



C A P Í T U L O 2

Protocolo Experimental *in vivo* para Testes Antibacterianos e de Potencialização de Antibióticos em *Danio rerio* (Zebrafish)

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.540132510112>

José Weverton Almeida-Bezerra

Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato – CE, Brasil

Adrielle Rodrigues Costa

Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato – CE, Brasil

Lucas dos Santos Sa

Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato – CE, Brasil

Rizelle de Oliveira Barros

Universidade Federal do Cariri – UFCA, Crato – CE, Brasil

Mikael Amaro de Souza

Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato – CE, Brasil

Vanessa Lima-Bezerra

Universidade Federal do Cariri – UFCA, Crato – CE, Brasil

Ademar Maia Filho

Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato – CE, Brasil

Cícera Natalia Figueirêdo Leite Gondim

Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato – CE, Brasil

Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins

Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato – CE, Brasil

João Pereira da Silva Junior

Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato – CE, Brasil

Jefferson de Sales Diodato

Universidade Federal do Cariri – UFCA, Crato – CE, Brasil

Olívia Caroline Maia De Moura

Universidade Federal do Cariri – UFCA, Crato – CE, Brasil

Gabriel Gonçalves Alencar

Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato – CE, Brasil

Janaína Esmeraldo Rocha

Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato – CE, Brasil

Henrique Douglas Melo Coutinho

Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato – CE, Brasil

RESUMO: A crescente resistência microbiana tem impulsionado a busca por compostos de origem natural ou sintética com atividade antimicrobiana ou capazes de potencializar a ação de antibióticos. Nesse contexto, o modelo *in vivo* utilizando o peixe *Danio rerio* (Zebrafish) tem ganhado destaque, devido à sua elevada homologia genética com os seres humanos e à resposta imunológica bem caracterizada. Assim, este capítulo propõe a padronização de um protocolo experimental *in vivo* para a avaliação da atividade antibacteriana e do potencial sinérgico de substâncias naturais e sintéticas, utilizando exemplares adultos de Zebrafish como modelo biológico. O protocolo inclui a criação e aclimatação dos animais, preparação dos meios de cultura e inóculo bacteriano, definição de concentrações dos compostos testados com base na Concentração Inibitória Mínima (MIC), e procedimentos de infecção intramuscular. Além disso, inclui o tratamento o tratamento oral com antibióticos, produtos avaliados ou suas combinações com os antibióticos em concentrações subinibitórias. Além disso, o protocolo apresenta as técnicas de eutanásia dos animais, bem como a dissecação dos tecidos e sua forma de semeio. Com isso, este protocolo permite avaliar a eficácia terapêutica de compostos em um ambiente biológico real, considerando fatores de absorção, metabolismo e resposta imune, que não são possíveis de serem observados em ensaios *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVES: Infecção experimental, Resistência microbiana, Ensaios pré-clínicos, Farmacodinâmica experimental.

In vivo Experimental Protocol for Antibacterial and Antibiotic Potentiation Testing in *Danio rerio* (Zebrafish)

ABSTRACT: The increasing microbial resistance has driven the search for compounds of natural or synthetic origin with antimicrobial activity or capable of potentiating the action of antibiotics. In this context, the *in vivo* model using the *Danio rerio* fish (zebrafish) has gained prominence due to its high genetic homology with humans and its well-characterized immunological response. Thus, this chapter proposes the standardization of an *in vivo* experimental protocol for evaluating the antibacterial

activity and synergistic potential of natural and synthetic substances, using adult zebrafish as a biological model. The protocol includes the breeding and acclimatization of the animals, preparation of culture media and bacterial inoculum, definition of concentrations of the tested compounds based on the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and intramuscular infection procedures. It also includes oral treatment with antibiotics, evaluated products, or their combinations with antibiotics at subinhibitory concentrations. Furthermore, the protocol presents techniques for animal euthanasia, as well as tissue dissection and plating methods. Therefore, this protocol allows the evaluation of the therapeutic efficacy of compounds in a real biological environment, considering factors of absorption, metabolism, and immune response, which are not possible to observe in *in vitro* assays.

KEYWORDS: Experimental infection, Microbial resistance, Pre-clinical trials, Experimental pharmacodynamics.

INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de fármacos antimicrobianos pela humanidade acarretou na seleção de microrganismos resistentes, um problema conhecido mundialmente como resistência microbiana (RAM) desde a década de 1940 (Nadeem et al., 2020; Salam et al., 2023). Infelizmente, a problemática vem se agravando ao longo das últimas décadas, com a inclusão de antimicrobianos na pecuária como promotores de crescimento e preventivos de doenças, prática que contribui significativamente para o surgimento e disseminação de bactérias resistentes (Endale et al., 2023; Nowakiewicz et al., 2020).

Isso tem acarretando no surgimento de Bactérias multirresistentes (MDR - Multidrug-resistant), que são microrganismos resistentes a três ou mais classes de antibióticos e outros antimicrobianos tem aumentado exponencialmente em um curto espaço de tempo (Catalano et al., 2022). Com isso, a busca por compostos com atividade antimicrobiana tem aumentado nos últimos anos, visando contornar a resistência microbiana (Vaou et al., 2021; Álvarez-Martínez et al., 2020). O foco tem dos estudos se concentram em atividades antibacterianas *in vitro*, e infelizmente não avançam para estudos *in vivo* devido a uma série de fatores, como éticos, financeiros, mão de obra qualificada e especializada (Theuretzbacher et al., 2023).

Como alternativa para o avanço nesses estudos, um modelo animal que surge é o *Danio rerio* (Zebrafish) para ensaios de avaliação de atividade antimicrobiana (Kotova et al., 2023). Esta espécie é um pequeno peixe teleósteo listrado de ambiente aquático doce, e é caracterizado por apresentar uma alta homologia genética com os seres humanos, chegando a 70% de similaridade, bem como similaridade genética. Além disso, outras vantagens estão associadas ao uso dessa espécie

modelo biomédico, dentre elas está o genoma totalmente sequenciado, a facilidade de manipulação do seu genoma, a alta fecundidade da espécie, fácil manejo, o curto tempo de geração que é em torno de 3 meses, o rápido desenvolvimento embrionário (1 dia) e a fertilização ser externa (Howe et al., 2013; Teame et al., 2019). Além disso, é bastante acessível manter um grande número de peixes em um espaço de laboratório relativamente pequeno, quando comparado a roedores (Teame et al, 2019).

Levando isso em consideração, diversos pesquisadores têm utilizado o zebrafish como modelo experimental para a indução de infecções e para a avaliação da atividade antibacteriana (Souza et al., 2023; Cruz et al., 2026; Batista et al., 2023; Neely et al., 2002). Com base então no princípio dos “3 Rs” (substituição (replace), redução e refinamento), em que este princípio recomenda a substituição de vertebrados por animais com menor potencial de percepção da dor, como o caso do zebrafish (Ameen-Ali; Allen, 2024), este trabalho teve como objetivo propor um Procedimento Operacional Padrão *in vivo* para testes antibacterianos e de potencialização de antimicrobianos em *Danio rerio* com leve alterações do protocolos utilizados atualmente.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

Criação de Zebrafish

Após aprovação no Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), peixes adultos devem ser acondicionados em aquário com no mínimo 30 L de água desclorada. Para desclorar a água, primeiro meça a quantidade desejada em litros utilizando um balde graduado. Em seguida, adicione o produto Protect Plusm da Labcon® gota a gota e agite vigorosamente por 60 segundos para garantir uma distribuição uniforme. Utilize 4 gotas para cada litro de água. Permita que a água descanse por um período de 1 hora. Após o repouso, meça o pH e a temperatura da água, visando alcançar um pH ideal de 7 e uma temperatura de 25 °C (Figura 01).



Figura 01: Decloração da água.

Após isso, adicionar cuidadosamente os peixes ao aquário o qual deve conter um filtro biológico com carvão aditivada. Os peixes deverão ser mantidos em ciclo claro/escuro de 14:10. A dieta é fornecida *ad libitum* (à vontade), utilizando a ração Spirulina da Alcon®. Recomenda-se disponibilizar uma quantidade que seja completamente consumida em até cinco minutos, de duas a quatro vezes ao dia. O pH deve ser monitorado diariamente (Figura 02).



Figura 02: Quarentena de Zebrafish.

