



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia



ALINE PATRÍCIA GONÇALVES

Estudo da interação entre plaquetas e leptospiras

São Paulo

2019

ALINE PATRÍCIA GONÇALVES

Estudo da interação entre plaquetas e leptospiras

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz

De acordo: _____
Orientador

São Paulo
2019

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3798
FMVZ

Gonçalves, Aline Patrícia
Estudo da interação entre plaquetas e leptospiros / Aline Patrícia Gonçalves. – 2019.
121 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Antônia Estima Abreu de Aniz.

1. Leptospirose. 2. Leptospira. 3. Plaquetas. 4. Agregação plaquetária. 5. Atividade microbicida. I. Título.



CERTIFIED

We certify that the Research "Study of the Interaction between Platelets and Leptospira", protocol number CEUAX 6124281116 (ID 000982), under the responsibility Patrícia Antonia Estima Abreu De Abreu, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day August 15, 2018.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Estudo da Interação entre Plaquetas e Leptospiras", protocolado sob o CEUAX nº 6124281116, sob a responsabilidade de Patrícia Antonia Estima Abreu De Abreu, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 15 de agosto de 2018.

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo



São Paulo, 16 de agosto de 2018
CEUx N [6124281116](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Patrícia Antonia Estima Abreu De Abreu

Área: Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal

Título do projeto: "Estudo da Interação entre Plaquetas e Leptospiras".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 15/08/2018, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GONÇALVES, Aline Patrícia

Título: **Estudo da interação entre plaquetas e leptospiras**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Patrícia Abreu, pelo exemplo de profissionalismo, por estar sempre presente, me ensinando e esclarecendo minhas dúvidas sempre que necessário, muito obrigada pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao Dr. Marcelo Larami Santoro, do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, que abriu as portas de seu laboratório para que eu pudesse realizar os experimentos de agregação plaquetária. Muito obrigada por todos os ensinamentos, disponibilidade e suporte prestados para realização deste trabalho. Gostaria de agradecer também suas alunas, Jaqueline Gomes Rosa e Ana Teresa Azevedo Sachetto, que sempre me foram muito atenciosas e prestativas.

Ao Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann e sua equipe, Dra. Gisele Souza e Dr. Antônio Souza Filho do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pelo fornecimento das leptospiros.

À Dra. Márcia Regina Frazolin, do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, pelo fornecimento da cepa de *S. aureus* e ensinamentos, muito obrigada.

À Dra. Angela Barbosa, que igualmente me acolheu no laboratório, pela convivência diária, muito obrigada.

À minha família, meu pai que sempre me apoiou e meu irmão por todas as noites mal dormidas por me levar até a estação. Minhas tias, Stella e Carmen, por todo o apoio, incentivo e carinho sempre, muito obrigada.

Às colegas de laboratório Denize, Adriana, Priscila, Daniellla, Ludmila, Larissa, Júlia, Letícia e Kamila, com as quais tive o prazer em trabalhar. A

Gabriela, com quem tive uma conexão muito espontânea, com a qual posso falar sobre qualquer assunto, indicar qualquer livro ou curso online e com a qual aprendi a ser uma pessoa melhor (mas positiva), embora jamais chegue ao nível dela. Mas principalmente a Matilde, por insistir fortemente nesta amizade (melhor decisão que já tomou na vida), pelas noites de cinema, pelos dias de trilhas, pelas aventuras no trem no horário de pico, por trazer a alegria ao laboratório, meu muito obrigada.

Aos demais pesquisadores, estudantes e funcionários do Instituto Butantan, em especial ao Laboratório de Bacteriologia, por me receber tão bem e sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zoonoses da USP, por toda ajuda e trabalho prestados.

Aos professores da Universidade de São Paulo com que tive o prazer em ter aulas, muito obrigada por me tornarem uma profissional melhor.

