmes. Esses resultados indicam uma redução da susceptibilidade ao p-CA em relação às formas planctônicas já em biofilmes com sete dias, sugerindo a maior resistência associada à esta condição.

Nos biofilmes ainda mais maturados (21 dias), as CIMs do p-CA para as cepas C20 e C82 foram de 800  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto para C29 e C51 foram de 400  $\mu\text{g/mL}$ . A maior concentração de p-CA para atividades antibiofilmes de 21 dias reflete também a progressiva resistência metabólica e estrutural das comunidades de *L. interrogans* ao longo do tempo.

Com base no número de diluições seriadas dentro do intervalo de concentrações antimicrobianas testadas neste estudo, as CIMs observadas mostraram que, em comparação com suas formas planctônicas, biofilmes com sete dias de crescimento foram até 14 vezes menos susceptíveis ao p-CA. Enquanto biofilmes com 21 dias foram até 15 vezes menos susceptíveis. A progressão de sete para 21 dias de crescimento, mostrou um aumento de até duas vezes na resistência das bactérias em forma de biofilme ao p-CA.

**Tabela 2** - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) para doxiciclina, ciprofloxacina e ácido p-cumárico frente a biofilmes de *L. interrogans* com diferentes tempos de crescimento e células planctônicas.

Id cepas	Planctônica	Biofilme 7 dias		Biofilme 21 dias	
	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	p-CA	Doxiciclina	Ciprofloxacina	p-CA	p-CA
C20	$\leq 0,02$	800	800	400	800
C29	$\leq 0,02$	1600	800	200	400
C51	$\leq 0,02$	800	800	200	400
C82	$\leq 0,02$	800	800	200	800
CIM <sub>90</sub>	$\leq 0,02$	800	800	200	800

CIM – Concentração inibitória mínima

Os resultados de susceptibilidade cumulativa para todas as cepas são expressos como CIM<sub>90</sub>

### 6.3 DISRUPÇÃO DE BIOFILMES DE *L. INTERROGANS* POR DOXICICLINA, CIPROFLOXACINA E p-CA

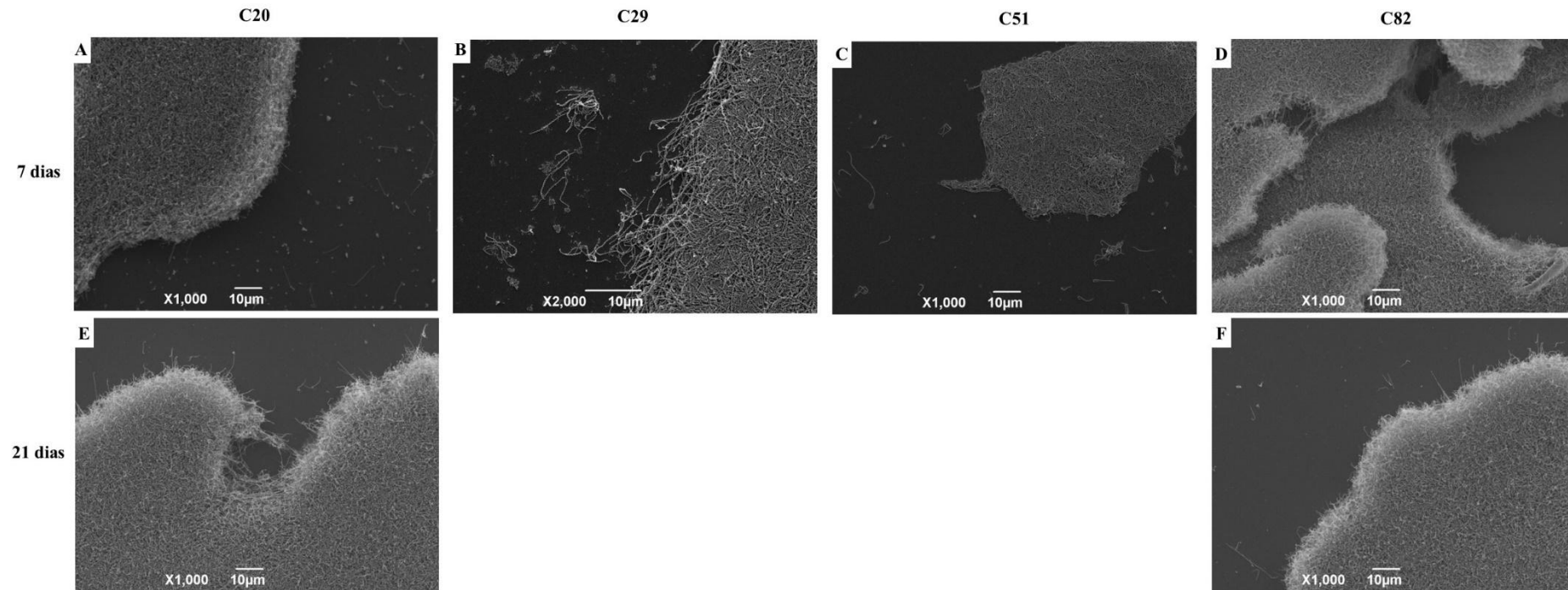
Após formação de biofilmes *in vitro* por cepas autóctones de *L. interrogans* por sete e 21 dias, as imagens de MEV permitiram a avaliação das diferenças nas arquiteturas entre biofilmes maduros intactos e aqueles expostos à doxiciclina, ciprofloxacina e p-CA. As imagens dos controles negativos permitiram a observação de dois aspectos relevantes (Figura 8). O primeiro foi a presença, tanto em biofilmes de sete quanto de 21 dias, de elevadas densidades

celulares, leptospiras envoltas por multicamadas abundantes e bem desenvolvidas de matriz extracelular, cobrindo uniformemente a superfície abiótica da lamínula, caracterizando biofilmes maduros. Ademais, foram observados canais e a presença de filamentos ramificados de matriz extracelular circundando os mesmos. As células bacterianas mantiveram a morfologia típica de *L. interrogans*, formando aglomerados co-aderidos entre si e firmemente aderidos à superfície, o que reforça a estabilidade e complexidade do biofilme mesmo em estágios iniciais.

O segundo aspecto foi presença de variações notáveis na morfologia dos biofilmes formados sob as mesmas condições de incubação entre diferentes cepas. Essas diferenças incluem organização estrutural, densidade celular e características da matriz extracelular. Para os biofilmes de sete dias, as cepas C20 e C82 apresentaram maior densidade de biofilmes mais volumosos e com camadas mais proeminentes (Figuras 8A e 8D). Enquanto C29 e C51 formaram biofilmes organizados em tapetes mais finos (Figuras 8B e 8C).

Destaca-se que, após os ensaios de ruptura, todos os biofilmes, tanto de sete quanto de 21 dias, apresentaram diferentes níveis de danos em suas estruturas e em células bacterianas. Contudo, não foi evidenciada a destruição completa dos biofilmes maduros, observando-se remanescência de agregados celulares e colônias de diferentes tamanhos, assim como manutenção de substância exopolimérica.

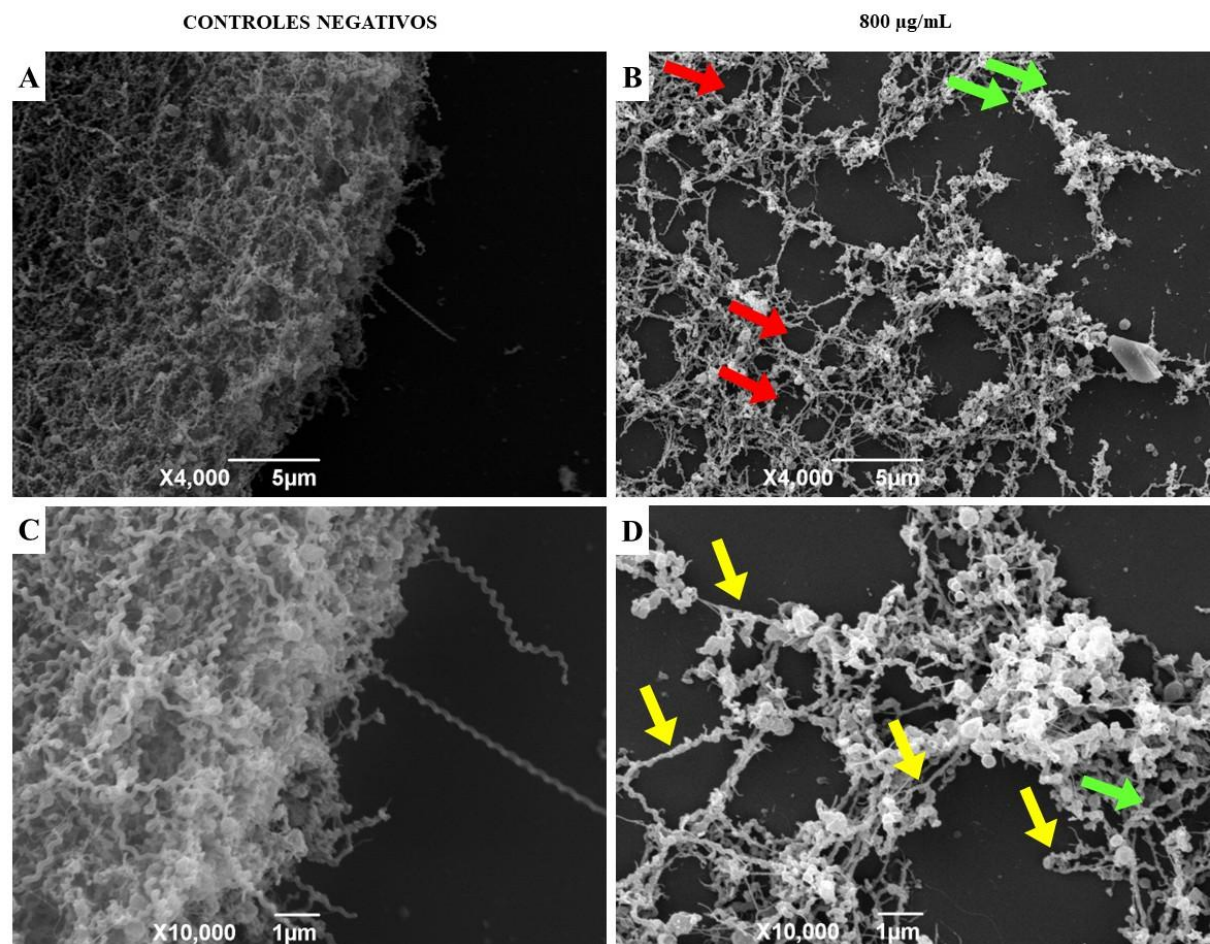
**Figura 8** - Fotomicrografias representativas de Microscopia Eletrônica de Varredura demonstrando biofilmes não tratados de *L. interrogans* (C20, C29, C51 e C82) em diferentes tempos de incubação.



(A) e (E) Biofilmes de *L. interrogans*, cepa C20, com 7 e 21 dias de crescimento, respectivamente. (B) Biofilme de *L. interrogans*, cepa C29, com 7 dias de crescimento. (C) Biofilme de *L. interrogans*, cepa C51 com 7 dias de crescimento. (D) e (F) Biofilmes de *L. interrogans*, cepa C82, com 7 e 21 dias de crescimento, respectivamente.

Nos biofilmes expostos à doxiciclina foram observados efeitos variados, com diferenças notáveis entre as estruturas remanescentes e a morfologia das células bacterianas (Figuras 9 - 12). Na cepa C20 (800  $\mu\text{g/mL}$ ), a incubação com doxiciclina apresentou maior efeito sobre as células bacterianas do que na disrupção da arquitetura do biofilme. Isso resultou na formação de lacunas na estrutura do biofilme, mas ainda com grande quantidade de células aderidas à lamínula. Nas superfícies mais expostas do biofilme, apenas raras leptospiras foram observadas (Figura 9B). A maioria das células apresentou deformação estrutural e morfológica, incluindo a desorganização de sua forma espiralada típica para formas mais estiradas (menos contraídas) e perda de integridade (Figura 9D).

**Figura 9** - Efeitos da doxiciclina em biofilme (cepa C20) de *L. interrogans*: observações estruturais.

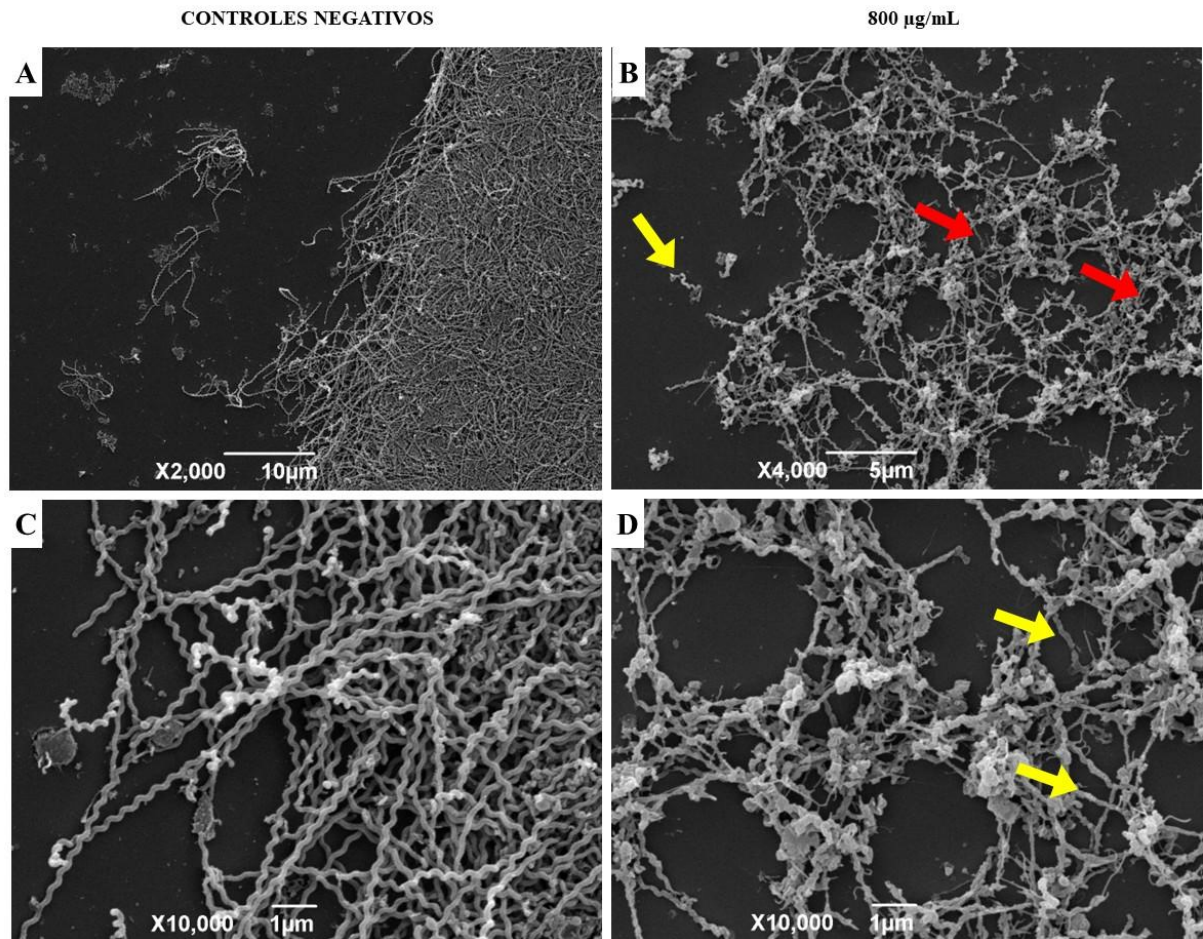


(A) e (C) Biofilmes (7 dias) não tratados de *L. interrogans*, cepa C20. (B) e (D) Biofilmes de *L. interrogans*, cepa C20, tratados com 800  $\mu\text{g/mL}$  de doxiciclina. Setas vermelhas indicam lacunas na matriz extracelular. Setas verdes indicam células bacterianas com manutenção de integridade morfológica. Setas amarelas indicam células bacterianas com perda de integridade e deformação estrutural, como perda de morfologia típica - estiradas.

Na cepa C29 (doxiciclina, 1600  $\mu\text{g/mL}$ ) observaram-se efeitos semelhantes, incluindo regiões descontinuadas na matriz extracelular (Figura 10B) e perda de integridade celular

(Figuras 10B e 10D). Entretanto, divergindo da cepa C20, ainda mantém cepas viáveis não foram observadas leptospiros morfologicamente íntegras em camadas superiores do biofilme tratado, mas sim em camadas mais próximas à lamínula.

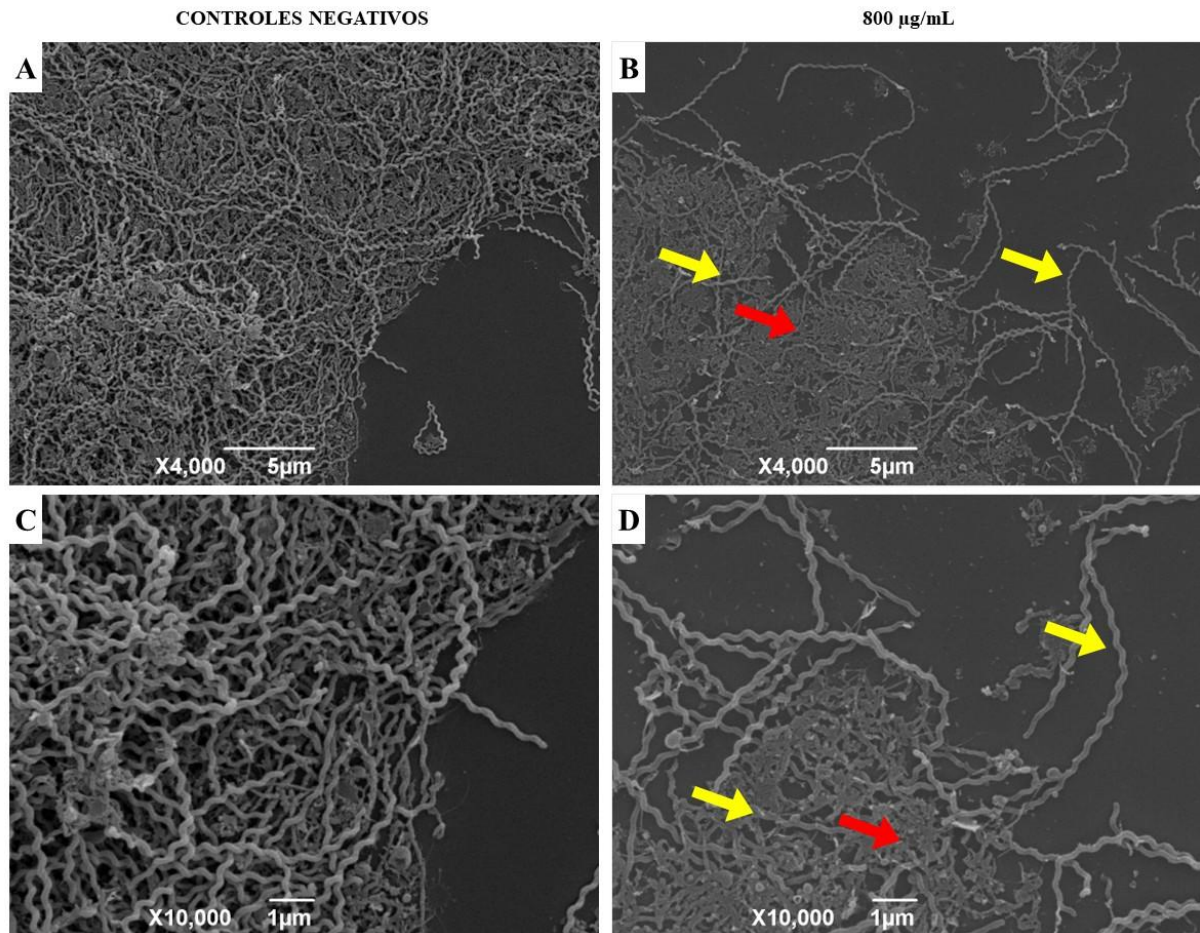
**Figura 10** - Efeitos da doxiciclina em biofilme (cepa C29) de *L. interrogans*: observações estruturais.