1º DIA DE TESTE

Preparo de meios de cultura

Inicialmente, contabilizar o número de placas de Petri que serão utilizadas no ensaio. Em seguida, preparar o meio de cultura realizando a diluição conforme as instruções do fabricante do Ágar BHI (*Brain Heart Infusion* – Agar). O meio deve ser devidamente pesado e diluído em água destilada em um Erlenmeyer, o qual deve ser tampado com algodão e coberto com papel alumínio. Após a autoclavagem, dentro da cabine de segurança biológica, distribuir o meio esterilizado nas placas de Petri, podendo-se utilizar tanto placas de vidro previamente esterilizadas quanto placas descartáveis. As placas devem permanecer descobertas durante o processo. Em seguida, ligar a luz UVB e aguardar a completa solidificação do meio (Figura 03). Após esse processo, as placas devem ser embaladas com filme plástico e armazenadas sob refrigeração.



Figura 03: Preparação de BHI ágar.

Para um teste mais preciso, o pesquisador pode optar por utilizar meios seletivos e diferenciais. Para *Staphylococcus aureus* pode ser utilizado meio Manitol Salt Agar (MSA), para *Escherichia coli* o meio Eosin Methylene Blue Agar (EMB) e *Pseudomonas aeruginosa* o meio Cetrimide Agar.

Autoclavação do material

No 1º dia os materiais (Tabela 01) devem ser embalados em papel madeira e esterilizados em autoclave por 15 min a 121 °C (Figura 04). Para operar a autoclave,

comece adicionando água da torneira no fundo do equipamento. Em seguida, coloque o cesto contendo os materiais a serem autoclavados, tais como vidrarias, utensílios, meios de cultura e água destilada. Feche a tampa da autoclave e ligue-a na configuração máxima. Aguarde até que a água comece a ferver e o gotejamento se inicie. Uma vez que isso ocorrer, feche a válvula e aguarde até que a temperatura atinja 121 °C. Assim que essa temperatura for alcançada, reduza para a temperatura mínima e cronometre 15 minutos antes de finalizar o ciclo. Por fim, desligue a autoclave, abra a válvula de vapor, até a saída completa deste. Abra a tampa e retire o seu material esterilizado. Tome cuidado, pois estarão em alta temperatura.

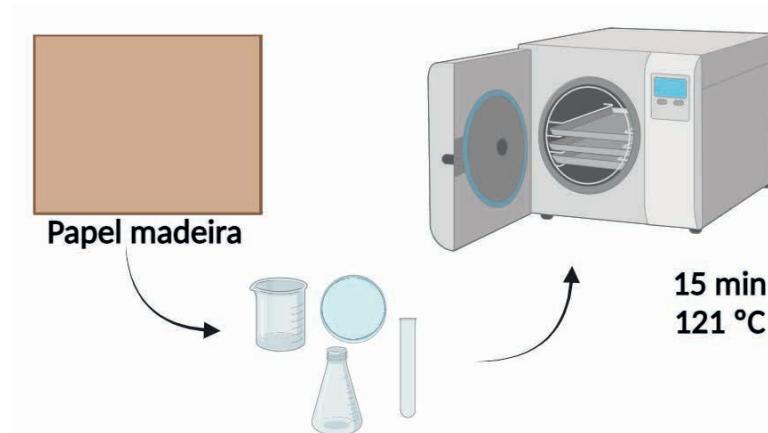


Figura 04: Esterilização do material.

Ítem	Quantidade
Pistilo de microtubo azul (1,5 mL) –	80 un
Esponja de lavar louça cortadas (apenas região amarela cortada)	4 un
Ponteiras brancas (10 μ L)	3 caixas
Ponteiras amarelas (200 μ L)	3 caixas
Ponteiras azuis (1.000 μ L)	3 caixas
Microtubos (1,5 mL)	1 pote grande cheio
Microtubos (2,0 mL)	1 pote grande cheio
Placas de Petri Grande	2 pares
Placas de Petri Média	38 pares

Papel alumínio cortado em tamanho 4 cm x 4 cm	50 un
Pinça curva	1 un
Tubos de ensaio contendo 4 mL de salina	5 un
Tubos Falcon 15 mL	8 un
Tubos Falcon 50 mL	10 un
Tubo rosqueável tampa azul com água destilada	200 mL
Água destilada	300 mL
Alça de drigalski	8 un
BHI-Ágar	

Tabela 01 - Lista de material a ser autoclavado.