Às minhas voluntárias, sem as quais este trabalho não poderia ser realizado. Obrigada por darem o sangue pela ciência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*"O que eu amo na ciência é que quanto mais aprendemos,
menos respostas conseguimos.
O máximo que conseguimos são perguntas melhores."*

John Green

RESUMO

GONÇALVES, A. P. **Estudo da interação entre plaquetas e leptospiras**. [Study of the interaction between platelets and leptospire]. 2019. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A leptospirose é uma zoonose mundialmente disseminada e endêmica nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, que colonizam os túbulos renais proximais de animais domésticos ou silvestres e são eliminadas no ambiente externo pela urina. A transmissão ocorre por meio de contato direto com tecidos, fluidos corporais e urina de animais infectados, ou pela exposição à água ou solo contaminado. Esta doença apresenta grande impacto na saúde pública, além de ser responsável por prejuízos na economia pecuária, pois interfere na produção de leite e causa distúrbios reprodutivos nos animais de criação, como abortamentos e infertilidades. As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos, abundantes no sangue e originados dos megacariócitos da medula óssea. Classicamente, são conhecidas por atuarem no processo de hemostasia, garantindo a manutenção do fluxo sanguíneo e da integridade vascular. No entanto, vários estudos têm demonstrado que as plaquetas, também, participam de processos inflamatórios, do reparo de tecidos, da angiogênese e de mecanismos de defesa do organismo a infecções. Na forma grave da leptospirose, a trombocitopenia tem sido relatada. Provavelmente, os baixos níveis de plaquetas no sangue ocorrem devido à lesão vascular e ao aumento no consumo de plaquetas nas hemorragias observadas durante a infecção por leptospiras. A trombocitopenia também pode ser causada pela ação direta das leptospiras sobre as plaquetas. Neste trabalho, foi investigado a existência de uma possível interação das leptospiras com as plaquetas. Os resultados obtidos, mostraram que os protocolos utilizados para a obtenção das amostras de sangue total, plasma rico em plaquetas e plaquetas lavadas são adequados para a avaliação da possível capacidade das leptospiras em ativar plaquetas. Entretanto, nenhuma das estirpes de leptospiras testadas foram capazes de ativar diretamente as plaquetas em um tempo máximo de 45 minutos, mesmo com diferentes proporções de bactéria:plaqueta. As leptospiras também foram avaliadas quanto a sua capacidade de alterar a agregação plaquetária provocada por agonistas conhecidos

(colágeno, TRAP ou ADP). Apesar da agregação plaquetária na presença das leptospiras serem semelhantes ou maiores que o controle positivo, esses valores não foram estatisticamente significantes. Um lisado total da estirpe patogênica de leptospira, L1-130, foi avaliado quanto a capacidade de se ligar a lisados de diferentes frações plaquetárias, previamente ativadas ou não por ADP, através de ensaios de ELISA. O lisado da fração de plaquetas lavadas foi o único que apresentou valores significativos de interação com o lisado de L1-130. Por último, as plaquetas foram avaliadas quanto a sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano, com o indicador de crescimento Resazurina. Estes ensaios não foram capazes de identificar uma ação microbicida por parte das plaquetas sobre a estirpe de leptospira utilizada. Os resultados obtidos, neste trabalho, mostraram que as leptospiras não foram capazes de ativar diretamente a agregação plaquetária, porém, a hipótese de interação entre as plaquetas e as leptospiras não deve ser totalmente descartada, uma vez que a fração de plaquetas lavadas foi capaz de aderir ao lisado da estirpe L1-130, por isso novos estudos devem ser realizados.

Palavras-chave: Leptospirose. Leptospira. Plaquetas humanas. Agregação plaquetária. Atividade microbicida.

ABSTRACT

GONÇALVES, A. P. **Study of the interaction between platelets and leptospire.** [Estudo da interação entre plaquetas e leptospiras]. 2019. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Leptospirosis is a widespread and endemic zoonosis in the tropical and subtropical regions of the world. It is caused by pathogenic spirochetes of the *Leptospira* genus, which colonize the proximal renal tubules of domestic or wild animals and are excreted in the environment by the urine. Transmission occurs through the direct contact with tissues, body fluids, and urine of infected animals, or through the exposure to contaminated water or soil. This disease has a great impact on public health, besides being responsible for losses in the livestock economy, because it interferes in the milk production and causes reproductive disorders in the livestock, such as abortion and infertility. Platelets are small cytoplasmic fragments, abundant in the blood and originated from the megakaryocytes of the bone marrow. Classically, they are known to act in the process of hemostasis, ensuring the maintenance of the blood flow and the vascular integrity. However, several studies have shown that platelets also participate in inflammatory processes, tissue repair, angiogenesis and mechanisms of defense of the body to infections. In severe form of leptospirosis, thrombocytopenia has been reported. Probably, low platelet levels in the blood occur due to the vascular injury and the platelet increase consumption in the bleeds observed during leptospiral infection. Thrombocytopenia can also be caused by the direct action of leptospire on platelets. In this work, it was investigated the existence of a possible interaction between leptospire and human platelets. The results showed that the protocols used to obtain the samples of whole blood, platelet rich plasma and washed platelets are adequate for the evaluation of the possible ability of leptospire to activate platelets. However, none of the leptospira strains tested were able to directly activate the platelets in a maximum time of 45 minutes, even with different proportions of bacterium:platelet. Leptospire were also evaluated for their ability to alter platelet aggregation caused by known agonists (collagen, TRAP or ADP). Although platelet aggregation in the presence of leptospire was similar to or greater than the positive control, these values were not