(A) e (C) Biofilmes (7 dias) não tratados de *L. interrogans*, cepa C29. (B) e (D) Biofilmes de *L. interrogans*, cepa C29, tratados com 1600 µg/mL de doxiciclina. Setas vermelhas indicam lacunas na matriz extracelular. Setas amarelas indicam células bacterianas com perda de morfologia típica - estiradas ou encolhidas.

O biofilme da cepa C51 (doxiciclina, 800 µg/mL) mostrou manutenção da estrutura tipo tapete aderido à superfície abiótica, mas com redução significativa na densidade celular. As imagens sugerem notável perda das camadas mais superiores do biofilme, embora o tratamento tenha resultado na manutenção de leptospiros com morfologia aparentemente não alterada ao redor e conectadas ao biofilme remanescente (Figuras 11B e 11D).

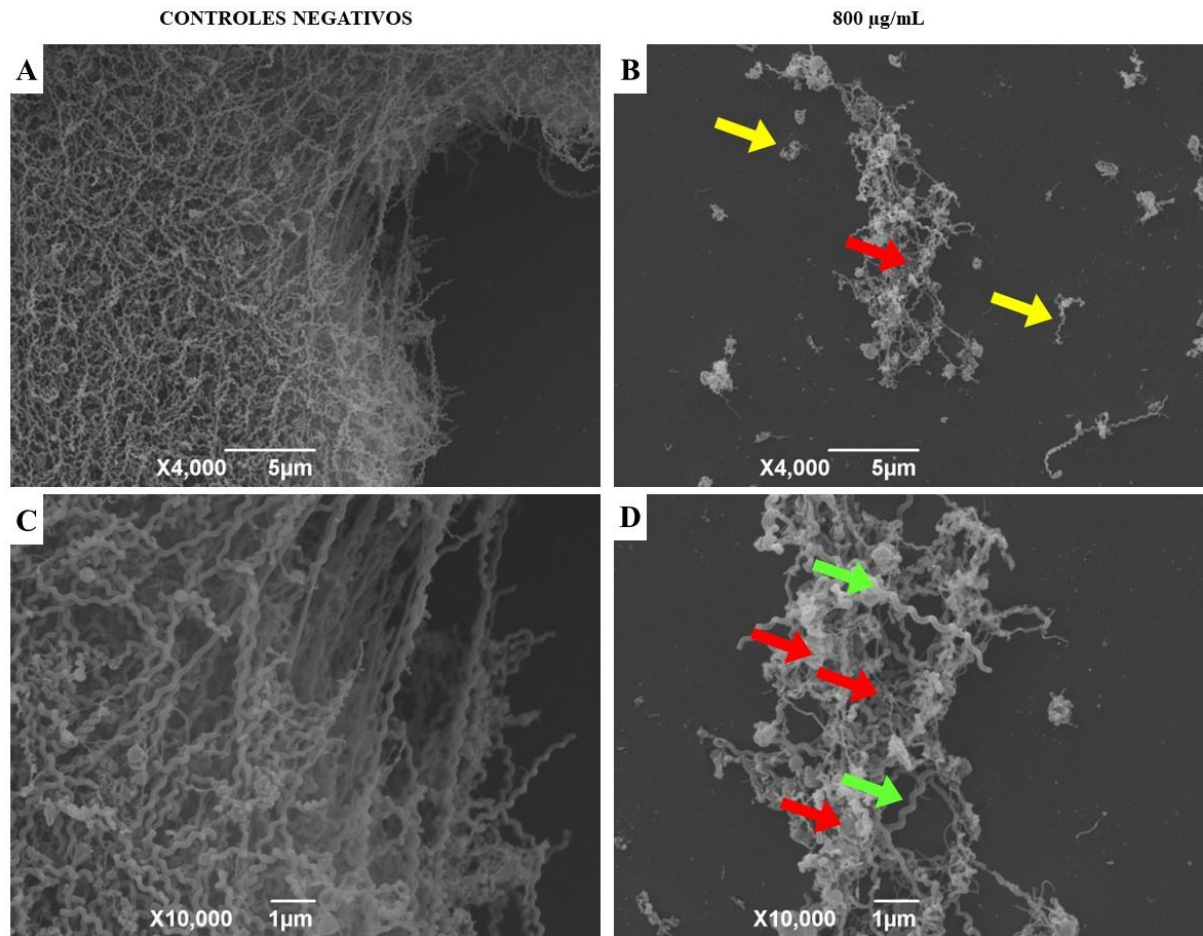
**Figura 11** - Efeitos da doxiciclina em biofilme (cepa C51) de *L. interrogans*: observações estruturais.



(A) e (C) Biofilmes (7 dias) não tratados de *L. interrogans*, cepa C51. (B) e (D) Biofilmes de *L. interrogans*, cepa C51, tratados com 800 µg/mL de doxiciclina. Setas vermelhas indicam manutenção de tapete de matriz extracelular, com perda de camadas superiores do biofilme. Setas amarelas indicam células bacterianas com manutenção de integridade.

Por fim, após exposição do biofilme da cepa C82 (800 µg/mL), cujo controle negativo era bastante espesso, foi observada significativa ruptura estrutural. Entretanto, observaram-se colônias densas, caracterizadas pela presença de remanescentes de matriz extracelular conectando as leptospiros. Adicionalmente, foram detectadas bactérias de morfologia mais encolhida e de aparência irregular (Figura 12B). As Figuras 12B e 12D também mostram, nessa cepa, uma maior manutenção de células bacterianas íntegras, em comparação às cepas C20 e C29, indicando uma maior resiliência estrutural do biofilme em relação aos efeitos da doxiciclina.

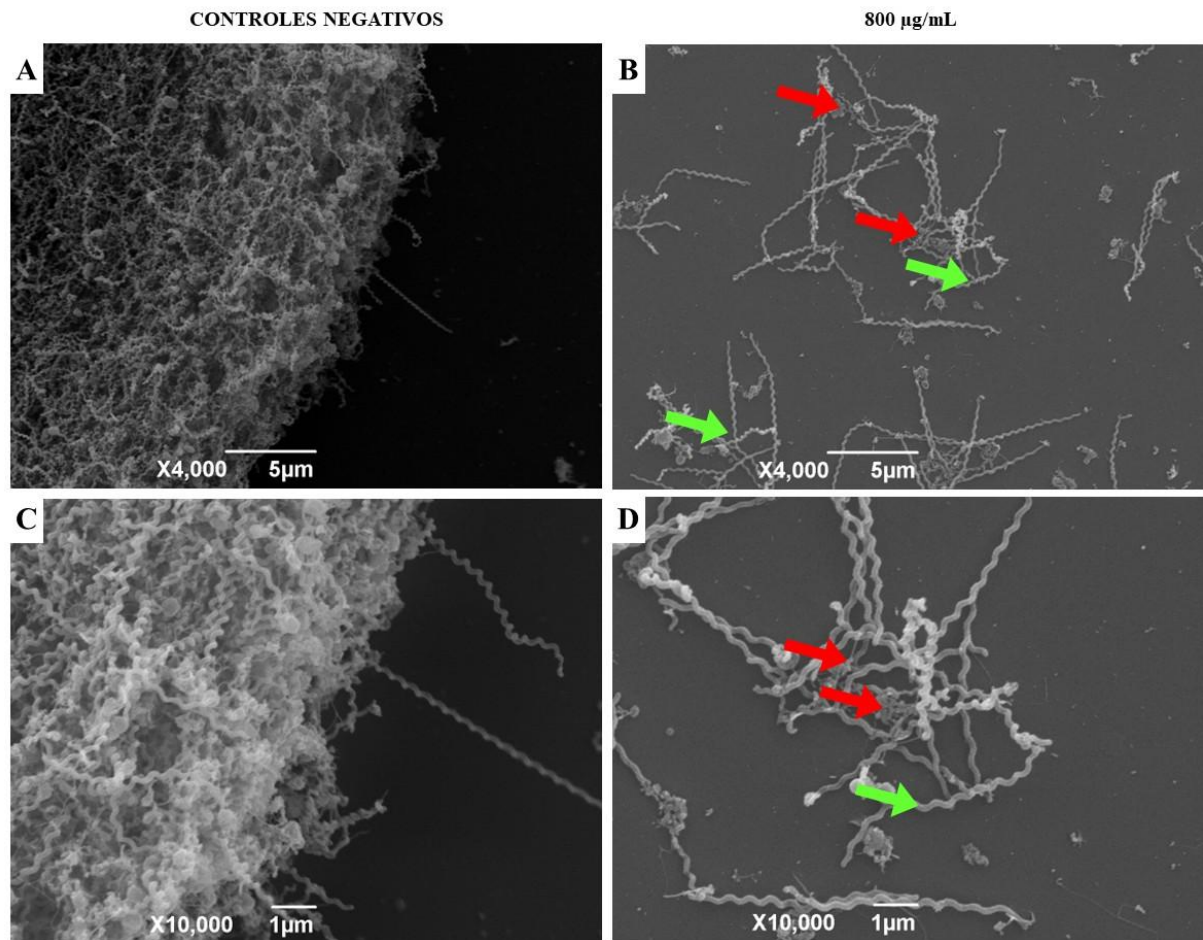
**Figura 12** - Efeitos da doxiciclina em biofilme (cepa C82) de *L. interrogans*: observações estruturais.



(A) e (C) Biofilmes (7 dias) não tratados de *L. interrogans*, cepa C82. (B) e (D) Biofilmes de *L. interrogans*, cepa C82, tratados com 800 µg/mL de doxiciclina, Setas vermelhas indicam presença de matriz extracelular abundante. Setas verdes indicam células bacterianas com manutenção de integridade. Setas amarelas indicam células bacterianas com perda de morfologia típica - encolhidas.

Os efeitos da ciprofloxacina em biofilmes de sete dias podem ser observados nas Figuras 13, 14, 15 e 16. Para a cepa C20, a exposição à ciprofloxacina (800 µg/mL) resultou em significativa disrupção da estrutura do biofilme, de maior intensidade se comparada ao uso da doxiciclina. Foram observadas células bacterianas mais esparsas na superfície da lamínula, circundadas por menores quantidades de matriz, organizadas em pequenos agregados conectados por filamentos de matriz e células individuais. Apesar da dispersão estrutural, a maioria das leptospiras agregadas manteve uma superfície regular e lisa, sem sinais de danos graves (Figuras 13B e 13D).

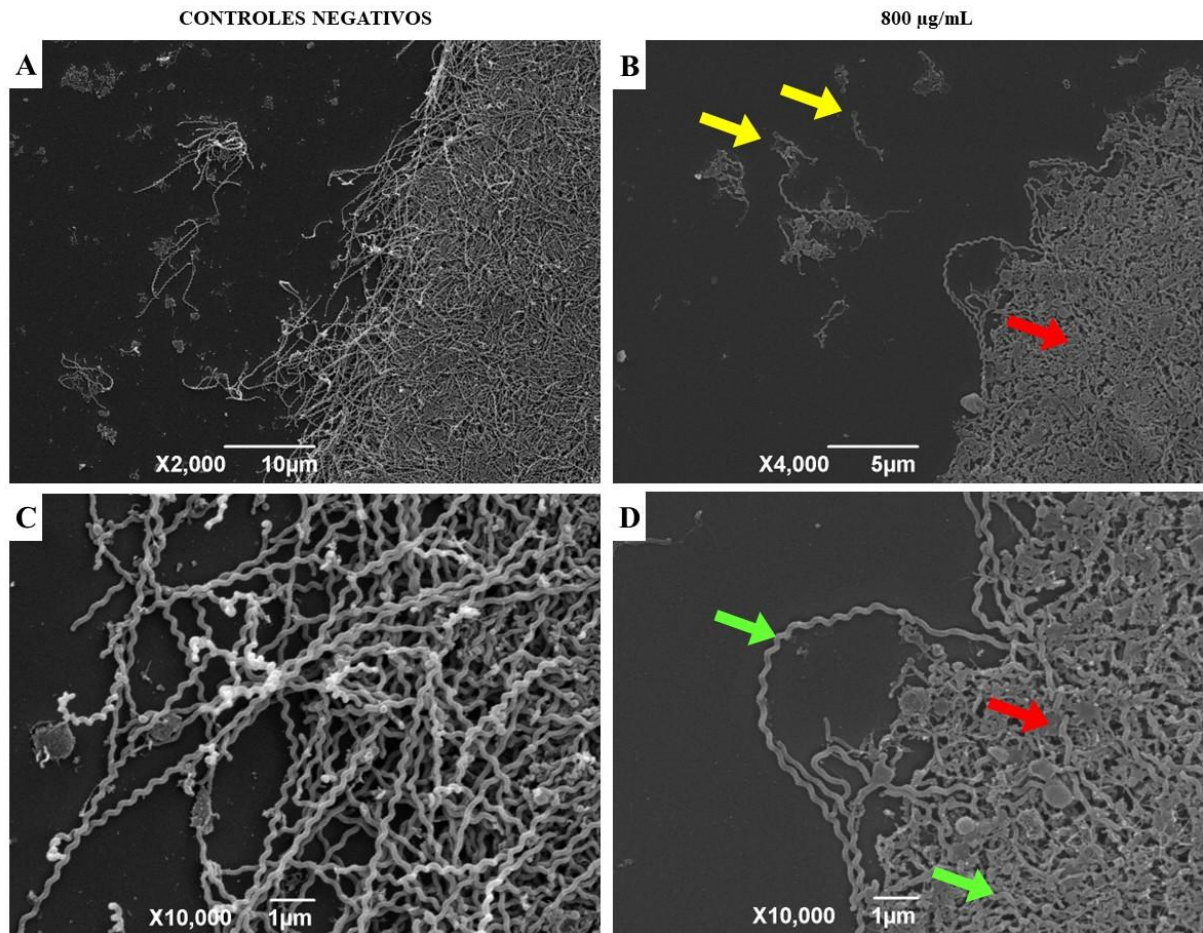
**Figura 13** - Efeitos da ciprofloxacina em biofilme (cepa C20) de *L. interrogans*: observações estruturais.



(A) e (C) Biofilmes (7 dias) não tratados de *L. interrogans*, cepa C20. (B) e (D) Biofilmes de *L. interrogans*, cepa C20, tratados com 800 µg/mL de ciprofloxacina. Setas vermelhas indicam presença de matriz extracelular conectando agregados de células bacterianas. Setas verdes indicam células bacterianas com manutenção de integridade morfológica.

Em contraste à doxiciclina, a exposição do biofilme da cepa C29 à ciprofloxacina (800 µg/mL), embora em menor concentração, resultou na permanência de extensas quantidades de matriz depositadas na camada externa (Figuras 14B e 14D). Notadamente, houve redução na densidade celular em camadas superiores, em comparação ao controle negativo. De modo bastante similar ao tratamento da cepa C51 com mesma concentração de doxiciclina, puderam ser observadas leptospiiras íntegras conectadas ao biofilme remanescente e em camadas mais internas (Figura 14D). No entanto, algumas células não aderidas ao biofilme apresentaram sinais de danos, assim como células e matriz nas camadas mais superficiais do biofilme (Figura 14B e 14D).

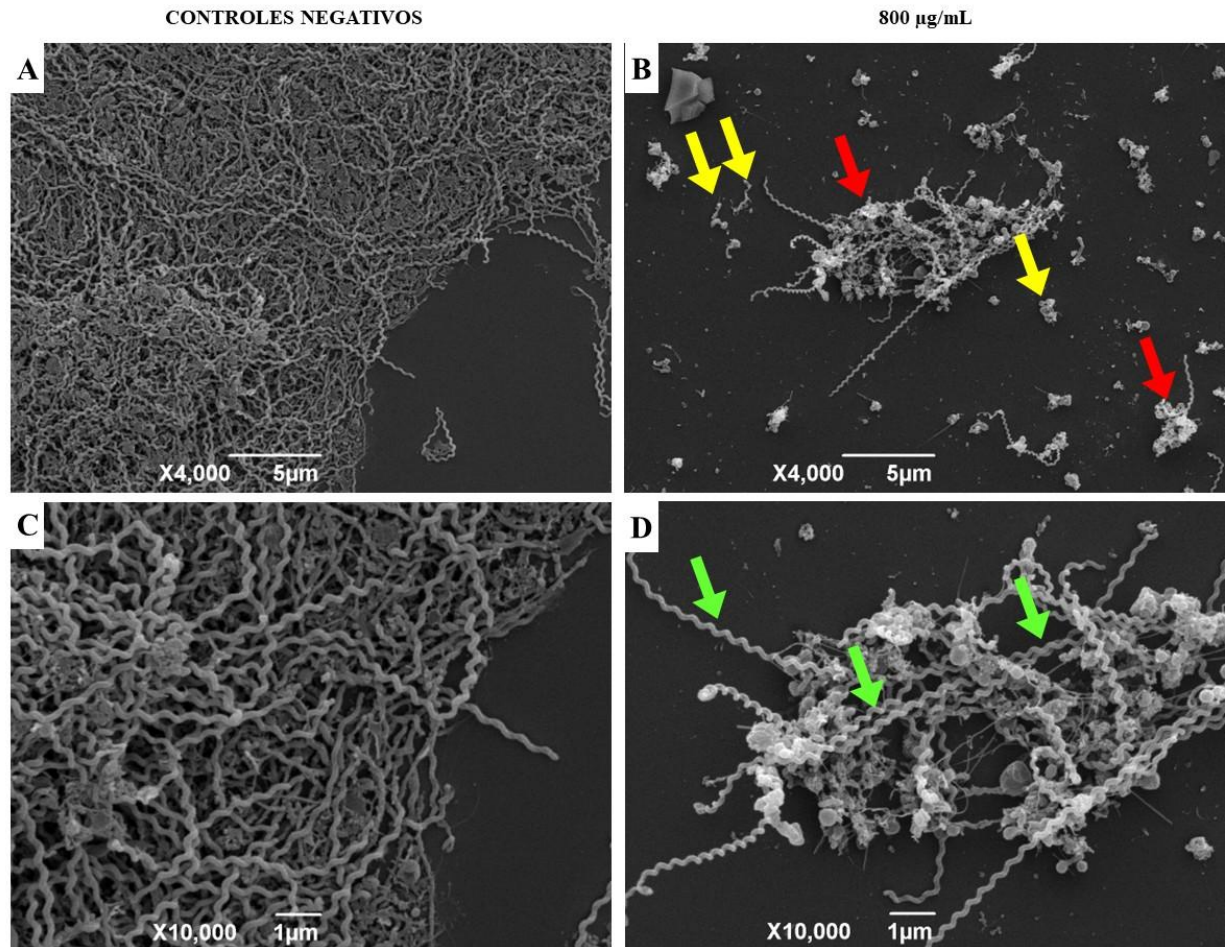
**Figura 14** - Efeitos da ciprofloxacina em biofilme (cepa C29) de *L. interrogans*: observações estruturais.



(A) e (C) Biofilmes (7 dias) não tratados de *L. interrogans*, cepa C29. (B) e (D) Biofilmes de *L. interrogans*, cepa C29, tratados com 800 µg/mL de ciprofloxacina. Setas vermelhas indicam manutenção de tapete de matriz extracelular, com perda de camadas superiores do biofilme. Setas verdes indicam células bacterianas com manutenção de integridade. Setas amarelas indicam células bacterianas com perda de integridade morfológica.