Preparação do PBS

Retire uma pastilha do frasco de PBS que está no armário de reagentes, utilizando uma pinça esterilizada. Proceda então à dissolução da pastilha em um Erlenmeyer previamente esterilizado, contendo 200 mL de água destilada estéril. Após a dissolução, etiquete o recipiente de forma adequada e armazene-o na geladeira, garantindo as condições ideais de conservação.

Gelo

Para garantir uma refrigeração eficaz, coloque o termogel gelo *rígido* reutilizável no congelador por pelo 12 horas antes de utilizar. Além disso, para preparar uma reserva adicional de gelo, recomenda-se encher os recipientes de sorvete com água e colocá-los no congelador até que as pedras de gelo estejam formadas e prontas para uso (Figura 05).

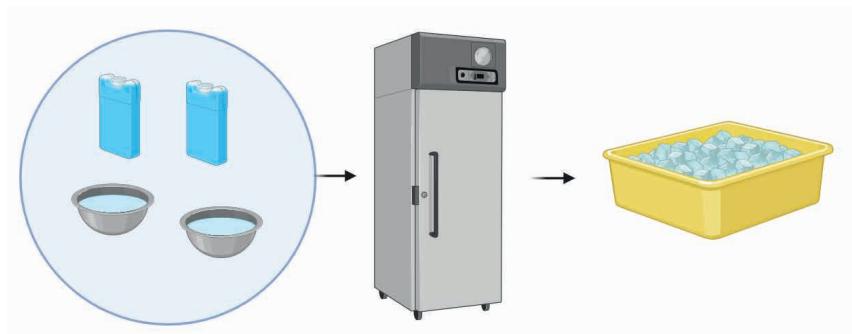


Figura 05: Preparação de gelo.

Cálculo das concentrações de drogas/substâncias a serem empregadas no teste

Para realizar o ensaio de atividade antibacteriana *in vivo* inicialmente tem que conferir os resultados *in vitro* do produto e antibiótico, neste caso a MIC. A partir destes avaliamos frente ao modelo *in vivo*, sendo então considerado o valor da MIC do antibiótico como referência e para a potencialização o MIC do produto em avaliação em concentração sub-inibitória (MIC/8). Abaixo estão os cálculos para a preparação da droga, através da fórmula:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2:$$

Onde:

C_1 = Concentração inicial

V_1 = Volume inicial

C_2 = Concentração final

V_2 = Volume final

- **Concentração de 1024 µg/mL**

Pesamos 10 mg na balança (0,010 g) e diluímos em 1 mL de DMSO. Chegando a concentração inicial de 10.000 µg/mL. Fazendo então uma solução mãe (Figura 06).

Dessa forma:

$$C=M/V$$

Logo,

$$1024 \mu\text{g/mL} = 10.000 \mu\text{g/V}$$

$$V = 10.000/1024$$

$$V = 9,765 \text{ mL}$$

Em uma solução final de 9,765mL deve haver DMSO a aproximadamente 10%

Então: 0,010g de **antibiótico/produto + 1 mL de DMSO + 8,765 mL de H₂O destilada estéril**.



Figura 06: Preparo de solução de produtos e antibióticos.

Cultivo dos micro-organismos

Inicialmente será realizado o semeio da bactéria em placa de Petri contendo Ágar Brain Heart Infusion (BHI). Para tanto, com o auxílio da alça de níquel cromo colete da placa de estoque a cepa correspondente do teste e realize o seu semeio na nova placa de acordo com a figura 07. Posteriormente, acondicione em estuda por 24 h a 37 °C (Figura 08).

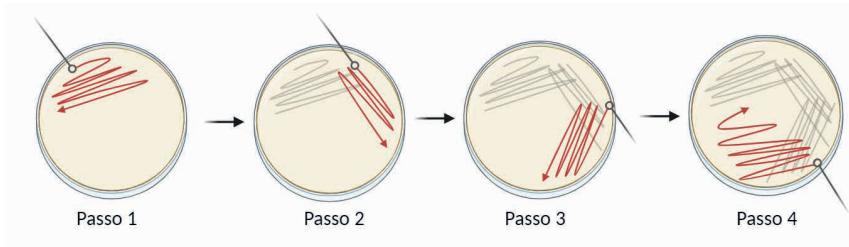


Figura 07: Método de semeio de microrganismo em placa de Petri contendo meio sólido.