statistically significant. The total lysate of the pathogenic strain of leptospira, L1-130, was evaluated for the ability to bind to lysates of different platelet fractions, previously activated or not by ADP, by ELISA. The lysate of the washed platelets fraction was the only that presented significant values of interaction with the L1-130 lysate. Finally, platelets were evaluated for their ability to inhibit bacterial growth, with the Resazurin growth indicator. These assays were not able to identify a microbicidal action by the platelets on the leptospira strain used. The results obtained in this work shown that leptospires were not able to directly activate platelet aggregation, however, the hypothesis of interaction between platelets and leptospires should not be totally discarded, since some the washed platelet lysate was able to bind to the strain L1-130 lysate, so further studies should be carried out.

Keywords: Leptospirosis. Leptospira. Human platelets. Platelet aggregation. Microbicidal activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ilustração do disco de Dinger	24
Figura 2 – Representação esquemática do delineamento experimental.	37
Figura 3 – Curva de agregação plaquetária obtida com a amostra de ST (voluntário 1), contendo $9,1 \times 10^7$ plaquetas na presença de $6,25 \mu\text{g/mL}$ de colágeno.....	44
Figura 4 – Curva de agregação plaquetária obtida com a amostra de ST (voluntário 2), contendo $1,3 \times 10^8$ plaquetas na presença de $12,5 \mu\text{g/mL}$ de colágeno.....	44
Figura 5 – Curva de agregação plaquetária obtida com a amostra de PRP (voluntário 2) contendo $9,3 \times 10^7$ plaquetas na presença de $2,5 \mu\text{g/mL}$ de colágeno.	46
Figura 6 – Curva de agregação plaquetária obtida com a amostra de PRP (voluntário 2), contendo $9,3 \times 10^7$ plaquetas na presença de $5 \mu\text{g/mL}$ de colágeno.	46
Figura 7 – Curva de agregação plaquetária obtida com a amostra de PL (voluntário 2) contendo $1,2 \times 10^8$ plaquetas na presença de $2,5 \mu\text{g/mL}$ de colágeno.....	47
Figura 8 – Curva de agregação plaquetária obtida com a amostra de PL (voluntário 2) contendo $1,2 \times 10^8$ plaquetas na presença de $5 \mu\text{g/mL}$ de colágeno.....	47
Figura 9 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 1), contendo $9,1 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe L1-130 e colágeno ($6,25 \mu\text{g/mL}$) como agonista.....	50
Figura 10 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com a amostra de PL (voluntário 2), contendo $1,2 \times 10^8$ plaquetas, na presença da estirpe L1-130 e colágeno ($2,5 \mu\text{g/mL}$) como agonista.	51
Figura 11 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com a amostra de ST (voluntário 2), contendo $1,3 \times 10^8$ plaquetas, na presença das estirpes Patoc e LO4 (proporção de uma leptospira para dez plaquetas) e colágeno ($12,5 \mu\text{g/mL}$) como agonista.....	53
Figura 12 – Curva de agregação plaquetária obtida com a primeira amostra de PRP (voluntário 2), contendo $9,3 \times 10^7$ plaquetas, e colágeno ($5 \mu\text{g/mL}$) como agonista.	55
Figura 13 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com a primeira amostra de PRP (voluntário 2), contendo $9,3 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpes Patoc (proporção de uma leptospira para dez plaquetas) e colágeno ($5 \mu\text{g/mL}$) como agonista.....	55
Figura 14 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com primeira amostra de PRP (voluntário 2), contendo $9,3 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe LO4 (proporção de uma leptospira para dez plaquetas) e colágeno ($5 \mu\text{g/mL}$) como agonista	56