Na cepa C51, a exposição à ciprofloxacina (800 µg/mL) resultou na disrupção da estrutura madura do biofilme, evidenciada pela ausência de tapete cobrindo a superfície abiótica. A ação antibacteriana do antimicrobiano pode ser claramente observada pela presença de diversas bactérias isoladas e dispersas, com perda de integridade e morfologia (Figura 15B). Entretanto, foram preservadas colônias e agregados compostos principalmente por células morfológicamente intactas conectadas por matriz filamentosa (Figura 15D).

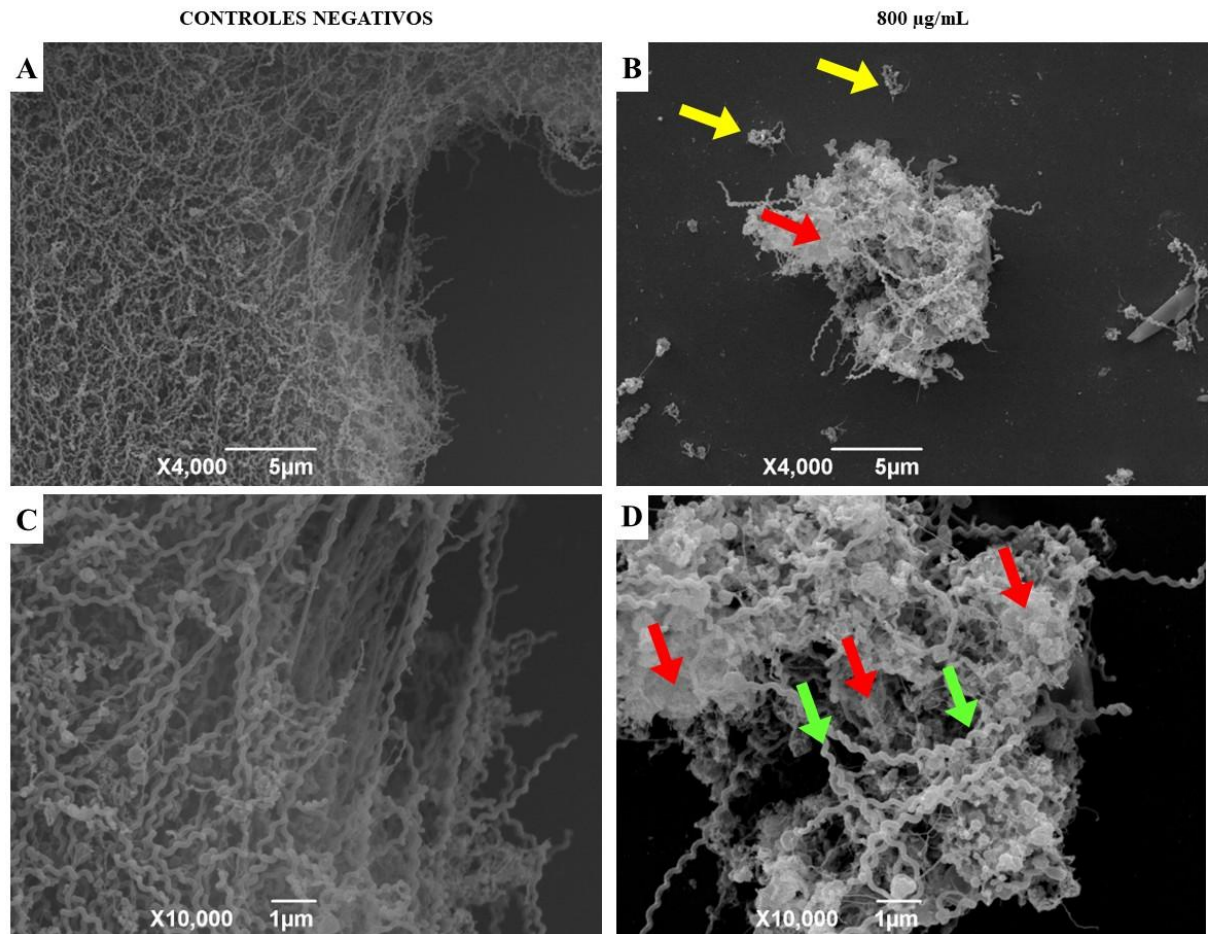
**Figura 15** - Efeitos da ciprofloxacina em biofilme (cepa C51) de *L. interrogans*: observações estruturais.



(A) e (C) Biofilmes (7 dias) não tratados de *L. interrogans*, cepa C51. (B) e (D) Biofilmes de *L. interrogans*, cepa C51, tratados com 800 µg/mL de ciprofloxacina. Setas vermelhas indicam manutenção de colônias e agregados celulares com presença de matriz extracelular. Setas verdes indicam células bacterianas com manutenção de integridade. Setas amarelas indicam células bacterianas com perda de integridade morfológica.

Assim como sua exposição à doxiciclina (em mesma concentração), a incubação do biofilme da cepa C82 com ciprofloxacina (800 µg/mL) resultou em disrupção da estrutura geral do biofilme, porém, houve manutenção de grandes colônias de células bacterianas íntegras interconectadas por abundante deposição de matriz extracelular (Figuras 16B e 16D). Ademais, poucos agregados caracterizados por leptospiiras deformadas foram encontrados aderidos à superfície da lamínula (Figura 16B).

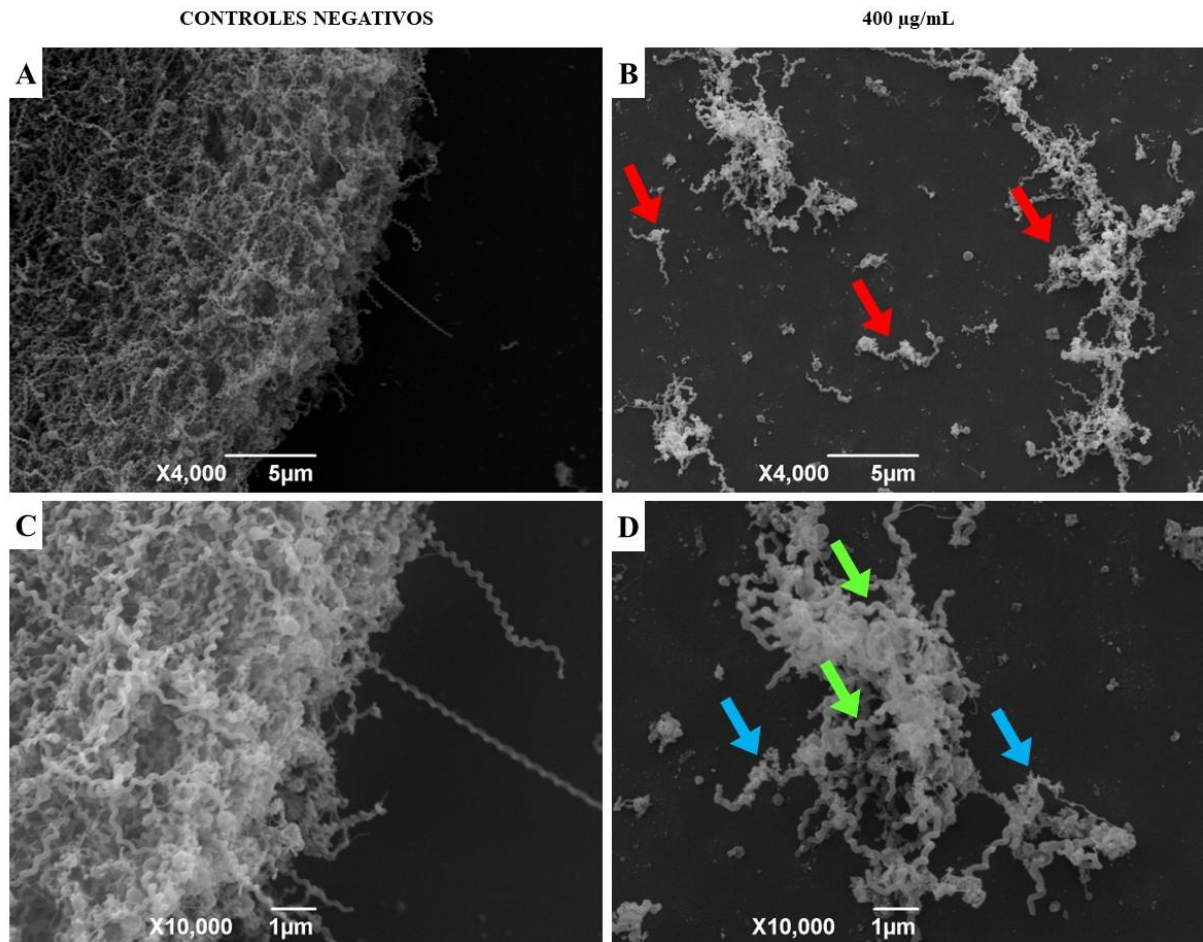
**Figura 16** - Efeitos da ciprofloxacina em biofilme (cepa C82) de *L. interrogans*: observações estruturais.



(A) e (C) Biofilmes (7 dias) não tratados de *L. interrogans*, cepa C82. (B) e (D) Biofilmes de *L. interrogans*, cepa C82, tratados com 800 µg/mL de ciprofloxacina. Setas vermelhas indicam manutenção de colônias celulares com abundante presença de matriz extracelular. Setas verdes indicam células bacterianas com manutenção de integridade. Setas amarelas indicam células bacterianas com perda de integridade morfológica.

Como apresentado na Figura 17, após a exposição do biofilme de sete dias da cepa C20 ao p-CA (400 µg/mL), a disrupção se caracterizou pela presença de menor densidade celular no biofilme exposto, porém, acompanhada de colônias celulares de diferentes tamanhos ainda aderidas à superfície da lamínula (Figura 17B). A exposição ao ácido também demonstrou manutenção de células morfológicamente intactas, muitas vezes acompanhadas pelo acúmulo de material granular depositado (Figura 17D).

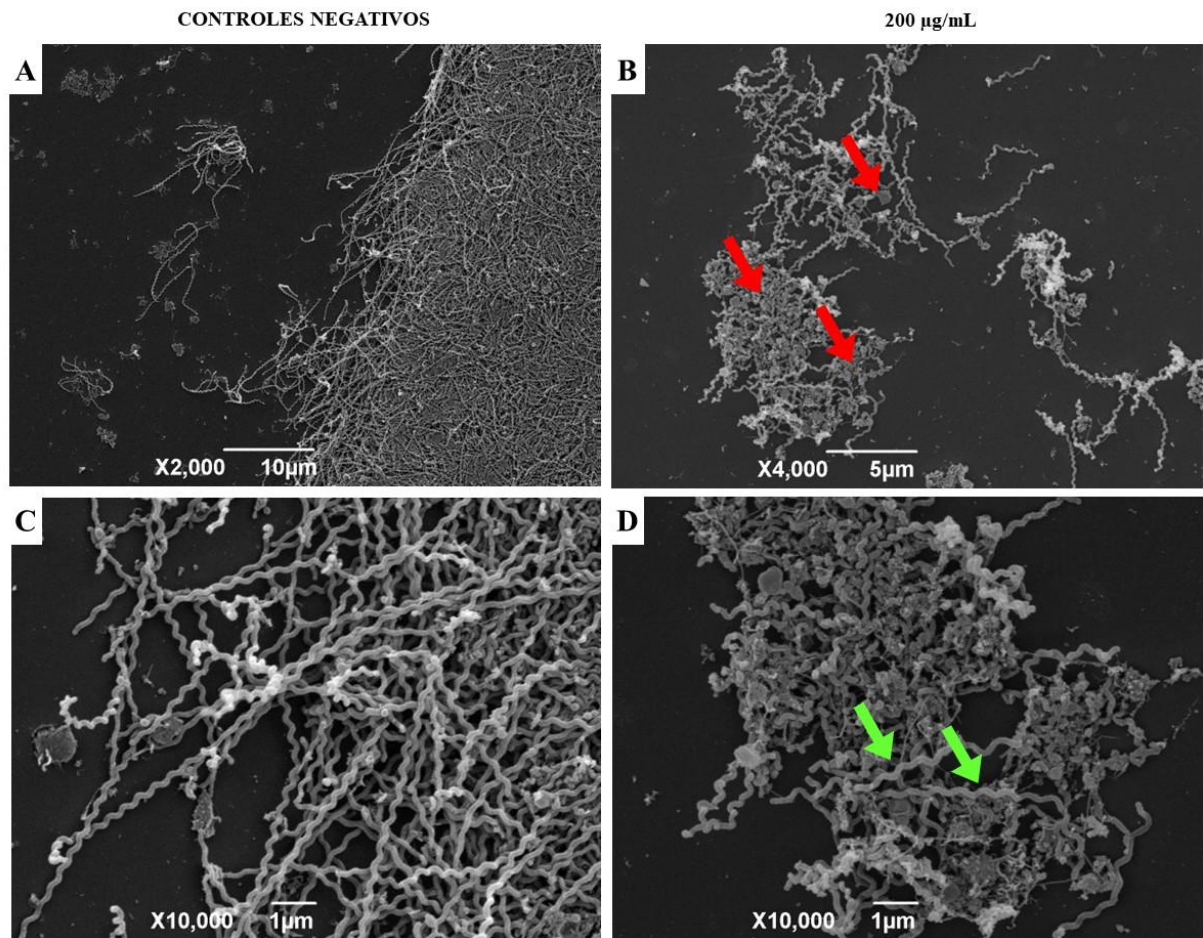
**Figura 17** - Efeitos do ácido p-cumárico em biofilme (cepa C20) de *L. interrogans*: observações estruturais.



(A) e (C) Biofilmes (7 dias) não tratados de *L. interrogans*, cepa C20. (B) e (D) Biofilmes de *L. interrogans*, cepa C20, tratados com 400 µg/mL de ácido p-cumárico. Setas vermelhas indicam manutenção de colônias celulares de diferentes tamanhos com presença de matriz extracelular. Setas verdes indicam células bacterianas com manutenção de integridade. Setas azuis indicam deposição de material granular.

A exposição do biofilme de sete dias da cepa C29 ao p-CA (200 µg/mL) apresentou características semelhantes tanto à doxíciclina quanto à ciprofloxacina, em especial a manutenção de colônias bacterianas com alta densidade de matriz e deposição de material granular (Figura 18B e 18 D). Entretanto, ao contrário da ciprofloxacina, o p-CA pareceu ter maior efeito na disrupção do tapete aderido à lamínula. Em comparação à doxíciclina, a exposição ao ácido resultou em maiores quantidades de células morfologicamente não danificadas (Figura 18D).

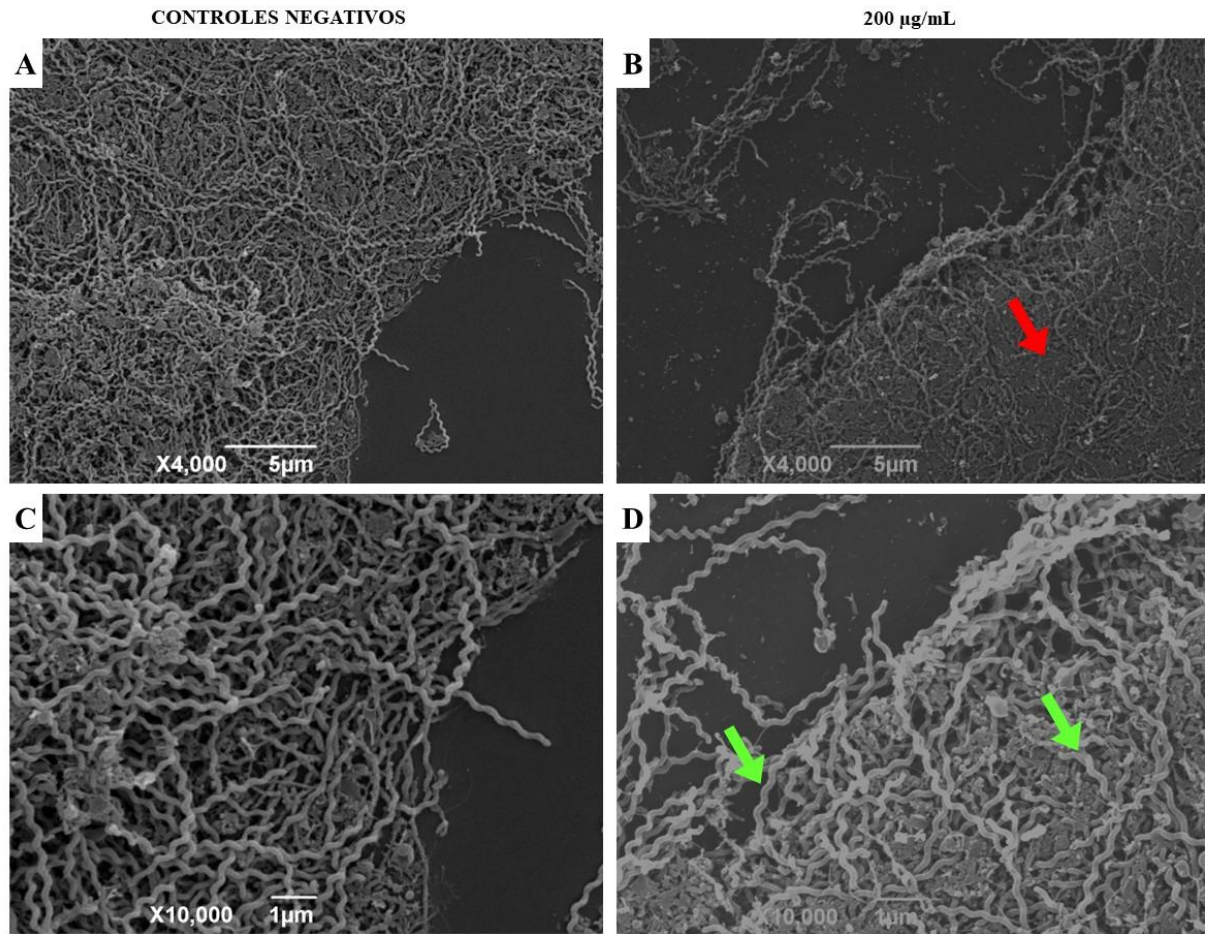
**Figura 18** - Efeitos do ácido p-cumárico em biofilme (cepa C29) de *L. interrogans*: observações estruturais.



(A) e (C) Biofilmes (7 dias) não tratados de *L. interrogans*, cepa C29. (B) e (D) Biofilmes de *L. interrogans*, cepa C29, tratados com 200 µg/mL de ácido p-cumárico. Setas vermelhas indicam manutenção de colônias celulares com presença de matriz extracelular. Setas verdes indicam células bacterianas com manutenção de integridade.

Na cepa C51 (200 µg/mL), a exposição ao p-CA mostrou mais semelhanças ao efeito da doxíciclina na disrupção do biofilme, caracterizando-se por uma maior manutenção da estrutura do biofilme em forma de tapete aderido e redução na densidade do biofilme (Figura 19B). Observou-se também a presença de material de aspecto granular. As células bacterianas, tanto individuais quanto agregadas ao biofilme, mantiveram uma morfologia mais próxima à observada no controle negativo, tanto nas camadas mais superficiais quanto nas mais profundas do biofilme (Figura 19D).