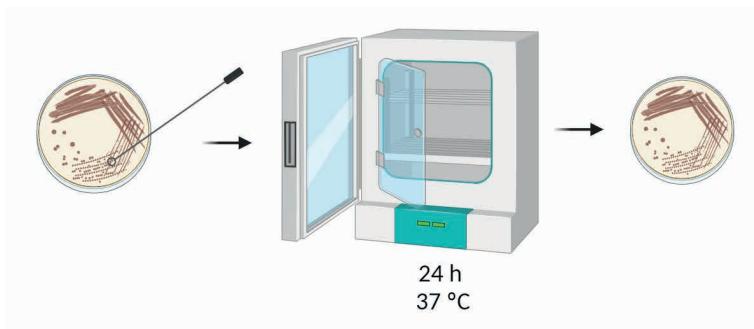


Figura 08: Cultivo dos micro-organismos.

2º DIA DE TESTE

1ª Etapa: Preparo do inóculo

Após o período de incubação, será preparado o inóculo bacteriano na escala 1 de McFarland, o que corresponde a uma densidade de aproximadamente 1×10^8 células por mL, em solução salina estéril. Para este fim, serão coletadas amostras das placas incubadas contendo a cultura bacteriana, utilizando a alça de inoculação e transferidos para tubos de ensaio contendo a salina. Posteriormente, retirar 100 μ L do inóculo e transferir para uma placa de microdiluição e levar ao espectrofotômetro para medir a densidade óptica. Esta deve ser realizada no comprimento de onda de 630 nm e atingir **0,300** (Figura 09).

Se a absorbância for $>0,300$, deve-se adicionar mais salina.

Se a absorbância for $<0,300$, deve-se adicionar mais cultura de bactérias.

Repetir a leitura no Elisa. Até alcançar 0,300.



Figura 09: Preparo dos inóculos.

2ª Etapa: Infecção em modelo adulto de Zebrafish:

- 1º - Colocar água desclorada em duas caixas organizadoras.
- 2º - Colocar gelo e termômetro.
- 3º - Monitorar a temperatura até alcançar de 12 °C a 15 °C.
- 4º - Colocar o peixe na água e observar a redução dos seus movimentos (Ficará de cabeça para baixo).
- 5º - Retirar o peixe com ajuda da rede.
- 6º - Conter ele na esponja contendo água gelada (Figura 10).

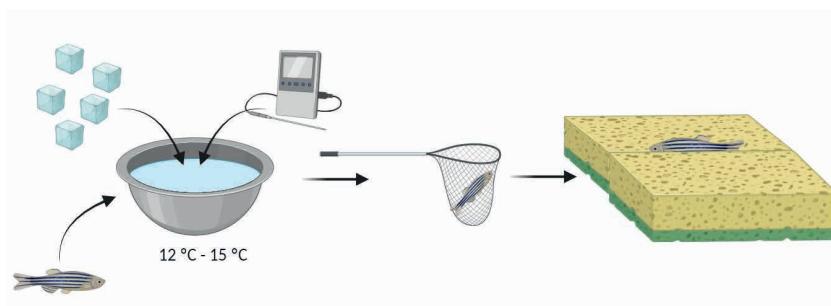


Figura 10: Anestesia e conteção de Zebrafish.

- 7º - Inocular com 10 µL de inóculo via intramuscular com auxílio de seringa de insulina. Obs.: Fazer primeiro o controle não infectado, contendo apenas salina.
- 8º - Inserir a agulha em um ângulo de 45º em relação à coluna vertebral, em posição imediatamente anterior e lateral à nadadeira dorsal.
- 9º - A agulha deve ser inserida até o final do bisel.

10º - A agulha deve ser mantida 5 segundos antes de ser retirada (Figura 11).