Figura 15 – Curva de agregação plaquetária obtida com a primeira amostra de PRP (voluntário 2), contendo $9,3 \times 10^7$ plaquetas	56
Figura 16 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com a segunda amostra de PRP (voluntário 2), contendo $6,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença das estirpes Patoc e LO4 (proporção de uma leptospira para cada plaqueta) e colágeno (5 µg/mL) como agonista.....	58
Figura 17 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PL (voluntário 2), contendo $1,2 \times 10^8$ plaquetas, na presença das estirpes LO4 (proporção de uma leptospira para dez plaquetas) e colágeno (5 µg/mL) como agonista.....	59
Figura 18 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 2), contendo $1,3 \times 10^8$ plaquetas, na presença das estirpes patogênicas L1-130 e LO4 (proporção de dez leptospiros para cada plaqueta) e colágeno (12,5 µg/mL) como agonista.....	61
Figura 19 - Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 2), contendo $1,3 \times 10^8$ plaquetas, na presença das estirpes L1-130 e LO4 (proporção de dez leptospiros para cada plaqueta) e ADP (25 µM) como agonista.	62
Figura 20 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 2), contendo $1,3 \times 10^8$ plaquetas, na presença das estirpes L1-130 e LO4 (proporção de dez leptospiros para cada plaqueta) e TRAP (0,4 mM) como agonista	63
Figura 21 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 1), contendo $1,1 \times 10^8$ plaquetas, na presença das estirpes L1-130 e LO4 (proporção de uma leptospira para cada plaqueta) e colágeno (12,5 µg/mL) como agonista.....	67
Figura 22 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 1), contendo $1,1 \times 10^8$ plaquetas na presença das estirpes L1-130 e LO4 (proporção de uma leptospira para cada plaqueta) e ADP (25 µM) como agonista.	68
Figura 23 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 1), contendo $1,1 \times 10^8$ plaquetas, na presença das estirpes L1-130 e LO4 (proporção de uma leptospira para cada plaqueta) e TRAP (0,4mM) como agonista	69
Figura 24 – Curva de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 2), contendo $1,5 \times 10^8$ plaquetas e ADP (25 µM) como agonista	70
Figura 25 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 2), contendo $1,5 \times 10^8$ plaquetas, na presença de <i>S. aureus</i> . No agregômetro todos os ensaios foram realizados no canal 1 – azul, com um tempo total de 15min de registro.....	72
Figura 26 – Curva de agregação plaquetária obtida com amostras de PRP (voluntário 2), contendo $1,5 \times 10^8$ plaquetas, na presença da estirpe L1-130 (proporção de cinco leptospiros para cada plaqueta).....	73

- Figura 27** – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 3), contendo $3,9 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe L1-130. No agregômetro todos os ensaios foram realizados no canal 1 – azul.....**76**
- Figura 28** – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 3), contendo $3,9 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe L1-130 (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta) e ADP (25 μ M) como agonista. No agregômetro todos os ensaios foram realizados no canal 1 – azul**77**
- Figura 29** – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 3), contendo $3,9 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe L1-130 (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta) e colágeno (12,5 μ g/mL) como agonista. No agregômetro todos os ensaios foram realizados no canal 1 – azul.....**78**
- Figura 30** – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 4), contendo $5,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença das estirpes LO4 ou Patoc (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta)**82**
- Figura 31** – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 4), contendo $5,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença de ADP (25 μ M) ou colágeno (12,5 μ g/mL)**82**
- Figura 32** – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 4), contendo $5,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe LO4 (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta) e ADP (25 μ M) como agonista.....**83**
- Figura 33** – Curva de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 4), contendo $5,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe Patoc (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta) e ADP (25 μ M) como agonista..**83**
- Figura 34** – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 4), contendo $5,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe LO4 (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta) e colágeno (12,5 μ g/mL) como agonista.....**84**
- Figura 35** – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 4), contendo $5,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe Patoc (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta) e colágeno (12,5 μ g/mL) como agonista.....**84**
- Figura 36** – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 4), contendo $5,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe LO4 (proporção de uma bactéria para cada plaqueta) e ADP (25 μ M) como agonista.....**85**
- Figura 37** – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 4), contendo $5,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe LO4 (proporção de dez bactérias para cada plaqueta) e colágeno (12,5 μ g/mL) como agonista**85**
- Figura 38** – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 5), contendo $7,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença das estirpes patogênicas de leptospira (proporção de dez bactérias para cada plaqueta).....**88**