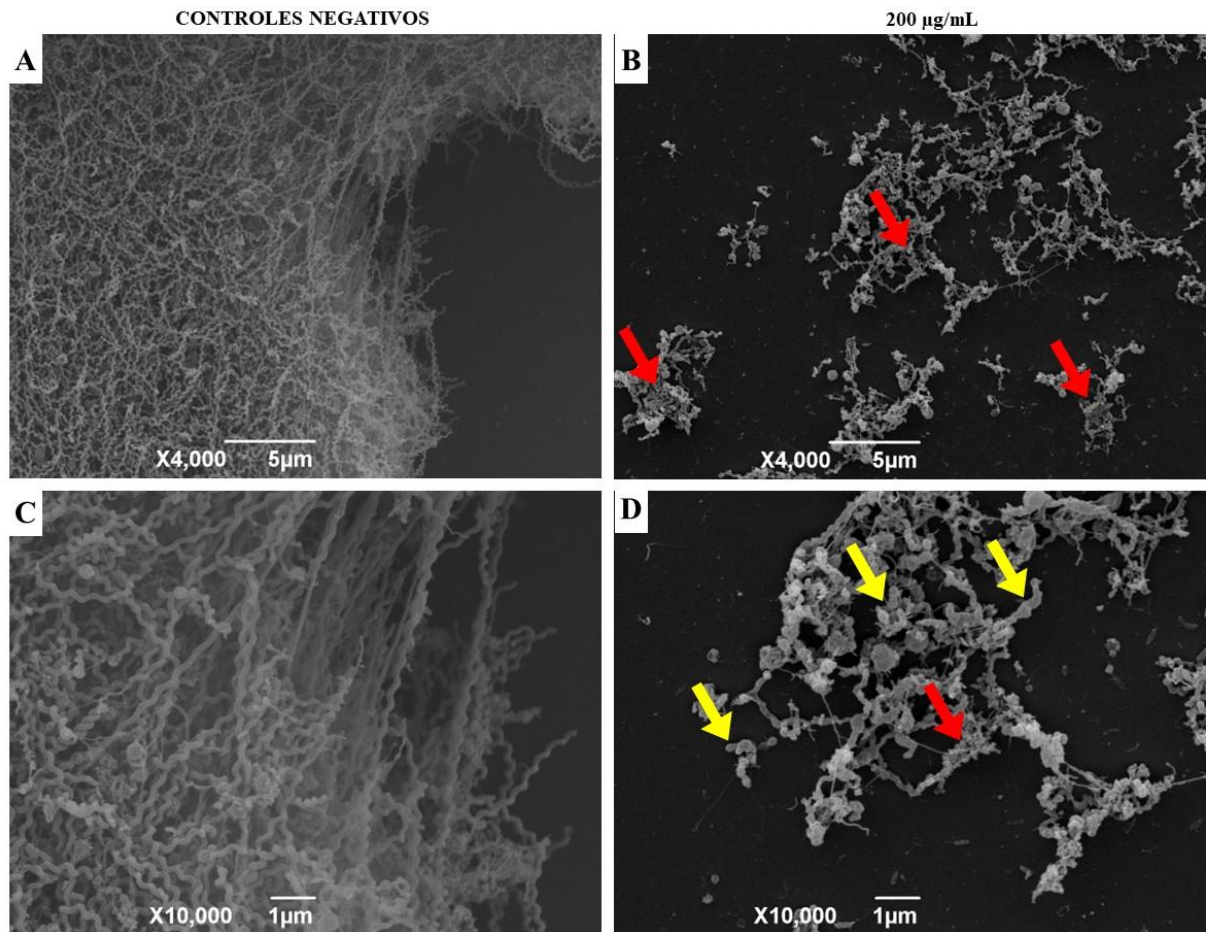
**Figura 19** - Efeitos do ácido p-cumárico em biofilme (cepa C51) de *L. interrogans*: observações estruturais.



(A) e (C) Biofilmes (7 dias) não tratados de *L. interrogans*, cepa C51. (B) e (D) Biofilmes de *L. interrogans*, cepa C51, tratados com 200 µg/mL de ácido p-cumárico. Setas vermelhas indicam manutenção de tapete de matriz extracelular, com perda de camadas superiores do biofilme. Setas verdes indicam células bacterianas com manutenção de integridade.

Em contrapartida, a exposição do biofilme da cepa C82 (200 µg/mL), apresentou intensa disrupção do biofilme, que, em comparação ao controle negativo, apresentou acentuada redução do número de células intactas e agregadas. A pouca matriz extracelular observada apresentou deposição de material granular (Figura 20B). Observou-se também acentuada decomposição celular bacteriana (Figura 20D).

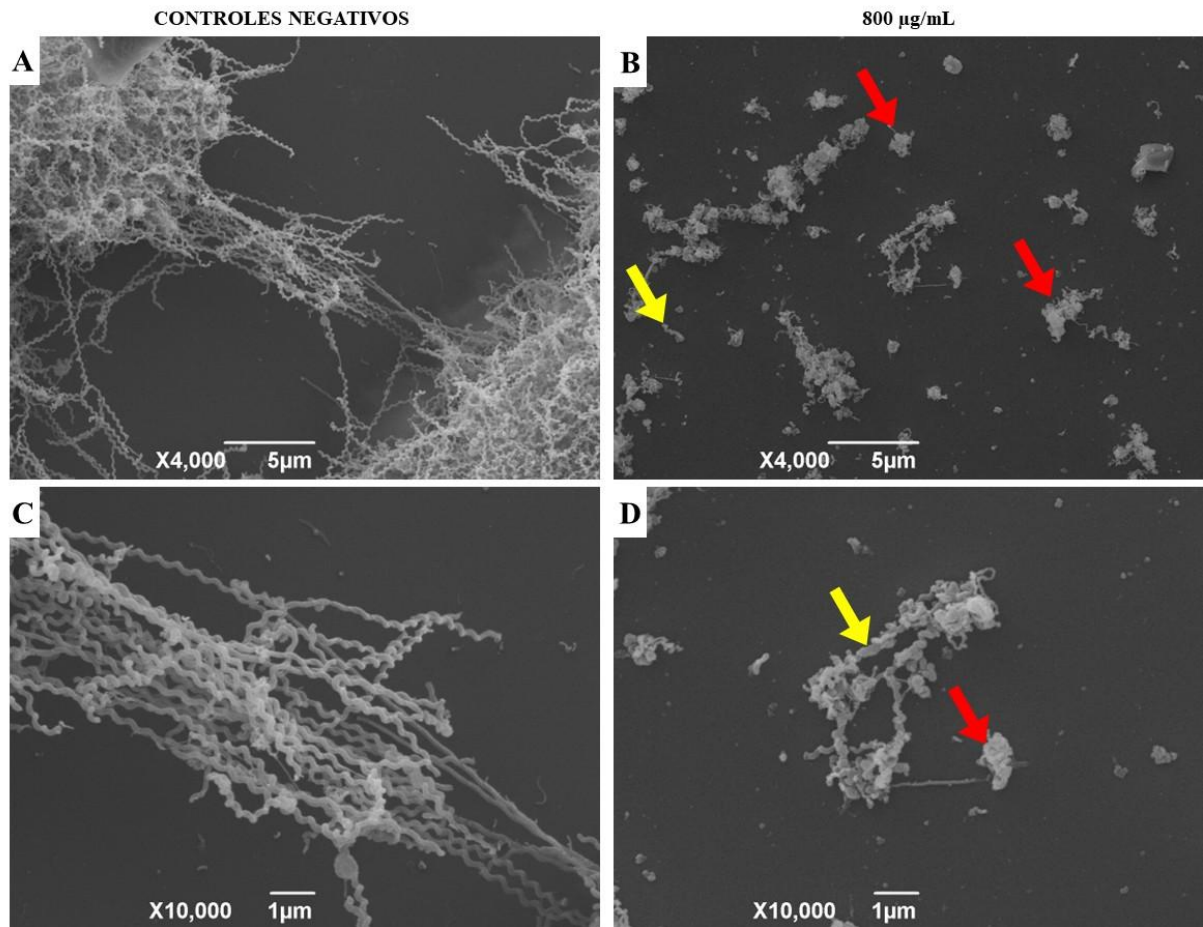
**Figura 20** - Efeitos do ácido p-cumárico em biofilme (cepa C82) de *L. interrogans*: observações estruturais.



(A) e (C) Biofilmes (7 dias) não tratados de *L. interrogans*, cepa C82. (B) e (D) Biofilmes de *L. interrogans*, cepa C82, tratados com 200 µg/mL de ácido p-cumárico. Setas vermelhas indicam deformação na matriz extracelular. Setas amarelas indicam células bacterianas com perda de integridade e deformação estrutural.

A exposição do biofilme de 21 dias da cepa C20 ao p-CA (800 µg/mL) resultou em intensa ruptura da estrutura do biofilme, com a presença de pequenas colônias e agregados de células com aparência espiralada mais acentuada e com substância exopolimérica aderida (Figura 21B). Adicionalmente, foram observadas deformações estruturais na maioria das células bacterianas dentro e fora dos agregados (Figuras 21B e 21D). Assim como nos biofilmes de sete dias, a exposição ao p-CA também resultou na deposição de material granular.

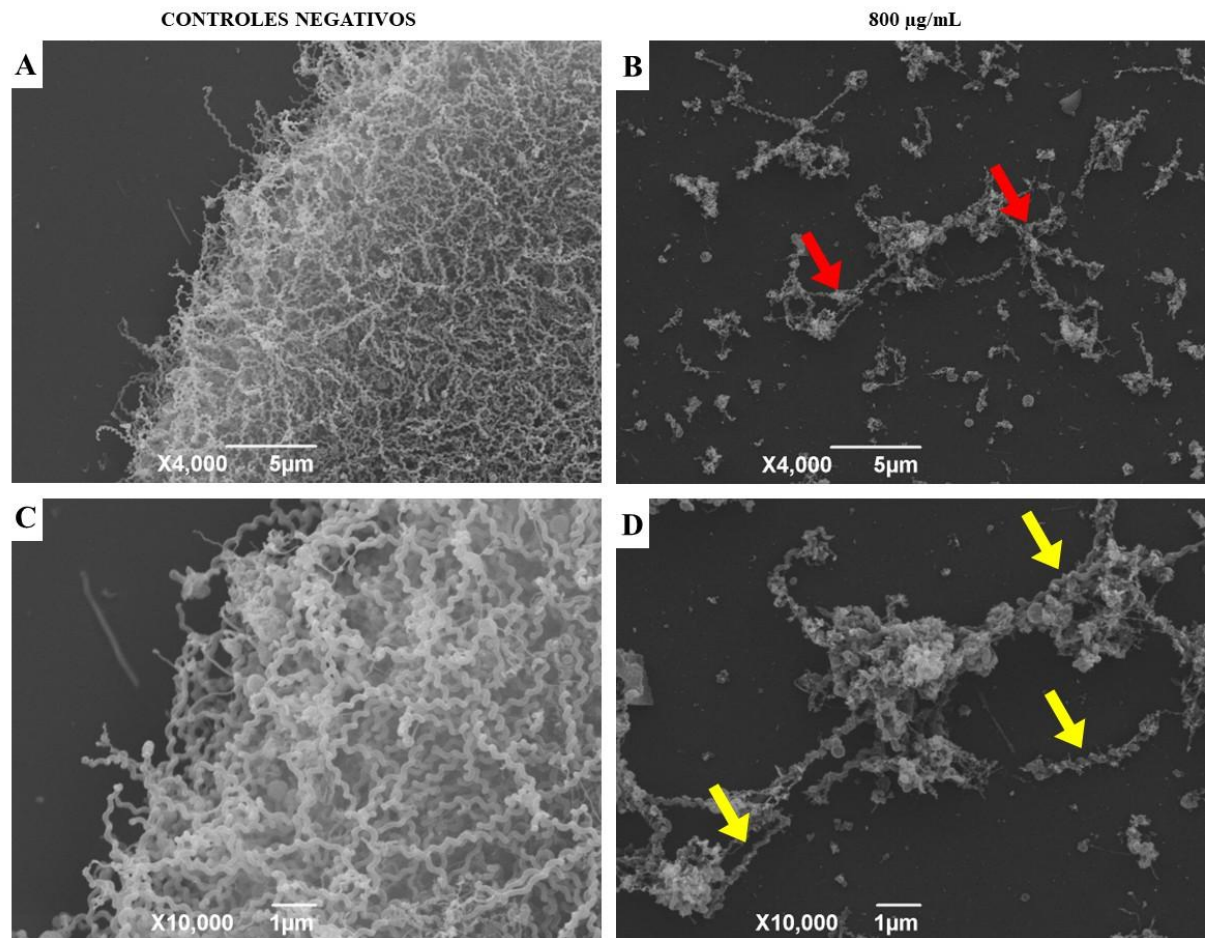
**Figura 21** - Efeitos do ácido p-cumárico em biofilme (cepa C20) de *L. interrogans*: observações estruturais.



(A) e (C) Biofilmes (21 dias) não tratados de *L. interrogans*, cepa C20. (B) e (D) Biofilmes de *L. interrogans*, cepa C20, tratados com 800 µg/mL de ácido p-cumárico. Setas vermelhas indicam agregados de células bacterianas com acentuação na forma helicoidal, acompanhadas por deposição de substância exopolimérica. Setas amarelas indicam células bacterianas com perda de integridade.

Para a cepa C82, o p-CA (800 µg/mL) mostrou efeitos semelhantes aos inferidos ao biofilme de 21 dias da cepa C20, com considerável disrupção do biofilme maduro, mesmo que possam ser observadas colônias remanescentes compostas por matriz extracelular menos densa (Figura 22B). Entretanto, assim como nos tratamentos anteriores com o p-CA, as colônias são compostas por células bacterianas caracterizadas por intensa deposição de material granular e perda de integridade (Figura 22D).

**Figura 22** - Efeitos do ácido p-cumárico em biofilme (cepa C82) de *L. interrogans*: observações estruturais.



(A) e (C) Biofilmes (21 dias) não tratados de *L. interrogans*, cepa C82. (B) e (D) Biofilmes de *L. interrogans*, cepa C82, tratados com 800 µg/mL de ácido p-cumárico. Setas vermelhas indicam deformação na matriz extracelular. Setas amarelas indicam células bacterianas com perda de integridade.

Todos os experimentos realizados evidenciaram variáveis intensidades de disrupção dos biofilmes e danos às células bacterianas, não demonstrando um padrão consistente detectável no modo de ação anti-biofilme dos tratamentos estudados (ANEXO F). As respostas variaram de acordo com as diferentes cepas e os tipos de tratamentos, refletindo a complexidade das interações entre os agentes antimicrobianos e os biofilmes de *L. interrogans*.

Apesar da heterogeneidade nas ações, alguns resultados se destacam (Tabela 3). O p-CA demonstrou efeito antibacteriano superior à doxiciclina e à ciprofloxacina, mas sua capacidade disruptiva em biofilmes de sete dias não diferiu na arquitetura. Nessa condição, a ciprofloxacina promoveu maior disrupção em três das quatro cepas testadas, enquanto o p-CA e a doxiciclina tiveram esse efeito em duas e uma cepa, respectivamente. O p-CA também demonstrou boa ação disruptiva nas cepas C20 e C82, inclusive em biofilmes de 21, nos quais sua exposição pareceu resultar em menor manutenção de agregados complexos. Entretanto, deve-se considerar que para 21 dias os biofilmes foram expostos a doses maiores do ácido.

**Tabela 3** - Principais achados na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de biofilmes de *L. interrogans* (7 e 21 dias) após exposição à agentes antimicrobianos (doxiciclina, ciprofloxacina e p-CA).

Achados de MEV	Cepas													
	Biofilmes 7 dias								Biofilmes 21 dias					
	Doxiciclina				Ciprofloxacina				p-CA					
	C20	C29	C51	C82	C20	C29	C51	C82	C20	C29	C51	C82	C20	C82
Disrupção acentuada do biofilme	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Manutenção de "tapete" fortemente aderido	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Manutenção de arquiteturas complexas	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Manutenção de células íntegras	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

p-CA = ácido p-cumárico

+ = presença

- = ausência

## 7 DISCUSSÃO

Leptospirose e biofilmes representam importantes prioridades para a saúde pública (OIE, 2021). O papel dos biofilmes tem sido investigado na leptospirose, com evidências que sustentam sua relevância em infecções crônicas (RISTOW et al., 2008; SANTOS et al., 2021). No entanto, essa associação ainda não foi explorada em hospedeiros incidentais. Ademais, o quadro agudo da leptospirose é frequentemente acompanhado por envolvimento grave de diversos sistemas orgânicos, resultando em desfechos clínicos desfavoráveis e em infecções refratárias ao tratamento convencional (SCHULLER et al., 2015; SYKES et al., 2023).

Uma das hipóteses deste estudo fundamenta-se em uma prévia caracterização multidisciplinar das cepas analisadas, na qual foram identificados genes relacionados à produção de biofilme, demonstrada 99% de homologia com a cepa L1-130 (PAZ et al., 2025) e observada a formação de biofilmes maduros *in vitro* com apenas sete dias de crescimento (DE CARVALHO et al., 2023). No presente estudo, expandimos essa investigação ao realizar testes de susceptibilidade em biofilmes maduros com apenas sete dias de formação, empregando antibióticos e também o p-CA. Também avaliamos biofilmes mais maduros (21 dias) frente ao p-CA. Indo além, utilizamos a microscopia eletrônica para visualizar a ruptura dos biofilmes em ambas as fases de crescimento, permitindo uma análise mais detalhada do impacto desses antimicrobianos sobre a morfologia dos biofilmes.

### 7.1 INVESTIGAÇÃO DE BIOFILME RENAL *in vivo*

Não foram observadas evidências histológicas de formação de biofilme maduro no parênquima renal de cães portadores de *L. interrogans* em infecção aguda. Entretanto, foram identificados biofilmes insipientes na forma de agregados de leptospiras. Neste estudo, a doença aguda foi definida pelo quadro clínico grave e pela rápida evolução para óbito (máximo 5 dias). Em cães, após a passagem trans-mucosa, reporta-se bacteremia por até 10 dias, acompanhada de vasculite, seguida por invasão renal e hepática, e posterior excreção urinária de leptospiras (REAGAN; SYKES, 2019; SCHULER et al., 2015).

O curto tempo de evolução clínica dos animais estudados, aliado à investigação de infecção natural, pode refletir o padrão menos difuso de colonização renal observado nos cães. Este padrão contrasta com os achados no parênquima renal do controle positivo - hamster infectado por via intraperitoneal (IP) com a cepa C20 -, no qual foi observada uma distribuição difusa de leptospiras intactas nos rins. Ressalta-se que essas diferenças podem estar

relacionadas ao fato de que, na inoculação IP, as leptospiras não interagem com importantes mecanismos de defesa do hospedeiro, como barreiras mucosas e cutâneas (WUNDER et al., 2016a).

Em modelos experimentais, as leptospiras invadem rapidamente a circulação sanguínea e alcançam diversos órgãos antes mesmo de iniciarem sua multiplicação (WUNDER et al., 2016a). Entretanto, rotas de inoculação que simulam de forma mais próxima as infecções naturais, como a conjuntival, demonstraram um atraso na disseminação, distribuição e multiplicação das leptospiras (WUNDER et al., 2016a).

As fotomicrografias de IHQ apresentaram um padrão multifocal de colonização renal, sem obliteração completa dos túbulos renais, nos quais raras leptospiras intactas foram observadas. Os achados histopatológicos nos cães estudados indicaram alterações circulatórias e necrose, aspectos correlacionados à injúria aguda por leptospirose (PAZ et al., 2021). Consistentemente, a leptospirose aguda é caracterizada por intensas injúrias teciduais, mesmo na presença de poucos microrganismos, sugerindo que os danos sejam mediados por componentes bacterianos tóxicos e/ou pela ativação exacerbada da resposta imunológica do hospedeiro (HILBE et al., 2023; ZUERNER, 2015). Assim, a carga de leptospiras não está necessariamente associada à gravidade das lesões orgânicas (MATSUI et al., 2011).