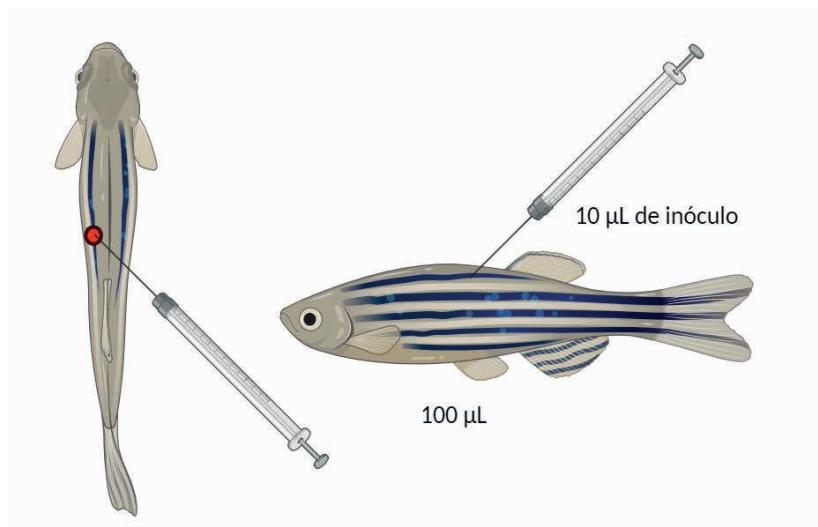


Figura 11: Infecção em Zebrafish anestesiado.

11º - Aclimatar os peixes em copos distintos com 250 mL de água desclorada autoclavada e identificados durante 4 h. Deixe os copos tampados.

12º - Após esse período tratar oralmente os peixes.

13º - Retirar com cuidado o peixe da água.

14º - Tratar oralmente com 20 μL do produto ou antibiótico. Podendo ser feita com pipeta automática (Figura 12).

15º - Retorne o peixe ao copo.

16º: Aguardar 24 h.

17º: Colocar mais água para congelar.

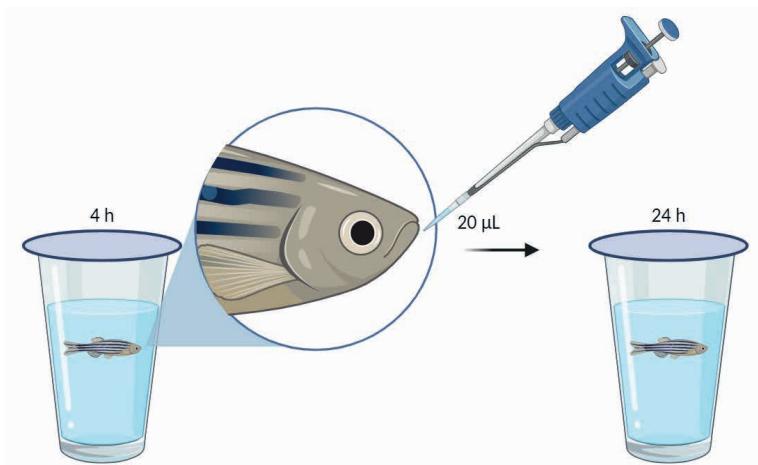


Figura 12: Tratamento oral com produto em teste ou antibiótico.

3º Dia de teste

- 1º- Distribuir 1000 μ L de PBS em eppendorfs de 1,5 mL.
- 4º- Colocar água gelada em caixa organizadora (0°C a 4°C).
- 5º- Colocar peixe imerso na água com gelo até a perca dos movimento opérculares (Figura 13).
- 6º- Abrir papel alumínio no tamanho do peixe dentro do fluxo.
- 7º- Tranferir o peixe para a cabine de biossegurança.

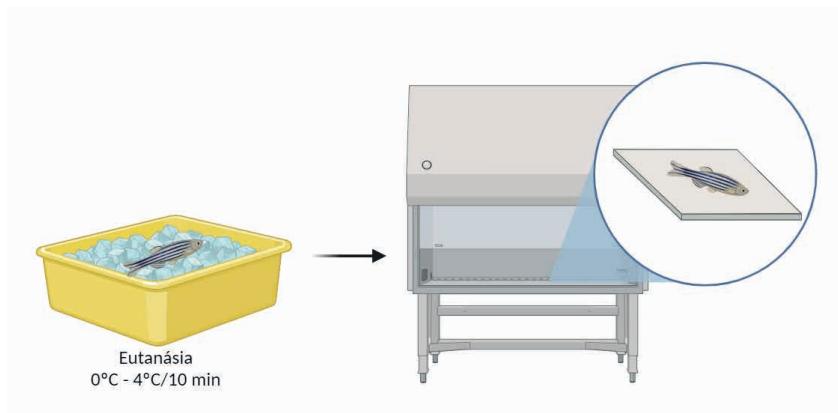


Figura 13: Eutanásia de Zebrafish.