Figura 39 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 5), contendo $7,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença de <i>S. aureus</i> (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta).....	89
Figura 40 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 5), contendo $7,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe L1-130 (proporção de dez bactérias para cada plaqueta) e colágeno (12,5 µg/mL) como agonista.....	90
Figura 41 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 5), contendo $7,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe L1-130 (proporção de dez bactérias para cada plaqueta) e ADP (25 µM) como agonista	91
Figura 42 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 5), contendo $7,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe LO4 (proporção de dez bactérias para cada plaqueta) e ADP (25 µM) como agonista	92
Figura 43 – Curvas representativas da agregação plaquetária, em amostras de ST, induzidas por bactérias, sem a utilização de um agonista	93
Figura 44 – Curvas representativas da agregação plaquetária, em amostras de PRP, induzidas por bactérias, sem a utilização de um agonista.	94
Figura 45 – Representação dos ensaios de agregação plaquetária em amostra de PRP na presença da estirpe patogênica (L1-130), nas proporções de 1:1 e 1:10 (bactéria:plaqueta)	95
Figura 46 – Comparação entre a agregação plaquetária em amostras de PRP na presença da estirpe patogênica L1-130 (proporção de cinco leptospiros para cada plaqueta) induzida por colágeno (12,5 µg/mL)	96
Figura 47 – Comparação entre a agregação plaquetária em amostras de PRP na presença das estirpes patogênicas de leptospira (proporção de cinco leptospiros para cada plaqueta) induzida por ADP (25 µM)	97
Figura 48 – Comparação entre a agregação plaquetária em amostras de ST na presença ou ausência das leptospiros patogênicas (proporção de dez leptospiros para cada plaqueta) induzida por colágeno (12,5 µg/mL)	98
Figura 49 – Comparação entre a agregação plaquetária em amostras de ST na presença das leptospiros patogênicas (proporção de uma leptospira para cada plaqueta) e colágeno (12,5 µg/mL) como agonista	99
Figura 50 – Comparação entre a agregação plaquetária em amostras de ST na presença da estirpe patogênica (LO4) ou da estirpe saprófita (Patoc) de leptospira (proporção de uma leptospira para cada dez plaquetas) induzida por colágeno (12,5 µg/mL)	100
Figura 51 – Comparação entre a agregação plaquetária em amostras de ST na presença das estirpes patogênicas de leptospira (proporção de dez leptospiros para cada plaqueta) induzida por ADP (25 µM)	101

Figura 52 – Comparação entre a agregação plaquetária em amostras de ST na presença das estirpes patogênicas de leptospira (proporção de uma leptospira para cada plaqueta) induzida por ADP (25 µM).	102
Figura 53 – Comparação entre a agregação plaquetária em amostras de ST na presença das estirpes patogênicas de leptospira (proporção de uma leptospira para cada plaqueta) induzida por TRAP (0,4 mM)	103
Figura 54 – ELISA	108
Figura 55 – Ensaio de esterilidade dos componentes utilizados nos ensaios de atividade microbicida.....	109
Figura 56 – Ensaio de controle experimental de morte das leptospiros	110
Figura 57 – Ensaio de controle experimental de crescimento das leptospiros	111
Figura 58 – Ensaio experimental da atividade microbicida em amostras de PL contra a estirpe patogênica L1-130.....	111
Tabela 1 – Hemogramas.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ω	Ohm
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μm	Micrometros
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ACD	Ácido cítrico-citrato de sódio-dextrose
ADP	Adenosina difosfato
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina bovina sérica
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
cm	Centímetro
DIC	Coagulação intravascular disseminada
dL	Decilitro
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMJH	<i>Ellinghausen McCullough Johnson Harris</i> (meio de cultura padrão para leptospiros)
fL	Fentolitro
G	Calibre
g	Aceleração da gravidade
g	Gramas
GP	Glicoproteína
h	Hora
HCM	Hemoglobina corpuscular média