Em cães, o padrão de produção de citocinas pró-inflamatórias em formas graves de infecção indica uma complexa resposta imune (MAISSEN-VILLIGER et al., 2016). Essa resposta diferenciada sugere a manutenção de processos inflamatórios em infecções agudas, alterando o microambiente tecidual (MATSUI et al., 2016). Esses fatores podem refletir a menor observação de agregados bacterianos, de esparsas leptospiras intactas e a precocidade do processo infeccioso relatado neste estudo. Esses fatores junto ao rápido tempo de evolução para o óbito podem ter limitado a progressão de agregados para a forma de biofilmes maduros produtores de profusas quantidades de matriz extracelular, detectáveis pelas técnicas de coloração empregadas.

Em contraste, Santos e colaboradores (2021) observaram alterações histopatológicas mínimas nos rins de *R. norvegicus* associados à presença de biofilmes. Os autores sugeriram uma correlação entre a obliteração completa de túbulos renais, com elevada carga bacteriana, menor injúria no parênquima e a formação de biofilme (SANTOS et al., 2021). Estudos sobre a resposta imune à leptospirose destacam que carreadores crônicos e pacientes sobreviventes expressam maiores níveis de citocinas anti-inflamatórias, promovendo uma resposta protetiva, associada a uma forma mais branda da doença e à colonização persistente (MAISSEN-VILLIGER et al., 2016; MATSUI et al., 2017).

Segundo os resultados obtidos, podemos inferir que a natureza aguda e grave da infecção na presença de poucas leptospiros no parênquima renal sugere a necessidade de uma maior carga bacteriana para a formação de biofilmes maduros a serem evidenciados pelas técnicas de coloração aplicadas. Como mencionado, o microambiente renal protetivo, aliado à resposta imune diferenciada em hospedeiros reservatórios, parece criar condições favoráveis à multiplicação e à formação de colônias bacterianas capazes de formar matriz em maior intensidade, caracterizando biofilme maduro, ou seja, em uma fase mais crônica.

Apesar de não se detectar neste estudo *in vivo* biofilmes maduros com produção de matriz extracelular, destaca-se a presença de agregado bacteriano (C20) com morfologia semelhante a observada em experimento *in vitro* por nossa equipe (DE CARVALHO et al., 2023), representando o primeiro dia de incubação das leptospiros. Agregados bacterianos são considerados uma valiosa característica para a persistência de bactérias patogênicas durante infecções e transmissão entre hospedeiros (JACQUES; MALOUIN, 2022), estando também associados a maior resistência antimicrobiana (KRAGH; TOLKER-NIELSEN; LICHTENBERG, 2023) Já foi reportada a presença de agregados nos pulmões de suínos infectados por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (TREMBLAY et al., 2017) e em glândula mamária de vacas infectadas com *S. aureus* (JACQUES; MALOUIN, 2022).

Embora o rápido curso de infecção impeça uma correlação direta entre falha terapêutica e formação de agregado bacteriano nos animais estudados, há relato de persistência de leptospiros após tratamento da fase aguda com posterior multiplicação e estabelecimento de um processo crônico (ANDRÉ-FONTAINE, 2006). Os derivados de penicilina, são a primeira escolha para tratar a bacteremia inicial, enquanto a doxiciclina é indicada para reduzir a colonização renal (SYKES et al., 2023). Contudo, falhas terapêuticas em cães (GUTIERREZ et al., 2019) e o aumento das CIMs para doxiciclina em *Leptospira* (BENACER et al., 2017; DE CARVALHO et al., 2023; LIEGEON; DELROY; PICARDEAU, 2018) reforçam a importância de abordagens terapêuticas adequadas e do início do tratamento o quanto antes no curso clínico.

Atualmente, um dos principais desafios na leptospirose é a detecção precoce da infecção e dos processos patogênicos associados (DIAS et al., 2021). Como biofilmes estão relacionados à menor eficácia antimicrobiana, o atraso na identificação dessas estruturas, tanto em estágios iniciais (agregados bacterianos) quanto mais maduros, significa também atraso nas adequações de prevenção e tratamento, causando prejuízos significativos à saúde animal (KAVELA et al., 2023). Entretanto, as técnicas disponíveis para identificação de biofilmes são voltadas às estruturas em estágios maduros, relacionando-as a infecções crônicas (KOLPEN et al., 2022).

Assim, são necessários mais estudos voltados para a investigação de amostras clínicas de animais naturalmente infectados, que proporcione melhor entendimento do estabelecimento de biofilme *in vivo*, em diferentes estágios de infecção. Ademais, análise de pequenos fragmentos de rins *in vivo* podem não representar todo o sistema orgânico estudado.

*Leptospira interrogans* é amplamente disseminada e representa um patógeno de grande relevância para a saúde humana e animal (OIE, 2021). A partir dos resultados em nossa jornada científica, considerando a relevância da leptospirose para a saúde pública, a caracterização destas cepas em diferentes âmbitos de pesquisa gerou relevantes aspectos da epidemiologia, diagnóstico, clínica e tratamento da leptospirose em cães (DE CARVALHO et al., 2023; DIAS et al., 2021; PAZ et al., 2021; PAZ et al., 2025). Entretanto, mais estudos são necessários para melhor caracterização dos isolados, envolvendo análises como a proteômica e transcriptômica, assim como a influência de agregados bacterianos na susceptibilidade a antimicrobianos.

## 7.2 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *L. INTERROGANS* NAS FORMAS PLANCTÔNICA E BIOFILME FRENTE A DIFERENTES AGENTES S

Os valores elevados de CIMs para doxiciclina e ciprofloxacina frente a biofilmes de sete dias, em comparação com suas formas planctônicas, destacam o papel protetivo da matriz extracelular como barreira física e funcional, limitando a penetração dos antimicrobianos (JACQUES; MALOUIN, 2022). A correlação entre susceptibilidade antimicrobiana e biofilmes precoces (menos de 21 dias) de *Leptospira* ainda não havia sido investigada. Embora não haja consenso estabelecido para a interpretação das CIMs na leptospirose, estudos prévios com biofilmes de 21 dias evidenciaram aumentos significativos nas concentrações necessárias para a inibição por antimicrobianos como amoxicilina, ampicilina, doxiciclina, ciprofloxacina e penicilina G (DE CARVALHO et al., 2023; VINOD KUMAR et al., 2016). Desse modo, os resultados deste estudo destacam as complexas interações entre *L. interrogans* e os agentes antimicrobianos testados em diferentes estágios de maturação do biofilme.

A observação de que biofilmes de sete dias podem influenciar a susceptibilidade bacteriana à doxiciclina e à ciprofloxacina, antibióticos empregados no tratamento da leptospirose canina (SYKES et al., 2023), ressalta a importância de pesquisas voltadas para a identificação de compostos capazes de inibir de forma eficaz a formação e a manutenção de biofilmes. O aumento na CIM de biofilmes de sete dias em relação às formas planctônicas sugere limitações nos protocolos terapêuticos atualmente usados. Nesse contexto, o uso de substâncias antimicrobianas naturais apresenta-se como uma alternativa promissora,

oferecendo potenciais benefícios no combate a infecções associadas a biofilmes bacterianos e contribuindo para o desenvolvimento de novos regimes terapêuticos frente à resistência antimicrobiana por biofilmes.

Ao conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo a avaliar o efeito de antimicrobianos, incluindo o p-CA, em biofilmes de sete dias de cepas autóctones de *Leptospira interrogans*. Paralelamente, investigou-se a capacidade disruptiva deste agente natural em comparação aos antibióticos doxiciclina e ciprofloxacina. Assim, não foi possível realizar comparações diretas com outros estudos da literatura. No entanto, destaca-se o papel do p-CA como antimicrobiano para as formas planctônicas, que se mostraram altamente susceptíveis, com CIMs consistentemente baixas ( $\leq 0,02 \mu\text{g/mL}$ ), demonstrando a eficácia do composto em condições em que a barreira do biofilme está ausente. A atividade antibacteriana do p-CA corrobora estudos anteriores, nos quais o composto mostrou boa capacidade de inibir o crescimento de outras espécies bacterianas, incluindo resistentes, com CIMs entre 0,5 e 1 mg/mL (IVANOV et al., 2022; YAZICI; BAKHEDDA; AKÇELIK, 2023; XU et al., 2022).

Em contrapartida, neste estudo a investigação da atividade antibacteriana em biofilmes deste polifenol revelou susceptibilidade progressivamente reduzida dos biofilmes de sete e 21 dias ao p-CA, com aumentos de até 15 vezes nas CIMs em relação às formas planctônicas. Embora as concentrações de p-CA necessárias tenham sido menores em comparação à doxiciclina e à ciprofloxacina, especialmente em biofilmes de sete dias, esses resultados indicam que o crescimento de *L. interrogans* na forma de biofilmes aumenta sua proteção, reduzindo efetivamente o potencial antimicrobiano de todos os agentes estudados.

### 7.3 DISRUPÇÃO DE BIOFILMES DE *L. INTERROGANS*

Os biofilmes são comunidades organizadas em agregados protegidos por uma complexa estrutura de substância exopolimérica que confere proteção à ação de agentes antimicrobianos (SAUER et al., 2022). Neste estudo, os resultados dos testes de susceptibilidade antimicrobiana demonstraram que as quatro cepas estudadas em forma de biofilme requeriam concentrações maiores de antimicrobianos em comparação às formas planctônicas. Nesse contexto, decidiu-se realizar análises por MEV com o objetivo de observar a arquitetura dos biofilmes tratados.

Os biofilmes não tratados (sete e 21 dias) apresentaram diferenças estruturais evidentes em relação à densidade celular e aos padrões de produção de matriz extracelular. Resultados semelhantes já haviam sido reportados para as mesmas cepas com 21 dias de incubação (DE CARVALHO et al., 2023). Analogamente, os efeitos disruptivos observados nas arquiteturas

dos biofilmes tratados indicam que, embora todos os agentes testados tenham surtido algum grau de mitigação, não foi possível observar um padrão consistente em suas atividades. Esses achados sugerem que fatores genéticos ou fenotípicos específicos de cada cepa desempenham um papel crucial na formação e organização estrutural dos biofilmes, bem como em sua resposta aos tratamentos antimicrobianos, mesmo quando submetidos às mesmas condições experimentais. Essa heterogeneidade reflete a necessidade de abordagens distintas no combate às infecções por *L. interrogans*, especialmente em condições em que a formação de biofilme é um fator crítico.

Adicionalmente, é importante destacar que, apesar da heterogeneidade disruptiva, um ponto de convergência observado foi o fato de que a exposição às três substâncias estudadas resultou na manutenção de leptospiros com características morfológicas indicativas de integridade celular. Em sua maioria, essas células foram localizadas nas camadas mais internas dos biofilmes e/ou envoltas por remanescentes de matriz extracelular em agregados bacterianos e colônias persistentes após os tratamentos. Esses achados se tornam ainda mais relevantes frente ao fato de que, em situações clínicas, a fração de um medicamento que chega ao sítio de ação tende a ser reduzida em relação aos valores testados *in vitro* (DONG et al., 2019). Contudo, essas sub concentrações influenciam de forma significativa a fisiologia bacteriana, incluindo a regulação de genes de virulência, formação de biofilme e expressão de sistemas de resistência (NARIMISA et al., 2020).

Curiosamente, a exposição à subconcentrações (sub-MICs) pode, em algumas situações, promover a formação de biofilmes bacterianos, dependendo da espécie bacteriana e do antimicrobiano em questão. Por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* apresentou aumento significativo na formação de biofilmes quando exposta a sub-MICs de cefotaxima, amoxicilina e azitromicina, enquanto a ciprofloxacina revelou efeito inibitório sobre os biofilmes dessa mesma bactéria, evidenciando a complexidade das interações entre antibióticos e a fisiologia bacteriana (AKA & HAJI, 2015).

Embora uma limitação deste estudo tenha sido a não investigação da viabilidade de células remanescentes, esses achados corroboram descrições na literatura sobre a presença de células persistentes em biofilmes, consideradas um dos mecanismos que conferem tolerância à ação de agentes antimicrobianos (LICHTENBERG et al., 2023). Davignon e colaboradores (2024) relataram que, após a disrupção do biofilme de *Leptospira*, as células retornaram de um estado de dormência para um estado metabolicamente ativo. Adicionalmente, as bactérias resultantes da disrupção do biofilme preservaram sua virulência, conforme demonstrado em um

modelo animal (DAVIGNON et al., 2024). Essas células, devido à sua capacidade de sobreviver aos tratamentos, podem retomar o crescimento do biofilme e repopular o sítio de infecção contribuindo para a persistência da leptospirose. Ademais, como as cepas utilizadas neste estudo são infectantes, a presença de células bacterianas remanescentes após tratamento intensifica a relevância dos achados e reforça a importância dos biofilmes na patogênese da leptospirose.

O presente estudo revelou que nenhum dos agentes testados se mostrou consistentemente superior na disrupção de biofilmes pré-formados de *L. interrogans*. Observou-se que, enquanto um agente apresentava uma atividade menos intensa, outro demonstrava maior efetividade, sugerindo um potencial complementar entre eles. Nesse contexto, o uso do p-CA pareceu complementar as ações dos antibióticos em determinados aspectos. Por exemplo, em comparação à doxiciclina, o p-CA foi mais eficaz na disrupção de biofilmes de sete dias da cepa C20, enquanto, para a cepa C82, seu uso resultou em menor manutenção de agregados celulares. Em relação à ciprofloxacina, o p-CA demonstrou maior capacidade de disrupção do tapete de biofilme da cepa C29.

O p-CA tem sido amplamente investigado por seus efeitos antibiofilme, dado que polifenóis, como ele, apresentam vantagens sobre os antibióticos tradicionais ao exercerem menor pressão seletiva sobre as populações bacterianas (XU et al., 2022). Entretanto, a maior parte dos estudos tem como foco seu efeito preventivo na formação de biofilmes bacterianos, em vez de sua ação sobre biofilmes já estabelecidos. Yazici e colaboradores (2023) demonstraram que, na concentração de 1 mg/mL, o p-CA foi capaz de reduzir em até 66,42% a formação de biofilmes de *Enterococcus faecalis*. Por outro lado, em biofilmes por *Salmonella* Enteritidis, efeitos inibitórios foram relatados na concentração de 0,25 mg/mL, embora o p-CA não tenha mostrado efetividade em biofilmes pré-formados desta espécie (XU et al., 2022). Em contrapartida, Ahmad e colaboradores (2024) demonstraram que, à concentração de 1 mg/mL, o p-CA apresentou boa atividade disruptiva, dispersando 73,45% do biofilme pré-formado de *Streptococcus mutans* e reduzindo significativamente a viabilidade celular.

O efeito anti-biofilme do p-CA foi atribuído à sua interferência na matriz extracelular ao reduzir a produção de componentes como exopolissacarídeos e o eDNA (IVANOV et al., 2022). O p-CA possui grupos hidrofóbicos que permitem sua interação mais fácil com células e sua inserção na matriz do biofilme, o que pode resultar em alterações na integridade da matriz e facilitar a penetração deste composto ou de outros antimicrobianos nas camadas mais internas do biofilme (LOU et al., 2012). Neste estudo, a ação disruptiva mais acentuada observada em biofilmes (C20 e C82) de 21 dias pode estar conectada ao aumento da concentração do agente,

o que proporcionaria sua maior interação com os componentes da matriz. Assim, com base nos resultados deste estudo, sugere-se a continuidade da busca por novas abordagens terapêuticas para infecções por *L. interrogans* com formação de biofilmes, incluindo terapias combinadas para o controle de biofilmes em diferentes estágios de desenvolvimento.

## 8 CONCLUSÕES

A formação de biofilmes, mesmo que incipientes, no parênquima renal de cães naturalmente infectados por *L. interrogans*, em um momento tão precoce quanto sete dias, pode ser uma causa relacionada à falha terapêutica. A presença de agregados bacterianos com alta similaridade morfológica com estágios iniciais de formação de biofilme *in vitro* sugere um fenótipo potencialmente comparável com essa estrutura, ressaltando a necessidade de investigações sobre a patogênese da formação e da progressão de biofilmes *in vivo*.

A maturidade dos biofilmes de *L. interrogans* influencia negativamente a eficácia dos tratamentos antimicrobianos. Mesmo em biofilmes com apenas sete dias de crescimento, a presença de características estruturais associadas a um estágio avançado de maturidade foi o suficiente para reduzir a eficácia dos agentes antimicrobianos testados. Essa adaptação rápida à condição de biofilmes ressalta a importância de intervenções terapêuticas precoces para evitar o estabelecimento de biofilmes mais resistentes.

Identificou-se heterogeneidade na disrupção das arquiteturas dos biofilmes tratados de *L. interrogans*, com manutenção de células bacterianas morfológicamente integras. O p-CA demonstrou eficácia antibacteriana contra formas planctônicas de *L. interrogans* e capacidade de disrupção em biofilmes de sete e 21 dias de maturação. Adicionalmente, os resultados sugerem uma possível atividade complementar do p-CA com antibióticos tradicionais (doxiciclina e ciprofloxacina). Estudos adicionais são essenciais para elucidar os mecanismos específicos de ação do p-CA sobre biofilmes de *L. interrogans* e para investigar possíveis combinações terapêuticas que possam superar as limitações observadas nos tratamentos atuais.

## 9 REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, K., KENNGOTT, R., SETTLES, M., *et al.* "In vivo biofilm formation of pathogenic *Leptospira* spp. In the vitreous humor of horses with recurrent uveitis", **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1–14, 2021.
- ADLER, B., DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. "*Leptospira* and leptospirosis", **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 287–296, 27 jan. 2010.
- AHMAD, S. S., SIDDIQUI, M. F., MAQBOOL, F., *et al.* "Combating Cariogenic *Streptococcus mutans* Biofilm Formation and Disruption with Coumaric Acid on Dentin Surface", **Molecules**, v. 29, n. 2, 1 jan. 2024.
- AKA, S. T., HAJI, S. H. "Sub-MIC of antibiotics induced biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of chlorhexidine", **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 149–154, maio 2015.
- AHMAD, S. S., SIDDIQUI, M. F., MAQBOOL, F., *et al.* "Combating Cariogenic *Streptococcus mutans* Biofilm Formation and Disruption with Coumaric Acid on Dentin Surface", **Molecules**, v. 29, n. 2, 1 jan. 2024.
- AKA, S. T., HAJI, S. H. "Sub-MIC of antibiotics induced biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of chlorhexidine", **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 149–154, maio 2015.
- ANDERSEN, J. B., KRAGH, K. N., HULTQVIST, L. D., *et al.* "Induction of Native c-di-GMP Phosphodiesterases Leads to Dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 4, 18 mar. 2021.
- ANDRÉ-FONTAINE, G. "Canine leptospirosis—Do we have a problem?", **Veterinary Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 19–24, 5 out. 2006.
- ANDRE-FONTAINE, G., AVIAT, F., THORIN, C. "Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water", **Current Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 136–142, 24 jul. 2015.
- BENACER, D., MOHD ZAIN, S. N., OOI, P. T., *et al.* "Antimicrobial Susceptibility of *Leptospira* spp. Isolated from Environmental, Human and Animal Sources in Malaysia", **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 124–128, 1 jan. 2017.
- BENITEZ, A. do N., MONICA, T. C., MIURA, A. C., *et al.* "Spatial and Simultaneous Seroprevalence of Anti-*Leptospira* Antibodies in Owners and Their Domiciled Dogs in a Major City of Southern Brazil", **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, 8 jan. 2021.
- BHARTI, A. R., NALLY, J. E., RICARDI, J. N., *et al.* "Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance", **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, dez. 2003.
- BIERQUE, E., THIBEAUX, R., GIRAULT, D., *et al.* "A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments", **PLOS ONE**, v. 15, n. 1, p. e0227055, 27 jan. 2020.

BJARNSHOLT, T., JENSEN, P. Ø., RASMUSSEN, T. B., *et al.* "Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections", **Microbiology**, v. 151, n. 12, p. 3873–3880, 1 dez. 2005.