- 8º- Dissecar com o bisturi o dorso do peixe (Figura 14).
- 9º- Transferir com a pinça estéril para eppendorf de 1,5 mL contendo 1000 μ L de PBS. Fechar o eppendorf e levar à cabine do lado.
- 10º- Homogeneizar dentro da câmara com pistilo de microtubo até alcançar a mesma consistência.

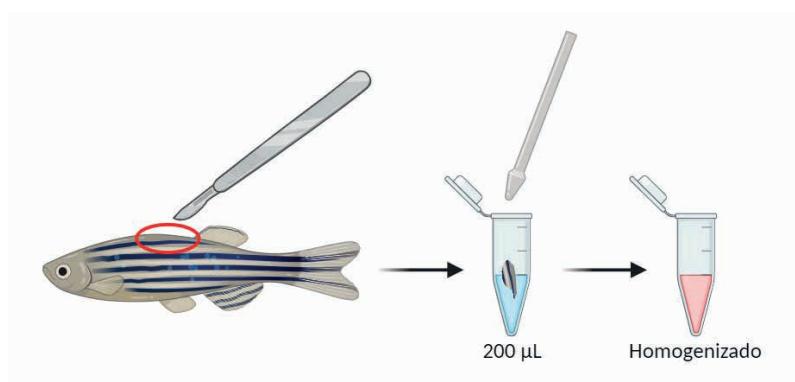


Figura 14: Dissecção e homogeneização de material biológico.

- 11º- Dobrar o papel alumínio e descartar o peixe contaminado para a flamax.

12º- Adicionar 500 μ L de PBS no microtubo com macerado e homogeneizar.

13º - Realizar microdiluição em microtubos (Figura 15).

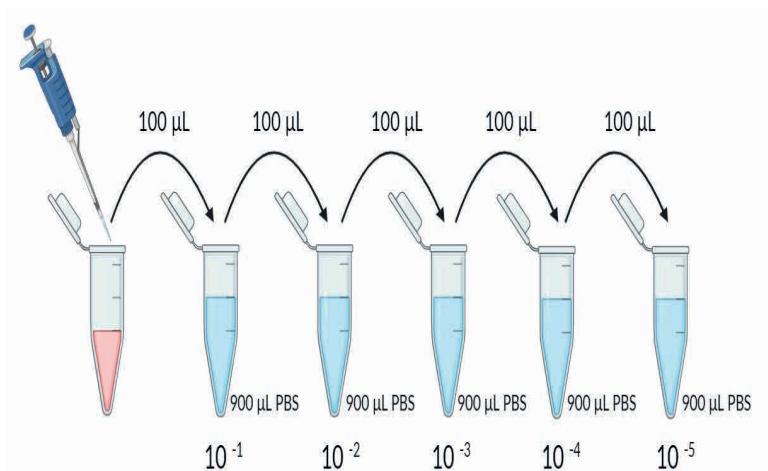


Figura 15: Microdiluição em PBS.

14º - Pegar 100 μ L da última solução e espalhar com alça de drigalski o homogeneizado (Figura 16).

15º- Realizar semeio em placa de Petri contendo ágar BHI.

16º- Colocar em estufa a 37 °C por 24 h.

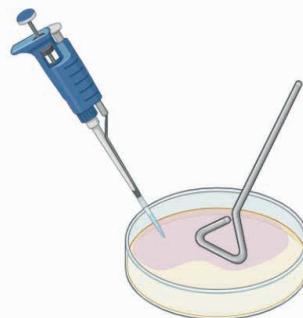


Figura 16: Semeio em placa de Petri.

4º Dia de teste

1º - Realizar a contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) (Figura 17).