IgG	Imunoglobulina G
kDa	Kilodalton
L1-130	<i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni
LAMP	<i>Lysosomal-associated membrane protein</i>
LO4	<i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
Omp	<i>Outer Membrane Protein</i>
PAR	Receptor ativado por protease
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (tampão fosfato)
PBS-T	Tampão fosfato contendo <i>Tween 20</i>
PCT	Plaquetócrito
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDP	Plasma depletado de plaquetas
PDW	<i>Platelet distribution width</i> (amplitude de distribuição das plaquetas)
PF4	Fator 4 plaquetário
pg	Picograma
PGE ₁	Prostaglandina E1
PL	Plaqueta lavada
PLT	Plaquetas
PMPs	<i>Platelet microbicidal proteins</i>
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
RDW	<i>Red cell distribution width</i> (amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos)
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por minuto

s	Segundos
SAM	Teste de soroglutinação microscópica
SDS	Dodecil sulfato de sódio
ssRNA	RNA de fita simples
ST	Sangue total
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF	Fator de formação de crescimento
TLRs	Receptores do tipo Toll
TRAP	<i>Thrombin receptor agonist peptide</i>
TSB	Caldo de tripticaseína de soja
TXA2	Tromboxano A2
VCM	Volume corpuscular médio
VPM	Volume plaquetário médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 LEPTOSPIRA.....	24
2.2 PLAQUETAS	30
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	35
4.1.1 Leptospiras.....	35
4.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	35
4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE HUMANO	36
4.3 AVALIAÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL	37
4.4 OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETA E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DAS LEPTOSPIRAS EM ATIVAR PLAQUETAS.....	38
4.5 OBTENÇÃO DE PLAQUETAS LAVADAS E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DAS LEPTOSPIRAS EM ATIVAR PLAQUETAS.....	39
4.6 OBTENÇÃO DE PLASMA DEPLETADO DE PLAQUETAS	40
4.7 ELISA.....	40
4.8 ATIVIDADE MICROBICIDA	41
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 PADRONIZAÇÃO DE TESTES EM AGREGÔMETRO COM AMOSTRAS DE ST, PRP E PL	43
5.2 AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVAÇÃO DE PLAQUETAS HUMANAS EXPOSTAS A LEPTOSPIRAS, ATRAVÉS DO TESTE DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	48
5.2.1 Avaliação da agregação plaquetária em amostras de ST e PL, estimuladas com colágeno, na presença da estirpe patogênica de leptospira.....	48

5.2.2 Avaliação da agregação plaquetária em amostras de ST, PRP e PL, estimuladas com colágeno, na presença de uma estirpe patogênica ou uma estirpe saprófita de leptospira	52
5.2.3 Avaliação da agregação plaquetária em amostras de ST estimuladas com colágeno, ADP ou TRAP, na presença das estirpes patogênicas de leptospira	60
5.2.4 Avaliação da agregação plaquetária em amostras de ST estimuladas com colágeno, ADP ou TRAP, na presença das estirpes patogênicas de leptospira	64
5.2.5 Avaliação da agregação plaquetária em amostras de PRP estimuladas com a <i>S. aureus</i> ou com uma estirpe patogênica leptospira.....	70
5.2.6 Avaliação da agregação plaquetária em amostras de PRP, estimuladas com colágeno ou ADP, na presença de uma estirpe patogênica.....	74
5.2.7 Avaliação da agregação plaquetária em amostras de ST e PRP, estimuladas com colágeno ou ADP, na presença de uma estirpe patogênica ou uma estirpe saprófita de leptospira	79
5.2.8 Avaliação da agregação plaquetária em amostras de ST, estimuladas com colágeno ou ADP, na presença das estirpes patogênicas de leptospira.....	86
5.2.9 Comparação dos resultados obtidos com os ensaios de agregação plaquetária	92
5.3 ELISA	106
5.4 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ATIVIDADE MICROBICIDA	109
6 CONCLUSÕES	112
REFERÊNCIAS.....	113
APÊNDICE A – TABELA 1 – HEMOGRAMAS	119
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	120

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose mundialmente disseminada e endêmica nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, que colonizam os túbulos renais proximais de animais domésticos ou silvestres e são eliminadas no ambiente externo pela urina. A transmissão ocorre por meio de contato direto com tecidos, fluidos corporais e urina de animais infectados, ou pela exposição à água ou solo contaminados (BANDARA et al, 2014; ADLER, 2015). Fatores socioeconômicos e ambientais, tais como condições precárias de moradia, falta de água potável, enchentes e contato próximo com roedores e animais domésticos aumentam o risco de transmissão (HAAKE, LEVETT, 2015).