BOEY, K., SHIOKAWA, K., RAJEEV, S. "Leptospira infection in rats: A literature review of global prevalence and distribution", **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, p. e0007499, 9 ago. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Saúde. Situação epidemiológica da leptospirose. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/apresentacoes/2024/situacao-epidemiologica-dos-casos-de-leptospirose-no-brasil-2010-a-2024>.

CAMERON, C. E., "Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism". **Current Topics in Microbiology and Immunology**, [S.l.], Springer Verlag, 2015. v. 387. p. 21–41.

CARSON; HLADIK. Histotechnology A Self-Instructional Text. 3rd ed. **American Society for Clinical Pathology**; 2009.

CASANOVAS-MASSANA, A., HAMOND, C., SANTOS, L. A., *et al.* "*Leptospira yasudae* sp. nov. and *Leptospira stimsonii* sp. nov., two new species of the pathogenic group isolated from environmental sources", **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1450–1456, 1 mar. 2020.

CDC, 2023. Centers for Disease Control and Prevention (2022) One Health basics. CDC, Atlanta. <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html> [acessado em 30 de setembro de 2023]

CHAKRABORTY, A., MIYAHARA, S., VILLANUEVA, S. Y. A. M., *et al.* "A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species", **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 7, p. 494–501, jul. 2011.

CHAKRABORTY, A., MIYAHARA, S., VILLANUEVA, S. Y. A. M., *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, dez. 2010.

CHEN, X., YU, F., LI, Y., *et al.* "The inhibitory activity of p-coumaric acid on quorum sensing and its enhancement effect on meat preservation", **CyTA - Journal of Food**, v. 18, n. 1, p. 61–67, 1 jan. 2020.

CLUTTERBUCK, A. L., WOODS, E. J., KNOTTENBELT, D. C., *et al.* "Biofilms and their relevance to veterinary medicine", **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 1–2, p. 1–17, 31 mar. 2007.

COSTA, F., HAGAN, J. E., CALCAGNO, J., *et al.* "Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review", **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003898, 17 set. 2015.

COSTERTON, J. W., GEESEY, G. G., CHENG, K.-J. "How Bacteria Stick", **Scientific American**, v. 238, n. 1, p. 86–95, jan. 1978.

- COSTERTON, J. W., STEWART, P. S., GREENBERG, E. P. "Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections", **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 21 maio 1999.
- COSTERTON, J. William, LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., *et al.* "MICROBIAL BIOFILMS", **Annual Review of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711–745, out. 1995.
- DAVIGNON, G., PIETROSEMOLI, N., BENAROUDJ, N., *et al.* "*Leptospira interrogans* biofilm transcriptome highlights adaptation to starvation and general stress while maintaining virulence", **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 10, n. 1, p. 95, 30 set. 2024.
- DE CARVALHO, R. M, SILVA DIAS, C., NOGUEIRA PAZ, L., *et al.* "Biofilm formation in vitro by *Leptospira interrogans* strains isolated from naturally infected dogs and their role in antimicrobial resistance", **Heliyon**, v. 9, n. 3, p. e13802, 1 mar. 2023.
- DE OLIVEIRA, N. R., KREMER, F. S., DE BRITO, R. S. A., *et al.* "Pathogenesis and Genomic Analysis of a Virulent *Leptospira Interrogans* Serovar Copenhageni Isolated from a Dog with Lethal Infection", **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 11, p. 333, 28 out. 2022.
- DESTOUMIEUX-GARZÓN, D., MAVINGUI, P., BOETSCH, G., *et al.* "The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead", **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, n. 12 fev. 2018.
- DI AZEVEDO, M. I. N., AYMÉE, L., BORGES, A. L. dos S. B., *et al.* "Molecular Epidemiology of Pathogenic *Leptospira* spp. Infecting Dogs in Latin America", **Animals**, v. 13, n. 15, p. 2422, 27 jul. 2023.
- DIAS, C. S., PAZ, L. N., SOLCÀ, M. S., *et al.* "Kidney Injury Molecule-1 in the detection of early kidney injury in dogs with leptospirosis", **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 76, p. 101637, 1 jun. 2021.
- DIELTJENS, L., APPERMANS, K., LISSENS, M., *et al.* "Inhibiting bacterial cooperation is an evolutionary robust anti-biofilm strategy", **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 107, 9 jan. 2020.
- DONG, G., LI, J., CHEN, L., *et al.* "Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin on biofilm formation and virulence factors of *Escherichia coli*", **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 15–21, 1 jan. 2019.
- DONLAN, R. M., COSTERTON, J. W. "Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms", **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167–193, abr. 2002.
- DOS SANTOS RIBEIRO, P., CARVALHO, N. B., ABURJAILE, F., *et al.* "Environmental Biofilms from an Urban Community in Salvador, Brazil, Shelter Previously Uncharacterized Saprophytic *Leptospira*", **Microbial Ecology**, v. 86, n. 4, p. 2488–2501, 16 nov. 2023.
- DU, C., FIKHMAN, D. A., PERSAUD, D., *et al.* "Dual Burst and Sustained Release of p-Coumaric Acid from Shape Memory Polymer Foams for Polymicrobial Infection Prevention in Trauma-Related Hemorrhagic Wounds", **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 15, n. 20, p. 24228–24243, 24 maio 2023.

- DUTTA, B., LAHIRI, D., NAG, M., *et al.*, "Introduction to Bacterial Biofilm and Acute Infections". **Biofilm-Mediated Diseases: Causes and Controls**, Singapore, Springer Singapore, 2021. p. 1–20.
- ELLIS, W. A., "Animal Leptospirosis". **Current Topics in Microbiology and Immunology**, [S.l.], Springer Verlag, 2015. v. 387. p. 99–137.
- ESTEVEZ, S. B., SANTOS, C. M., SILVA, B. C. S., *et al.* "Time for change? A systematic review with meta-analysis of leptospires infecting dogs to assess vaccine compatibility in Brazil", **Preventive Veterinary Medicine**, v. 213, p. 105869, 1 abr. 2023.
- FAINE, S. **Leptospira and leptospirosis**. [S.l.], MediSci, 1999.
- FALKINHAM, J. O., NORTON, C. D., LECHEVALLIER, M. W. "Factors Influencing Numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and Other Mycobacteria in Drinking Water Distribution Systems", **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 1225–1231, mar. 2001.
- FERNANDES, L. G. V., STONE, N. E., ROE, C. C., *et al.* "*Leptospira sanjuanensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from soil in Puerto Rico", **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 72, n. 10, 21 out. 2022.
- FERREIRA, Paula Scanavez, VICTORELLI, F. D., FONSECA-SANTOS, B., *et al.* "A Review of Analytical Methods for *p*-Coumaric Acid in Plant-Based Products, Beverages, and Biological Matrices", **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 21–31, 2 jan. 2019.
- FERREIRA, P.S., VICTORELLI, F. D., RODERO, C. F., *et al.* "p-Coumaric acid loaded into liquid crystalline systems as a novel strategy to the treatment of vulvovaginal candidiasis", **International Journal of Pharmaceutics**, v. 603, p. 120658, 15 jun. 2021.
- FLEMMING, H.-C., WINGENDER, J. "The biofilm matrix", **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2 set. 2010.
- FLEMMING, H.-C., WUERTZ, S. "Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms", **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 247–260, 13 abr. 2019.
- GEIBLER, P., WOLLANKE, B. "Biofilm formation in persistent infections and its role in the pathogenesis of equine recurrent uveitis (ERU) – a literature review", **Pferdeheilkunde Equine Medicine**, v. 37, n. 3, p. 225–233, 1 maio 2021.
- GOH, S. H., KHOR, K. H., RADZI, R., *et al.* "Shedding and Genetic Diversity of *Leptospira* spp. From Urban Stray Dogs in Klang Valley, Malaysia", **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 45, p. 100562, 1 nov. 2021.
- GRAYZEL, S. E., DEBESS, E. E. "Characterization of leptospirosis among dogs in Oregon, 2007–2011", **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 248, n. 8, p. 908–915, 15 abr. 2016.
- GRIEBSCH, C., WARD, M. P., NORRIS, J. M. "Canine Leptospirosis – Global Distribution, Diagnosis, and Treatment", **Advances in Small Animal Care**, v. 3, n. 1, p. 177–220, nov. 2022.

- GRILLOVA, L., COKELAER, T., MARIET, J.-F., *et al.* "Core genome sequencing and genotyping of *Leptospira interrogans* in clinical samples by target capture sequencing", **BMC Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 157, 14 mar. 2023.
- GUPTA, K., LIAO, J., PETROVA, O. E., *et al.* "Elevated levels of the second messenger c-di-GMP contribute to antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*", **Molecular Microbiology**, v. 92, n. 3, p. 488–506, 9 maio 2014.
- GUPTA, P., SARKAR, S., DAS, B., *et al.* **Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review**. **Archives of Microbiology**. [S.l.], Springer Verlag., 1 jan. 2016.
- GUTIERREZ, L., MENDOZA, J., RANGEL, A. B., *et al.* "Outpatient Clinical Trial in Dogs with Leptospirosis Treated With Enrofloxacin Hydrochloride-Dihydrate (ENRO-C)", **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, 15 out. 2019.
- HAAKE, D. A., CHAO, G., ZUERNER, R. L., *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, abr. 2000.
- HILBE, M., POSTHAUS, H., PATERNOSTER, G., *et al.* "Exudative glomerulonephritis associated with acute leptospirosis in dogs", **Veterinary Pathology**, 29 out. 2023.
- HOIBY, N. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. **Acta Pathol Microbiol Scand Suppl**, v. 262, p. 1–96, 1977.
- HORNSBY, R. L., ALT, D. P., NALLY, J. E. "Isolation and propagation of leptospires at 37 °C directly from the mammalian host", **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 9620, 15 jun. 2020.
- HOWELL, A. B. "Cranberry Proanthocyanidins and the Maintenance of Urinary Tract Health", **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, n. sup3, p. 273–278, jan. 2002.
- IRAOLA, G., SPANGENBERG, L., LOPES BASTOS, B., *et al.* "Transcriptome Sequencing Reveals Wide Expression Reprogramming of Basal and Unknown Genes in *Leptospira biflexa* Biofilms", **mSphere**, v. 1, n. 2, 27 abr. 2016.
- JACQUES, M., MALOUIN, F. "One Health—One Biofilm", **Veterinary Research**, v. 53, n. 1, p. 51, 7 dez. 2022.
- JANTORN, P., TIPMANEE, V., WANNA, W., *et al.* "Potential natural antimicrobial and antibiofilm properties of Piper betle L. against *Staphylococcus pseudointermedius* and methicillin-resistant strains", **Journal of Ethnopharmacology**, v. 317, p. 116820, 5 dez. 2023.
- JOHNSON, R. C.; HARRIS, V. G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires I. Growth at low temperatures. **Journal of bacteriology**, v. 94, n. 1, p. 27-31, 1967.

- JUVET, F., SCHULLER, S., O'NEILL, E. J., *et al.* "Urinary shedding of spirochaetes in a dog with acute leptospirosis despite treatment", **Veterinary Record**, v. 168, n. 21, p. 564–564, 28 maio 2011.
- KAVELA, S., VYAS, P., CP, J., *et al.* "Use of an Integrated Multi-Omics Approach To Identify Molecular Mechanisms and Critical Factors Involved in the Pathogenesis of *Leptospira*", **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 2, 13 abr. 2023.
- 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, out. 2009.
- KOLPEN, M., JENSEN, P. Ø., FAURHOLT-JEPSEN, D., *et al.* "Prevalence of biofilms in acute infections challenges a longstanding paradigm", **Biofilm**, v. 4, p. 100080, 1 dez. 2022.
- KORBA, A. A., LOUNICI, H., KAINIU, M., *et al.* "*Leptospira ainlahdjerensis* sp. nov., *Leptospira ainzelensis* sp. nov., *Leptospira abararensis* sp. nov. and *Leptospira chreensis* sp. nov., four new species isolated from water sources in Algeria", **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 12, 16 dez. 2021.
- KRAGH, K. N., TOLKER-NIELSEN, T., LICHTENBERG, M. "The non-attached biofilm aggregate", **Communications Biology**, v. 6, n. 1, p. 898, 1 set. 2023.
- LAWRENCE, J. R., KORBER, D. R., HOYLE, B. D., *et al.* "Optical sectioning of microbial biofilms", **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 20, p. 6558–6567, out. 1991.
- LEE, J.-H., KIM, Y.-G., RYU, S. Y., *et al.* "Ginkgolic acids and Ginkgo biloba extract inhibit *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* biofilm formation", **International Journal of Food Microbiology**, v. 174, p. 47–55, 17 mar. 2014.
- LERCHE, C. J., SCHWARTZ, F., THEUT, M., *et al.* "Anti-biofilm Approach in Infective Endocarditis Exposes New Treatment Strategies for Improved Outcome", **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 18 jun. 2021.
- LEWIS, K., "Persister Cells: Molecular Mechanisms Related to Antibiotic Tolerance". **Handbook of Experimental Pharmacology**, [S.l.], Springer Science and Business Media, LLC, 2012. v. 211. p. 121–133.
- LIAO, S., SUN, A., OJCIUS, D. M., *et al.* "Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* Strain Lai", **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 253, 9 dez. 2009.
- LICHTENBERG, M., COENYE, T., PARSEK, M. R., *et al.* "What's in a name? Characteristics of clinical biofilms", **FEMS Microbiology Reviews**, v. 47, n. 5, 5 set. 2023.
- 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, 1 maio 2018.
- LOU, Z., WANG, H., RAO, S., *et al.* "p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms", **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 550–554, jun. 2012.

- LOUREIRO, A. P., LILENBAUM, W. "Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease", **Theriogenology**, v. 141, p. 41–47, 1 jan. 2020.
- MAGNIN, M., BARTHÉLEMY, A., SONET, J., *et al.* "Pulmonary dysfunction as a component of a multiple organ dysfunction syndrome in dogs with leptospirosis", **Revue Vétérinaire Clinique**, v. 55, n. 3, p. 95–103, 1 set. 2020.
- MAISSEN-VILLIGER, C. A., SCHWEIGHAUSER, A., VAN DORLAND, H. A., *et al.* "Expression Profile of Cytokines and Enzymes mRNA in Blood Leukocytes of Dogs with Leptospirosis and Its Associated Pulmonary Hemorrhage Syndrome", **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0148029, 29 jan. 2016.
- MARTIN, I., WATERS, V., GRASEMANN, H. "Approaches to Targeting Bacterial Biofilms in Cystic Fibrosis Airways", **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 2155, 22 fev. 2021.
- MARTINS, G., LILENBAUM, W. "The panorama of animal leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil, regarding the seroepidemiology of the infection in tropical regions", **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 1, p. 237, 2013.
- MARUOKA, T., NIKAIDO, Y., MIYAHARA, S., *et al.* "Correlation between renal distribution of leptospires during the acute phase and chronic renal dysfunction in a hamster model of infection with *Leptospira interrogans*", **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 6, p. e0009410, 18 jun. 2021.
- MATSUI, M., ROCHE, L., GEROULT, S., *et al.* "Cytokine and Chemokine Expression in Kidneys during Chronic Leptospirosis in Reservoir and Susceptible Animal Models", **PLOS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0156084, 24 maio 2016.
- MATSUI, M., ROCHE, L., SOUPÉ-GILBERT, M.-E., *et al.* "High level of IL-10 expression in the blood of animal models possibly relates to resistance against leptospirosis", **Cytokine**, v. 96, p. 144–151, 1 ago. 2017.
- MATSUI, M., ROULEAU, V., BRUYÈRE-OSTELLS, L., *et al.* "Gene Expression Profiles of Immune Mediators and Histopathological Findings in Animal Models of Leptospirosis: Comparison between Susceptible Hamsters and Resistant Mice", **Infection and Immunity**, v. 79, n. 11, p. 4480–4492, nov. 2011.
- MAURO, T., HARKIN, K. "Persistent Leptospirosis in Five Dogs Despite Antimicrobial Treatment (2000–2017)", **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 55, n. 1, p. 42–47, 1 jan. 2019.
- MENY, P. *et al.* "Seroprevalence of anti-*Leptospira* antibodies in equines and associated workers-isolation of *Leptospira interrogans* serogroup Canicola from equine urine." **Zoonoses Public Health**. v. 69, p. 52-536, 2022.
- MEYER, F., ENAX, J., EPPLE, M., *et al.* "Cariogenic Biofilms: Development, Properties, and Biomimetic Preventive Agents", **Dentistry Journal**, v. 9, n. 8, p. 88, 3 ago. 2021.
- MIOTTO, B. A., GUILLOUX, A. G. A., TOZZI, B. F., *et al.* "Prospective study of canine leptospirosis in shelter and stray dog populations: Identification of chronic carriers and

different *Leptospira* species infecting dogs", **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0200384, 11 jul. 2018.

MIRAGLIA, F., MATSUO, M., MORAIS, Z. M., *et al.* "Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil", **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, n. 3, p. 195–199, nov. 2013.

MORENO, L. Z., MIRAGLIA, F., LILENBAUM, W., *et al.* "Profiling of *Leptospira interrogans*, *L. santarosai*, *L. meyeri* and *L. borgpetersenii* by SE-AFLP, PFGE and susceptibility testing—a continuous attempt at species and serovar differentiation", **Emerging Microbes & Infections**, v. 5, n. 1, p. 1–7, 25 jan. 2016.

MURRAY, C. K., HOSPENTHAL, D. R. "Determination of Susceptibilities of 26 *Leptospira* sp. Serovars to 24 Antimicrobial Agents by a Broth Microdilution Technique", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 4002–4005, out. 2004.

MURRAY, G. L., "The Molecular Basis of Leptospiral Pathogenesis". **Current Topics in Microbiology and Immunology**, [S.l.], Springer Verlag, 2015. v. 387. p. 139–185.

MUSSO, D., LA SCOLA, B. "Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge", **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, n. 4, p. 245–252, ago. 2013.

NAG, M., LAHIRI, D., GHOSH, A., *et al.*, "Quorum Sensing". **Biofilm-Mediated Diseases: Causes and Controls**, Singapore, Springer Singapore, 2021. p. 21–45.

NARDUCHE, L., HAMOND, C., MARTINS, G. M. S., *et al.* "Recovery of Leptospire in Short- and Medium-Term Cryopreservation Using Different Glycerol and Dimethyl Sulfoxide Concentrations", **Biopreservation and Biobanking**, v. 14, n. 1, p. 81–83, fev. 2016.

NARIMISA, N., AMRAEI, F., KALANI, B. S., *et al.* "Effects of sub-inhibitory concentrations of antibiotics and oxidative stress on the expression of type II toxin-antitoxin system genes in *Klebsiella pneumoniae*", **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 21, p. 51–56, 1 jun. 2020.

NESSE, L. L., OSLAND, A. M., VESTBY, L. K. "The Role of Biofilms in the Pathogenesis of Animal Bacterial Infections", **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 608, 28 fev. 2023.

OIE. Leptospirosis. In: OIE (Ed.). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal**. OIE ed. Paris, França.: OIE, 2021. p. 1–13.

OLSEN, I. "Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance", **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 877–886, 29 maio 2015.

PAHO (2021). Pan American Health Organization. Antimicrobial Resistance. <https://www.paho.org/en/topics/antimicrobial-resistance> [accessed October 19, 2023]

PAZ, L. N., DE MORAES, L., SANTOS, L. A., *et al.* "Insights into host-pathogen interaction based on the comparison of genomes of *Leptospira interrogans* isolated from dogs, humans, and a rodent in the same epidemiological context: A one health approach", **Heliyon**, v. 11, n. 1, p. e41531, 15 jan. 2025.