2º - Realizar cálculo das UFC/mL seguindo a fórmula:

$$UFC / mL = \frac{N}{V \times D}$$

onde:

N = número de colônias contadas na placa

V = volume inoculado na placa (em mL)

D = fator de diluição da amostra (exemplo: $10^{-3}=0,001$)

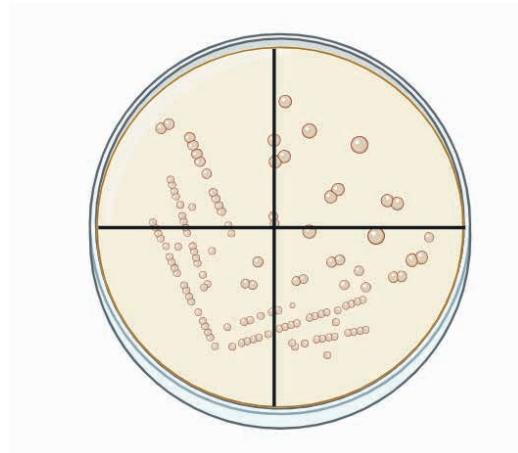


Figura 17: Leitura de unidades formadoras de colônias (UFC) em placa de Petri.

REFERÊNCIAS

Álvarez-Martínez, F. J., Barrajón-Catalán, E., & Micol, V. Tackling antibiotic resistance with compounds of natural origin: A comprehensive review. *Biomedicines*, 8(10), 405, 2020.

Ameen-Ali, K. E., & Allen, C. The 3Rs in zebrafish research. In *Zebrafish: A Practical Guide to Husbandry, Welfare and Research Methodology* (pp. 225-250). GB: CABI. 2024

Batista, F. L. A., Andrade-Pinheiro, J. C., dos Santos, A. T. L., Lima, J. N. M., Alencar, G. G., Siqueira, G. M., Menezes, I. R. A. Comparative antimicrobial potential of *Ocimum basilicum* essential oil, estragole and estragole/β-cyclodextrin complex in an infection model on adult zebrafish. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 6, 100385, 2023

Catalano, A., Iacopetta, D., Ceramella, J., Scumaci, D., Giuzio, F., Saturnino, C., ... & Sinicropi, M. S. Multidrug resistance (MDR): A widespread phenomenon in pharmacological therapies. **Molecules**, 27(3), 616, 2022

Cruz, R. P., Almeida-Bezerra, J. W., Alves, D. S., da Silva, A. R. P., de Oliveira, M. G., Alencar, G. G., Silva, M. V. Chemical composition, antibiofilm activity, and antibacterial potential in vitro and in a zebrafish model of *Myrciaria pilosa* Sobral & Couto essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, 354, 120538, 2026.

Endale, H., Mathewos, M., Abdetta, D. Potential causes of spread of antimicrobial resistance and preventive measures in one health perspective-a review. **Infection and drug resistance**, 7515-7545, 2023.

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Teucke, M. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, 496(7446), 498-503, 2013.

Kotova, M. M., Galstyan, D. S., Kolesnikova, T. O., de Abreu, M. S., Amstislavskaya, T. G., Strekalova, T., Kalueff, A. V. Understanding CNS effects of antimicrobial drugs using zebrafish models. **Veterinary Sciences**, 10(2), 96, 2023.

Nadeem, S. F., Gohar, U. F., Tahir, S. F., Mukhtar, H., Pornpukdeewattana, S., Nukthamna, P., Massa, S. Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, 46(5), 578-599, 2020.

Neely, M. N., Pfeifer, J. D., & Caparon, M. Streptococcus-zebrafish model of bacterial pathogenesis. **Infection and immunity**, 70(7), 3904-3914, 2002.

Nowakiewicz, A., Zięba, P., Gnat, S., & Matuszewski, Ł. Last call for replacement of antimicrobials in animal production: modern challenges, opportunities, and potential solutions. **Antibiotics**, 9(12), 883, 2020.

Salam, M. A., Al-Amin, M. Y., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A., & Alqumber, M. A. Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health. **In Healthcare**, v. 11, No. 13, p. 1946, 2023.

Souza, A. B., Pinheiro, J. C. A., Soares, J. B., de Araújo, J. I. F., de Araújo, S. M. B., Batista, F. L. A., Azevedo, F. R. Antibacterial activity and anxiolytic-like effect of *Ziziphus joazeiro* Mart. leaves in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Fish and Shellfish Immunology Reports**, 5, 100108, 2023.

Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., Zhou, Z. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. **Animal Frontiers**, 9(3), 68-77, 2019.

Theuretzbacher, U., Baraldi, E., Ciabuschi, F., & Callegari, S. Challenges and shortcomings of antibacterial discovery projects. **Clinical Microbiology and Infection**, 29(5), 610-615, 2023.

Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. **Microorganisms**, 9(10), 2041, 2021.