Esta doença apresenta grande impacto na saúde pública com aproximadamente 1.03 milhões de casos humanos com 59.000 mortes (COSTA et al, 2015). E, também, é responsável por prejuízos na economia pecuária, pois interfere na produção de leite devido à mastite flácida e causa distúrbios reprodutivos nos animais de criação, como abortamentos e infertilidades. Os animais que sobrevivem após o nascimento tornam-se portadores, disseminando as leptospirosas para o ambiente, além de apresentarem baixo ganho de peso e lesões nos órgãos, principalmente fígado e rins (FAINE et al, 1999; LEVETT, 2001; ADLER, MOCTEZUMA, 2010; COSTA et al, 2015).

Na forma grave da doença em humanos, a incidência da trombocitopenia pode chegar até 88% dos casos (EDWARDS et al, 1994; LOMAR, 1989). A trombocitopenia, assim como a uremia e os distúrbios da coagulação, são fatores que agravam o quadro hemorrágico observado na leptospirose humana (NICODEMO; DEL NEGRO; AMATO NETO, 1990). Em cães também é relatada uma alta incidência de trombocitopenia na leptospirose, com a presença de plaquetas gigantes, provavelmente imaturas devido à resposta rápida da medula óssea na tentativa em restabelecer o número de plaquetas (GARCIA-NAVARO; PACHALY, 1994).

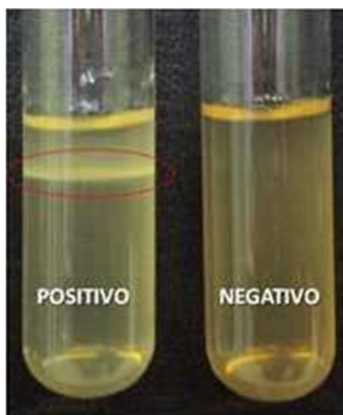
Os baixos níveis de plaquetas no sangue, possivelmente ocorrem devido à lesão vascular e ao aumento no consumo de plaquetas nas hemorragias que ocorrem durante a infecção ou pela ação direta das leptospirosas sobre as plaquetas. Portanto, uma compreensão mais abrangente da possível interação entre as plaquetas e as leptospirosas se faz necessária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEPTOSPIRA

As leptospiros são espiroquetas com 0,1 μm de diâmetro por 6-20 μm de comprimento (FAINE et al., 1999). Apresentam terminações em formato de gancho e possuem dois flagelos periplasmáticos, responsáveis por sua motilidade (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). A visualização das bactérias pode ser feita em microscópio de campo escuro ou de contraste de fase, visto que as leptospiros não se coram facilmente com corantes bacterianos convencionais (BHARTI et al., 2003). São aeróbias obrigatórias, com uma temperatura de crescimento ótimo a 28-30 °C. O crescimento primário das leptospiros é frequentemente lento e as culturas devem ser mantidas por pelo menos 13 semanas antes de serem descartadas. O meio de cultura Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) é amplamente utilizado para manutenção das culturas de leptospiros. Este é composto por ácido oleico, albumina de soro bovino e polissorbato (*Tween*), fonte de ácidos graxos de cadeia longa. Algumas cepas requerem a adição de piruvato ou soro de coelho para o isolamento inicial da bactéria. Em meio semissólido (0,1-0,2% de ágar) o crescimento atinge a máxima densidade em uma zona discreta abaixo da superfície do meio, onde se encontra a tensão ótima de oxigênio. Essa região, que se torna turbida com o passar dos dias, é conhecida como anel ou disco de Dinger (Figura 1) (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Figura 1 – Ilustração do disco de Dinger. Isolamento da leptospira, em meio semissólido de Fletcher, a partir de macerado de rim de hamsters infectados experimentalmente. O disco de Dinger (círculo em vermelho) indica o crescimento bacteriano após 42 dias.



FONTE: MONARIS, 2015.