- PAZ, L. N., DIAS, C. S., ALMEIDA, D. S., *et al.* "Multidisciplinary approach in the diagnosis of acute leptospirosis in dogs naturally infected by *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae: A prospective study", **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 77, p. 101664, 1 ago. 2021.
- PAZ, L. N., DIAS, C. S., CARVALHO, V. M. P. de, *et al.* "Unusual case of polyarthritis and hepatorenal syndrome associated with *Leptospira interrogans* infection in a dog: A case report", **Research in Veterinary Science**, v. 134, p. 186–190, 1 jan. 2021.
- PEDERSEN, R. R., KRÖMKER, V., BJARNSHOLT, T., *et al.* "Biofilm Research in Bovine Mastitis", **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 7 maio 2021.
- PEI, K., OU, J., HUANG, J., *et al.* "*p*-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities", **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 9, p. 2952–2962, 25 jul. 2016.
- PELLING, H., NZAKIZWANAYO, J., MILO, S., *et al.* "Bacterial biofilm formation on indwelling urethral catheters", **Letters in Applied Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 277–293, 21 abr. 2019.
- PERCIVAL, S. L., HILL, K. E., MALIC, S., *et al.* "Antimicrobial tolerance and the significance of persister cells in recalcitrant chronic wound biofilms", **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 14 jan. 2011.
- PERCIVAL, S. L., MALIC, S., CRUZ, H., *et al.*, "Introduction to Biofilms". [S.l.: s.n.], 2011. p. 41–68.
- PICARDEAU, M., "*Leptospira* and Leptospirosis". [S.l.: s.n.], 2020. p. 271–275.
- PUTZ, E. J., NALLY, J. E. "Investigating the Immunological and Biological Equilibrium of Reservoir Hosts and Pathogenic *Leptospira*: Balancing the Solution to an Acute Problem?", **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 14 ago. 2020.
- PYE, C. C., YU, A. A., WEESE, J. S. "Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility *in vitro*", **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 4, p. 446, 5 ago. 2013.
- RATET, G., VEYRIER, F. J., FANTON D'ANDON, M., *et al.* "Live Imaging of Bioluminescent *Leptospira interrogans* in Mice Reveals Renal Colonization as a Stealth Escape from the Blood Defenses and Antibiotics", **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. e3359, 4 dez. 2014.
- REAGAN, K. L., SYKES, J. E. "Diagnosis of Canine Leptospirosis", **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 49, n. 4, p. 719–731, 1 jul. 2019.
- RESSNER, R. A., GRIFFITH, M. E., BECKIUS, M. L., *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.
- RICARDO, T., AZÓCAR-AEDO, L. I., PREVITALI, M. A., *et al.* "Seroprevalence of pathogenic *Leptospira* serogroups in asymptomatic domestic dogs and cats: systematic review and meta-analysis", **Frontiers in Veterinary Science**, v. 11, 16 fev. 2024.

- RISTOW, P., BOURHY, P., KERNEIS, S., *et al.* "Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires", **Microbiology**, v. 154, n. 5, p. 1309–1317, 2008.
- SAMROT, A. V., SEAN, T. C., BHAVYA, K. S., *et al.* "Leptospiral Infection, Pathogenesis and Its Diagnosis - A Review", **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 145, 1 fev. 2021.
- SANT'ANNA, R., VIEIRA, A. S., GRAPIGLIA, J., *et al.* "High number of asymptomatic dogs as leptospiral carriers in an endemic area indicates a serious public health concern", **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 9, p. 1852–1854, 3 jul. 2017.
- SANTOS, A. A. N., RIBEIRO, P. dos S., DA FRANÇA, G. V., *et al.* "*Leptospira interrogans* biofilm formation in *Rattus norvegicus* (Norway rats) natural reservoirs", **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 9, p. e0009736, 8 set. 2021.
- SANTOS, J. C. de A., DE VASCONCELOS, I. F. F., NOGUEIRA, D. B., *et al.* "New insights on *Leptospira* sp. infection in ewes maintained in field semiarid conditions", **Acta Tropica**, v. 234, p. 106610, 1 out. 2022.
- SAUER, K., STOODLEY, P., GOERES, D. M., *et al.* "The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation", **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 608–620, 3 out. 2022.
- SCHULLER, S., FRANCEY, T., HARTMANN, K., *et al.* "European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats", **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 3, p. 159–179, 6 mar. 2015.
- SHARMA, D., MISBA, L., KHAN, A. U. "Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities", **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 76, 16 dez. 2019.
- SHARMA, S., MOHLER, J., MAHAJAN, S. D., *et al.* "Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment", **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1614, 19 jun. 2023.
- SHIMIZU, T., HARADA, K. "Determination of minimum biofilm eradication concentrations of orbifloxacin for canine bacterial uropathogens over different treatment periods", **Microbiology and Immunology**, v. 61, n. 1, p. 17–22, 14 jan. 2017.
- SIQUEIRA, G. H., DE SOUZA, G. O., HEINEMANN, M. B., *et al.* "The role of Lsa23 to mediate the interaction of *Leptospira interrogans* with the terminal complement components pathway", **Microbial Pathogenesis**, v. 112, p. 182–189, 1 nov. 2017.
- SOHN-HAUSNER, N., KMETIUK, L. B., DA SILVA, E. C., *et al.* "One Health Approach to Leptospirosis: Dogs as Environmental Sentinels for Identification and Monitoring of Human Risk Areas in Southern Brazil", **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 9, p. 435, 6 set. 2023.
- SOUZA, E. L. de, MEIRA, Q. G. S., BARBOSA, I. de M., *et al.* "Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers", **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 67–75, 2014.
- STEWART, P. "Prospects for Anti-Biofilm Pharmaceuticals", **Pharmaceuticals**, v. 8, n. 3, p. 504–511, 27 ago. 2015.

- STEWART, P. S., WILLIAM COSTERTON, J. "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms", **The Lancet**, v. 358, n. 9276, p. 135–138, jul. 2001.
- SUEPAUL, S. M., CARRINGTON, C., CAMPBELL, 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, mar. 2015.
- SURDEL, M. C., ANDERSON, P. N., HAHN, B. L., *et al.* "Hematogenous dissemination of pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* in a short-term murine model of infection", **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 18 jul. 2022.
- SYKES, J. E., FRANCEY, T., SCHULLER, S., *et al.* "Updated ACVIM consensus statement on leptospirosis in dogs", **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 37, n. 6, p. 1966–1982, 20 nov. 2023.
- TAKAHASHI, M. B., TEIXEIRA, A. F., NASCIMENTO, A. L. T. O. "Host Cell Binding Mediated by *Leptospira interrogans* Adhesins", **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 15550, 8 dez. 2022.
- THIBEAUX, R., SOUPÉ-GILBERT, M.-E., KAINIU, M., *et al.* "The zoonotic pathogen *Leptospira interrogans* mitigates environmental stress through cyclic-di-GMP-controlled biofilm production", **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 6, n. 1, p. 24, 12 jun. 2020.
- TOKUMON, R., SEBASTIÁN, I., HUMBEL, B. M., *et al.* "Degradation of p0071 and p120-catenin during adherents junction disassembly by *Leptospira interrogans*", **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, 15 set. 2023.
- TREMBLAY, Y. D. N., LABRIE, J., CHÉNIER, S., *et al.* "*Actinobacillus pleuropneumoniae* grows as aggregates in the lung of pigs: is it time to refine our *in vitro* biofilm assays?", **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 756–760, 28 jul. 2017.
- TROTT, D. J., ABRAHAM, S., ADLER, B. "Antimicrobial Resistance in *Leptospira*, *Brucella*, and Other Rarely Investigated Veterinary and Zoonotic Pathogens", **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, 27 jul. 2018.
- VERDEROSA, A. D., TOSIKA, M., FAIRFULL-SMITH, K. E. "Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review", **Frontiers in Chemistry**, v. 7, 28 nov. 2019.
- VINCENT, A. T., SCHIETTEKATTE, O., GOARANT, C., *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. e0007270, 23 maio 2019.
- VINOD KUMAR, K., LALL, C., RAJ, R. V., *et al.* "Coexistence and survival of pathogenic leptospire by formation of biofilm with *Azospirillum*", **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 6, p. fiv051, 1 jun. 2015.
- VINOD KUMAR, K., LALL, C., VIMAL RAJ, R., *et al.* "Molecular detection of pathogenic leptospiral protein encoding gene (lipL32) in environmental aquatic biofilms", **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 311–315, 1 abr. 2016.
- VINOD KUMAR, K., LALL, C., VIMAL RAJ, R., *et al.* "Overexpression of heat shock GroEL stress protein in leptospiral biofilm", **Microbial Pathogenesis**, v. 102, p. 8–11, 1 jan. 2017.

- VINOD KUMAR, Kirubakaran, LALL, C., RAJ, R. V., *et al.* "In Vitro Antimicrobial Susceptibility of Pathogenic *Leptospira* Biofilm", **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 7, p. 511–514, 1 out. 2016.
- VINOD KUMAR, Kirubakaran, LALL, C., VIMAL RAJ, R., *et al.* "Can Subminimal Inhibitory Concentrations of Antibiotics Induce the Formation of Biofilm in *Leptospira* ?", **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 7, p. 1040–1042, 1 set. 2018.
- WALTERS, M. C., ROE, F., BUGNICOURT, A., *et al.* "Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 317–323, 1 jan. 2003.
- WHO (2019). World Health Organization. Ten threats to global health in 2019. <https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019> [accessed May 10, 2020]
- WUNDER, E. A., FIGUEIRA, C. P., BENAROUDJ, N., *et al.* "A novel flagellar sheath protein, FcpA, determines filament coiling, translational motility and virulence for the *Leptospira* spirochete", **Molecular Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 457–470, 24 ago. 2016a.
- WUNDER, E. A., FIGUEIRA, C. P., SANTOS, G. R., *et al.* "Real-Time PCR Reveals Rapid Dissemination of *Leptospira interrogans* after Intraperitoneal and Conjunctival Inoculation of Hamsters", **Infection and Immunity**, v. 84, n. 7, p. 2105–2115, jul. 2016b.
- XU, J. G., HU, H. X., CHEN, J. Y., *et al.* "Comparative study on inhibitory effects of ferulic acid and p-coumaric acid on *Salmonella* Enteritidis biofilm formation", **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 8, 1 ago. 2022. DOI: 10.1007/s11274-022-03317-1.
- YAMANAKA, A., KOUCHI, T., KASAI, K., *et al.* "Inhibitory effect of cranberry polyphenol on biofilm formation and cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*", **Journal of Periodontal Research**, v. 42, n. 6, p. 589–592, 18 dez. 2007.
- YAZICI, B. C., BAKHEDDA, N., AKÇELIK, N. "Effect of nisin and p-coumaric acid on autoinducer-2 activity, biofilm formation, and sprE expression of *Enterococcus faecalis*", **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 601–608, 17 jun. 2023.
- ZHAO, A., SUN, J., LIU, Y. "Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies", **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, 6 abr. 2023.
- ZUERNER, R. L., "Host Response to *Leptospira* Infection". **Journal of Biological Education**, [S.l: s.n.], 2015. v. 25. p. 223–250.

## ANEXOS

Anexo A – Termo de consentimento livre e esclarecido



Universidade Federal da Bahia  
Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Hospital de Medicina Veterinária  
Laboratório de Bacterioses



### AUTORIZAÇÃO

Eu, abaixo assinado, na qualidade de responsável pelo animal supra citado, autorizo a Prof. Dra. **Melissa Hanzen Pinna Valentim** (ou qualquer outro profissional por ela designado(a), a realizar procedimentos abaixo especificados:

	SIM	NÃO
1. Aplicação de questionário	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Coleta de sangue	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Coleta de urina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Utilizar informações em trabalhos didáticos e/ou pesquisas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Registro de imagens do animal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### TERMO DE COMPROMISSO

Certifico ainda que li a presente autorização e compreendi as vantagens e possíveis complicações que me foram explicadas pelo Médico Veterinário responsável.

Salvador, \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_

---

Assinatura



**Universidade Federal da Bahia**  
**Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia**  
**Comitê de Ética no Uso de Animais**  
 Av. Ademar de Barros, 500 – Ondina-40170-110 Salvador-BA  
 (071) 3283-6701/6702/6718  
[ceua.ufba@ufba.br](mailto:ceua.ufba@ufba.br)



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Abordagem multidisciplinar para o diagnóstico da leptospirose em cães naturalmente infectados”, registrada com o nº 06/2021, sob a responsabilidade do (a) Prof. (a) **Melissa Hanzen Pinna Valentim**, e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, em reunião de 25.05.2021.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa <input type="checkbox"/> Extensão
Vigência da autorização	01/08/2021 à 01/08/2023
Espécie/linhagem/raça	Canis familiaris (cão)
Nº de animais	100
Peso/Idade	Variado/variado
Sexo	Ambos
Origem	Hospital de Medicina Veterinária Renato R. de Medeiros Neto – UFBA. Av. Adhemar de Barros, 500 – Ondina, Salvador –BA. CEP: 40170110

Salvador, 05/06/2021

LÚCIO LEOPOLDO ARAGÃO DA SILVA  
 Coordenador CEUA/MEVZ



**Universidade Federal da Bahia**  
**Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia**  
**Comitê de Ética no Uso de Animais**  
 Av. Milton Santos, 500 – Ondina-40170-110 Salvador-BA  
 Fone: (071) 3283-6701/6702/6718  
 E-mail: [ceua.emevz@ufba.br](mailto:ceua.emevz@ufba.br)



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Ômicas e histotecnologia do biofilme de *Leptospira interrogans* por cepas autóctones em infecção aguda”, registrada com o nº 93/2023, sob a responsabilidade do(a) Pesquisador(a)/Professor(a) Melissa Hanzen Pinna Valentim, e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, em reunião de 28/08/2023.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa ( ) Extensão
Vigência da autorização	28/08/2023 À 28/08/2025
Espécie/linhagem/raça	<i>Mesocricetus auratus</i> (Hamster sírio)
Nº de animais	30
Peso/idade	90-110g / 6 semanas
Sexo	Ambos
Origem	Biotério de experimentação da empresa LABOVET - Produtos Veterinários. Av. Banco do Nordeste - 22 Centro, Centro Industrial Subaé - Feira de Santana/ Bahia. CIS - Cep: 44.010-665 - Caixa Postal: 363

### ATENÇÃO: Prazos definidos no Regimento Interno da CEUA/EMEVZ

#### Relatório final

Art. 29 – Finalizado o projeto de ensino, pesquisa e/ou extensão, o coordenador deverá enviar em até 90 (noventa) dias após o término da vigência do projeto que consta no certificado emitido pela CEUA/EMEVZ, ou no caso dos planos de ensino regulares a cada 4 (quatro) anos, o Anexo II – Relatório de projeto certificado pela CEUA/EMEVZ preenchido (disponível na página oficial da CEUA/EMEVZ) ao e-mail oficial da CEUA/EMEVZ.

#### Renovação do projeto

Art. 30 – Para solicitação de renovação de protocolo de ensino, pesquisa e/ou extensão, o coordenador deverá encaminhar o Anexo III - Formulário de solicitação de renovação de protocolo CEUA/EMEVZ preenchido (disponível na página oficial da CEUA/EMEVZ) ao e-mail oficial da CEUA/EMEVZ, no mínimo 60 (sessenta) dias antes a data de término prevista no certificado emitido pela CEUA/EMEVZ.

Salvador, 28/08/2023

LÚCIO LEOPOLDO ARAGÃO DA SILVA  
 Coordenador CEUA/EMEVZ

Anexo D - Localização geográfica dos locais de moradia dos caninos a partir dos quais foram obtidos os isolados de *Leptospira* na cidade de Salvador, Bahia, Brasil.

**Figura Suplementar 1** - Representação, por bairro, dos domicílios de residência dos tutores dos animais C20, C29, C51 e C82.



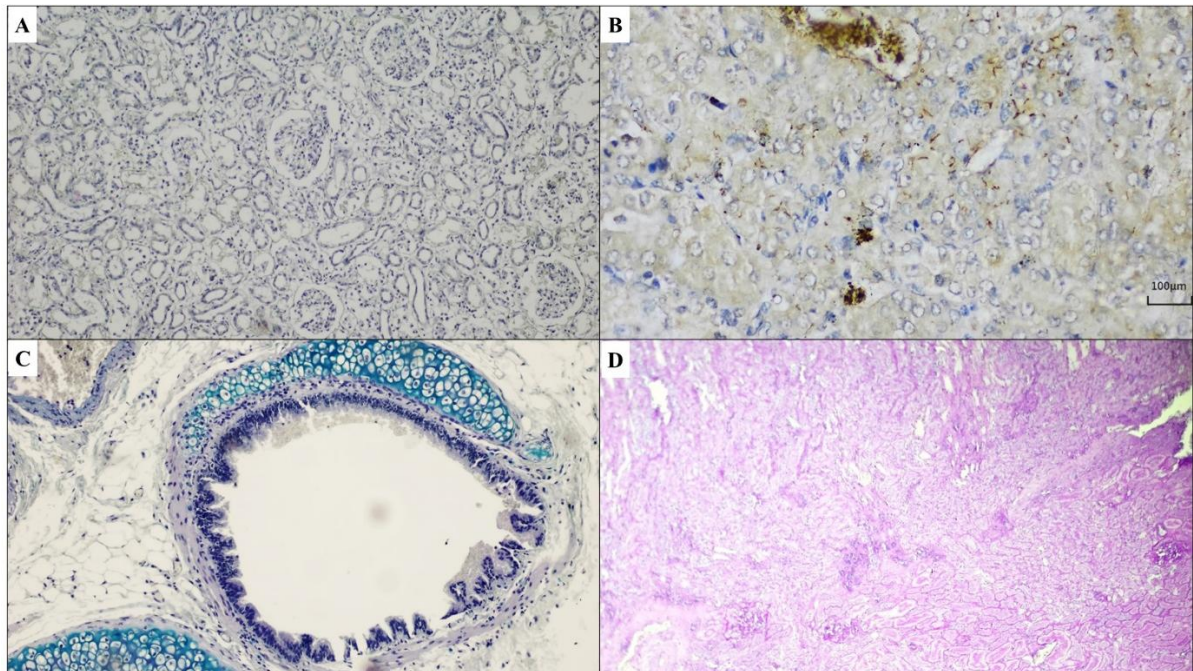
C20: Bairro Engomadeira, Salvador, BA.

C29: Engenho Velho da Federação, Salvador, BA.

C51: São Caetano, Salvador, BA.

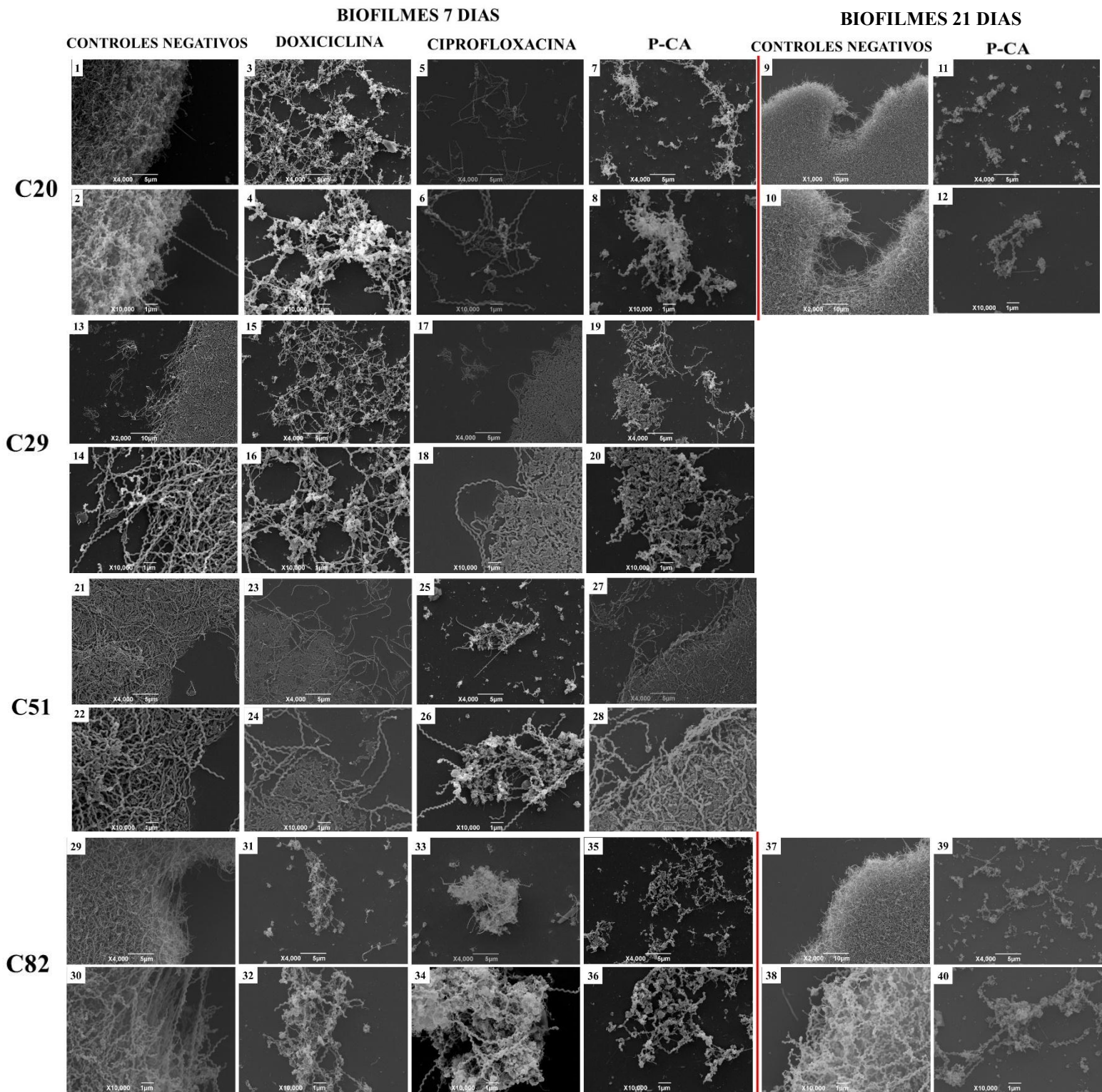
C82: Engenho Velho de Brotas, Salvador, BA.

ANEXO E - Controles positivos e negativos das reações de imunohistoquímica e colorações de AA e PAS.



(A) Controle negativo para reação de Imunohistoquímica anti-LipL32, parênquima renal de cão não infectado. Magnificação 100 X. (B) Controle positivo para reação de imunohistoquímica anti Lip-L32 em parênquima renal de hamster sírio dourado infectado com a cepa C20 (*L. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae). Magnificação 400 X. (C) Controle positivo para coloração de mucopolissacarídeos em cartilagem de brônquio, em parênquima pulmonar de hamster sírio dourado. Magnificação 4000 X. (D) Controle positivo para coloração de membranas tubulares em parênquima renal de cão. Magnificação 100 X.

ANEXO F - Fotomicrografias representativas de Microscopia Eletrônica de Varredura dos efeitos disruptivos comparativos da doxiciclina, ciprofloxacina e ácido p-cumárico na arquitetura de biofilmes maduros (7 e 21 dias) das cepas C20, C29, C51 e C82 de *L. interrogans*.



(1) e (2) Controle Negativo C20. (3) E (4) C20, doxiciclina (800 µh/mL). (5) e (6) C20, ciprofloxacina (800 µh/mL). (7) e (8) C20, p-CA (400 µh/mL). (9) e (10) Controle Negativo C20. (11) e (12) C20, p-CA (800 µh/mL). (13) e (14) Controle Negativo C29. (15) e (16) C29, doxiciclina (1600 µh/mL). (17) e (18) C20, ciprofloxacina (800 µh/mL). (19) e (20) C29, p-CA (200 µh/mL). (21) e (22) Controle Negativo C51. (23) e (24) C51, doxiciclina (800 µh/mL). (25) e (26) C51, ciprofloxacina (800 µh/mL). (27) e (28) C51, p-CA (200 µh/mL). (29) e (30) Controle Negativo, C82. (31) e (32) C82, doxiciclina (800 µh/mL). (33) e (34) C82, ciprofloxacina (800 µh/mL). (35) e (36) C82, p-CA (200 µh/mL). (37) e (38) Controle Negativo, C82. (39) e (40) C82, p-CA (800 µh/mL).

ANEXO G - Publicações científicas e artigos submetidos derivados desta tese, de minha autoria.



Applied and Environmental  
Microbiology



Antimicrobial Chemotherapy | Minireview

## *Leptospira* biofilms: implications for survival, transmission, and disease management

Carla Silva Dias,<sup>1</sup> Melissa Hanzen Pinna<sup>1</sup>

**AUTHOR AFFILIATION** See affiliation list on p. 7.

**ABSTRACT** Leptospirosis is a zoonotic disease caused by *Leptospira* bacteria, affecting humans and a broad range of wild and domestic animals in diverse epidemiological settings (rural, urban, and wild). The disease's pathogenesis and epidemiology are complex networks not fully elucidated. Epidemiology reflects the One Health integrated approach of environment–animal–human interaction, causing severe illness in humans and animals, with consequent public health burdens. Saprophytic and pathogenic leptospires have been shown to form biofilms *in vivo*, *in vitro*, and in environmental samples. Biofilms are characterized by a polymeric matrix that confers protection against hostile environments (both inside and outside of the host), favoring bacterial survival and dissemination. Despite its significance, the role of this bacterial growth mode in leptospiral survival, transmission, and decreased antibiotic susceptibility remains poorly understood and underexplored. Even so, the literature indicates that biofilms might be correlated with lower antimicrobial susceptibility and chronicity in leptospirosis. In this minireview, we discuss the aspects of biofilm formation by *Leptospira* and their significance for epidemiology and therapeutic management. Understanding the current scenario provides insight into the future prospects for biofilm diagnosis, prevention, and treatment of leptospirosis.

**KEYWORDS** biofilm, *Leptospira*, leptospirosis, antimicrobial resistance, chronic infection

Leptospirosis is a widespread zoonosis, impacting diverse populations and ecosystems, with over 1.03 million human cases estimated globally (1). Leptospirosis is caused by environmentally ubiquitous bacteria of the genus *Leptospira* and affects humans and various animal species, which can be either incidental hosts or chronic carriers. The disease plays a significant role at the human–animal–environment interface, leading to important consequences for One Health (2, 3).

Leptospirosis is multisystemic, but despite progress in studying *Leptospira*–host interactions, the various mechanisms of infection and pathogenesis remain incompletely understood (4). One mechanism involved in renal colonization is the formation of bacterial biofilms, which favors immune evasion, chronic colonization, and antibiotic resistance (5–7).

Biofilms are communities of bacteria organized as aggregates protected by an extracellular polymeric substance (EPS) (8). Biofilm growth involves a complex process that helps bacteria persist in the environment and hosts, making infections harder to treat and prevent. Therefore, understanding how *Leptospira* form biofilms and identifying the research gaps are key to developing more assertive strategies for biofilm detection, prevention, and control of leptospirosis. This is especially crucial in endemic areas where leptospirosis poses a significant public health burden.

**Editor** Christopher A. Elkins, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA

Address correspondence to Melissa Hanzen Pinna, melissahp@ufba.br.

The authors declare no conflict of interest.

See the funding table on p. 8.

**Published** 10 January 2025

Copyright © 2025 Dias and Pinna. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

ANEXO H - Publicações científicas em que, durante o período do doutorado, colaborei como autor ou coautor.



Research article

## Biofilm formation *in vitro* by *Leptospira interrogans* strains isolated from naturally infected dogs and their role in antimicrobial resistance

Rodrigo Rezende Mires de Carvalho <sup>a</sup>, Carla Silva Dias <sup>a</sup>, Lucas Nogueira Paz <sup>a</sup>, Thainá Melo de Lima Fires <sup>b</sup>, Cláudio Pereira Figueira <sup>c</sup>, Karine Araújo Damasceno <sup>d</sup>, Melissa Hanzen Pinna <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Bacterial Disease Laboratory, Postgraduate Program in Animal Science in Tropics – Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>b</sup> Postgraduate Program in Clinic and Surgery of Domestic Carnivores – Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>c</sup> Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Ministry of Health, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>d</sup> Laboratory of Experimental Pathology, Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords

*Leptospira* spp.  
Biofilm  
Broth microdilution  
Antimicrobial resistance

### ABSTRACT

*Leptospira interrogans* is a biofilm-forming pathogen, however, there are few data involving Brazilian strains isolated from dogs and their antimicrobial sensitivity in planktonic and biofilm forms. The potential for biofilm formation and antimicrobial resistance in naturally infected dogs is a fundamental approach towards disease epidemiology and the establishment of consistent prophylaxis and control measures. The objective of this study was to evaluate *in vitro* biofilm formation of a reference strain (*L. interrogans*, sv. Copenhageni L1 130 - L20) and of *L. interrogans* isolated from dogs (C20, C29, C51, C82), with subsequent evaluation of antimicrobial susceptibility in planktonic and biofilm forms. The semi quantification of biofilm production revealed a dynamic process of development over time, with mature biofilm formation early on the seventh day of incubation. All strains were efficient for *in vitro* biofilm formation and, in this form, they were considerably more resistant compared to their planktonic form, with MIC<sub>50</sub> of 1600 µg/mL for amoxicillin, 800 µg/mL for ampicillin, and > 1600 µg/mL for doxycycline and ciprofloxacin. The strains studied were isolated on naturally infected dogs that might act as reservoirs and sentinels for human infections. The potential of antimicrobial resistance together with the close relation between dogs and humans indicates the need for greater actions on disease control and surveillance. Moreover, biofilm formation may contribute to the persistence of *Leptospira interrogans* in the host and these animals can act as chronic carriers, disseminating the agent in the environment.

\* Corresponding author. Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Production, Universidade Federal da Bahia, Av. Milton Santos, 500, Ondina, Salvador, Bahia, CEP: 40170-110, Brazil.

E-mail addresses: [rodrigo.rezendevet@outlook.com](mailto:rodrigo.rezendevet@outlook.com) (R. Rezende Mires de Carvalho), [carlaosli@gmail.com](mailto:carlaosli@gmail.com) (C. Silva Dias), [lucanpaz@hotmail.com](mailto:lucanpaz@hotmail.com) (L. Nogueira Paz), [thainafires.medvet@hotmail.com](mailto:thainafires.medvet@hotmail.com) (T. Melo de Lima Fires), [claudio.pereira@fiocruz.br](mailto:claudio.pereira@fiocruz.br) (C. Pereira Figueira), [karine.damasceno@fiocruz.br](mailto:karine.damasceno@fiocruz.br) (K. Araújo Damasceno), [melissalp@ufba.br](mailto:melissalp@ufba.br) (M. Hansen Pinna).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13002>

Received 22 September 2022; Received in revised form 8 February 2023; Accepted 13 February 2023

Available online 16 February 2023

2405-0440/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



Contents lists available at ScienceDirect

## Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cimid](http://www.elsevier.com/locate/cimid)

## Multidisciplinary approach in the diagnosis of acute leptospirosis in dogs naturally infected by *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae: A prospective study

Lucas Nogueira Paz<sup>a</sup>, Carla Silva Dias<sup>a</sup>, Daniela Santos Almeida<sup>a</sup>, Ilana Teruszkin Balassiano<sup>b</sup>, Marco Alberto Medeiros<sup>c</sup>, Federico Costa<sup>d,e,f,g</sup>, Danielle Nascimento Silva<sup>h</sup>, Joice Neves Reis<sup>i</sup>, Alessandra Estrela-Lima<sup>h</sup>, Camila Hamond<sup>a</sup>, Melissa Hanzen Pinna<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Bacterial Disease Laboratory, Postgraduate Program in Animal Science in Tropics - Federal University of Bahia, Adhemar de Barros av, 500, 40170-110, Salvador, BA, Brazil

<sup>b</sup> Bacterial Zoonoses Laboratory, Leptospirosis National Reference Center/Leptospira collection, WHO/PAHO Collaborating Center for Leptospirosis, Department of Bacteriology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Brazil av, 4365, 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Recombinant Technology, Rio-Manguinhos, Brazilian Ministry of Health, FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup> Collective Health Institute, UFPA, Raulo da Gama st, 40110-000, Camaela, Salvador, BA, Brazil

<sup>e</sup> Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Salvador, Brazil

<sup>f</sup> Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, Liverpool, UK

<sup>g</sup> Department of Epidemiology of Microbial Disease, Yale School of Public Health, New Haven, CT, USA

<sup>h</sup> Department of Anatomy, Pathology and Veterinary Clinical Medicine, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>i</sup> Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy, Federal University of Bahia / UFPA, Salvador, Bahia, Brazil

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Azotemia  
Canine  
Leptospirosis  
Nephritis

## ABSTRACT

Leptospirosis, a zoonotic disease with worldwide distribution, is caused by spirochetes of the genus *Leptospira*. In dogs, this disease is frequently misdiagnosed. Few studies have attempted to associate the detection of *Leptospira* spp. infection with clinicopathological and renal histopathological findings using a multidisciplinary approach. The present study isolated and characterized *Leptospira* spp. obtained from naturally infected dogs and described relevant clinical and histopathological findings. Blood and urine were collected from 57 dogs with clinical symptomatology suggestive of leptospirosis; 38 cases were confirmed by PCR in urine or by culture or microscopic agglutination testing (titers  $\geq 800$ ). A total of 12 strains of pathogenic *Leptospira* were isolated from the studied dogs (seven in blood, four in urine and one in both blood and urine samples). All isolates were characterized as *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae. Of the confirmed cases, almost one-third of the animals had been vaccinated. Our analysis of laboratory testing revealed that azotemia and proteinuria were statistically significant predictors of infection. The main histopathological findings seen in kidney tissues were necrosis, degeneration, tubular regeneration, mononuclear inflammatory infiltrate and congestion. A multidisciplinary approach involving clinicopathological and histopathological characterization of renal involvement can aid in the identification of acute leptospirosis infection.

## 1. Introduction

Leptospirosis, a neglected tropical disease caused by spirochetes of the genus *Leptospira* [1], can greatly impact the health of both humans and animals. Dogs face significant exposure to leptospires, due to high contact with rodents and contaminated environments. The clinical diagnosis of canine leptospirosis is often hampered by non-specific signs

of infection, and the severity of disease is directly linked to individual immune response [2]. The most frequent clinical signs of leptospirosis include fever, prostration, jaundice, abdominal pain, vomiting, polyuria/polydipsia and anuria/oliguria [3–5].

Infective serovars vary among canine populations in accordance with exposure to infected animals (wild or domestic), reservoir species and geographic region [6,7]. The determination of this information is

\* Corresponding author.  
E-mail address: [melissahp@ufba.br](mailto:melissahp@ufba.br) (M.H. Pinna).

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101664>

Received 14 December 2020; Received in revised form 5 April 2021; Accepted 14 April 2021

Available online 7 May 2021

0147-9571/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.



## Unusual case of polyarthritis and hepatorenal syndrome associated with *Leptospira interrogans* infection in a dog: A case report

Lucas Nogueira Paz<sup>a</sup>, Carla Silva Dias<sup>a</sup>, Vitor Moraes Pina de Carvalho<sup>b</sup>, Caterina Muramoto<sup>c</sup>, Alessandra Estrela-Lima<sup>b</sup>, Melissa Hanzen Pinna<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Bacterial Disease Laboratory (LABAC) - Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Production, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Veterinary Pathology - Department of Anatomy, Pathology and Veterinary Clinics, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>c</sup> Diagnostic Imaging - Department of Anatomy, Pathology and Veterinary Clinics, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Leptospirosis  
Canine  
Infective arthritis  
Diagnosis

### ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by spirochetal bacterial of the genus *Leptospira* affecting virtually all mammals. The infection has a broad range of effects, from mild clinical manifestation to multiple organ failure, and ultimately death. A 5-months-old male unvaccinated dog was admitted to the University Veterinary Teaching Hospital presenting dullness, dehydration, jaundiced mucous, bloody diarrhea, vomiting, and hyporexia. Microscopic agglutination test (MAT) detected serological titers of 1:1.600 for serogroup Canicola. After five days of monitoring by the medical team he developed fever and swelling of carpal and tarsal joints, accompanied by functional limitation. Initial antimicrobial treatment was instituted for leptospirosis. Polyarthritis responsiveness to glucocorticoid therapy was observed through decreasing signs of inflammation of the affected joints. The diagnosis of leptospirosis was further confirmed by molecular investigation for *Leptospira* spp. on blood and synovial fluid samples. Amplification and sequencing of the *secY* partial gene characterized the infective bacterial as *Leptospira interrogans*. From the 7th day the respiratory condition worsened and on Day 14 the patient evolved to death, when necropsy and histological evaluation were performed. Prominent anatomopathological findings included: fibrinous polyarthritis, bronchointerstitial pneumonia, intense hepatocyte dissociation, cholestasis, and periportal multifocal hepatitis, diffuse acute tubular necrosis, and significant dystrophic mineralization in the renal parenchyma, lungs, and atrial endocardium. Here, we present a case report of systemic clinical manifestations polyarthritis associated with the presence of leptospires in the synovial fluid. We highlight the need for richer knowledge about the different clinical manifestations of leptospirosis.

### 1. Introduction

Leptospirosis is a widely distributed zoonotic disease caused by spirochetes of the genus *Leptospira* (Coats et al., 2015). Pathogenic leptospires infection in dogs can be accompanied by a wide range of clinical manifestations, however, acute kidney injury, hepatic impairment, pulmonary hemorrhage, and hemorrhagic diathesis are most commonly reported (Schuller et al., 2015b). Institution of early diagnosis and therapy can increase survival rates by approximately 80%, contrarily, in more severe cases mortality rates can reach 70% (Kohn et al., 2010).

Human and animal literature described unusual manifestations of leptospirosis with variable respiratory signs and consequent pulmonary

hemorrhage syndrome (Schönfeld et al., 2019; S Schuller et al., 2015a, 2015b). Other reported affections include nervous system manifestations (Tomacruz et al., 2019), pancreatitis (Daher et al., 2003; Schuller et al., 2015a), gastric disease with intussusception (Schweighauser et al., 2009), and reproductive disorders with consequent abortion and infertility (Rooseni et al., 2005; Schuller et al., 2015b). Kidney insufficiency and dysfunction are common characteristics in canine leptospirosis, consequences of interstitial tubular nephritis, glomerulonephritis, vasculitis and decreased renal perfusion (Goldstein, 2010; Schuller et al., 2015b). The literature described an unusual and rare case of human multiorgan dysfunction manifestation of leptospirosis involving acute myocarditis, pancreatitis, polyarthritis, mononeuritis multiplex, and severe vasculitis with necrosis of the extremities (Panagopoulos

\* Corresponding author at: School of Veterinary Medicine and Zootecny, Federal University of Bahia, Adhemar de Barros Avenue, 500, Salvador, Bahia 40170-110, Brazil.

E-mail addresses: [lucaspaz@hotmail.com](mailto:lucaspaz@hotmail.com) (L.N. Paz), [cmuramoto@ufba.br](mailto:cmuramoto@ufba.br) (C. Muramoto), [melissahp@ufba.br](mailto:melissahp@ufba.br) (M.H. Pinna).

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.12.006>

Received 19 August 2020; Received in revised form 8 December 2020; Accepted 18 December 2020

Available online 22 December 2020

0034-5288/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.