O gênero *Leptospira* pertence à família *Leptospiraceae* da ordem *Spirochaetales* e possui 64 espécies, segundo a última classificação taxonômica descrita por Vincent e colaboradores. Dentre as quais, 17 espécies patogênicas se encontram no clado P1 (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. mayottensis*, *L. borgpetersenii*, *L. alexanderi*, *L. weilii*, *L. alstonii*, *L. dzianensis*, *L. barantonii*, *L. kmetyi*, *L. tipperaryensis*, *L. putramalaysiae*, *L. adleri*, *L. ellisii* e *L. gomenensis*), e 21 espécies se encontram no clado P2 das leptospiros patogênicas (*L. licerasiae*, *L. hartskeerlii*, *L. dzoumogneensis*, *L. venezuelensis*, *L. selangorensis*, *L. haakeii*, *L. andrefontaineae*, *L. saintgironisae*, *L. koniamboensis*, *L. neocaledonica*, *L. johnsonii*, *L. sarikeiensis*, *L. langatensis*, *L. semungkikensis*, *L. wolffii*, *L. fletcheri*, *L. fluminis*, *L. broomii*, *L. inadai*, *L. fainei* e *L. perolatii*). As espécies saprófitas de leptospiros também estão divididas em dois cladros: S1 (*L. biflexa*, *L. bouvouniensis*, *L. jelokensis*, *L. yanagawae*, *L. kemamanensis*, *L. levettii*, *L. ellinghauseni*, *L. brenneri*, *L. perdikensis*, *L. terpstrae*, *L. vanthielii*, *L. wolbachii*, *L. congkakensis*, *L. noumeaensis*, *L. kanakyensis*, *L. mtsangambouensis*, *L. bourretii*, *L. meyeri*, *L. harrisiae*, *L. bandrabouensis* e *L. montravelensis*) e S2 (*L. idonii*, *L. ilyithenensis*, *L. kobayashii*, *L. ognonensis*, *L. ryugenii*) (VINCENT et al., 2019).

As espécies do gênero *Leptospira* também são classificadas em sorovares, definidos por aglutinação após absorção com soros produzidos em coelho utilizando antígenos heterólogos. Sorovares antigenicamente relacionados são agrupados em sorogrupos. Existem cerca de 300 sorovares de leptospiros patogênicos e saprófitas descritos em 25 sorogrupos. Esta variedade antigênica se deve à heterogeneidade da estrutura na composição do lipopolissacarídeo (LPS). A classificação em sorovar é muito útil nos estudos epidemiológicos. Entretanto, os sorovares não estão relacionados com a classificação taxonômica, pois mais de uma espécie de leptospira pode ser classificada num mesmo sorovar como, por exemplo, a *L. interrogans* sorovar Hardjo e a *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo. Múltiplos sorovares podem estar dentro de uma única espécie, como *L. interrogans* sorovar Copenhageni, *L. interrogans* sorovar Pomona, *L. interrogans* sorovar Canicola entre outros (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Em geral, cada sorovar de leptospira está adaptado a uma espécie particular de hospedeiro, conhecido como reservatório, como por exemplo, a *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo e a *L. interrogans* sorovar Hardjo em bovinos, a *L. interrogans* sorovar Canicola em cães, a *L. interrogans* sorovar Pomona em suínos, e *L.*

interrogans sorovar Copenhageni em ratos, entre outros. (FAINE et al., 1999; BHARTI et al., 2003).

A leptospirose pode acometer praticamente todos os animais, nas mais diferentes regiões do mundo. Entretanto, já foi constatado que há uma diferença entre as espécies com questão a susceptibilidade, como por exemplo, os cavalos são mais susceptíveis a infecção por diversas estirpes de leptospiras e os gatos são raramente infectados (ELLIS, 2015).

Nos animais a forma mais comum de contrair a infecção é pela penetração da bactéria em membranas mucosas, como olhos, nariz, trato genital ou pela boca, no caso de predadores. Podendo ocorrer ainda a transmissão sexual e intra-uterina (ELLIS, 2015).

Assim como na leptospirose humana, a leptospirose animal muitas vezes se manifesta de forma subclínica. As leptospiras causam poucos danos a seu hospedeiro animal, exceto quando esses são jovens ou se encontram imunodeprimidos, como no caso de fêmeas no final da gestação, ou quando ocorrem juntamente com outra doença, como por exemplo, circovirose em porcos. Nos animais de produção, como bovinos, suínos e búfalos, por exemplo, há grande prejuízo econômico quando a doença ocorre no grupo mais susceptível, que são as fêmeas no período de gestação. Onde podem ocorrer abortos, partos prematuros ou o nascimento de filhotes fracos com baixo peso, quadro que pode ser agravado quando a fêmea apresenta agalaxia. A uveíte recorrente acomete com maior frequência os equinos, levando a cegueira e acabando com a carreira de animais valiosos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; COSTA et al., 2015; ELLIS, 2015; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Os animais infectados albergam as bactérias nos rins e as eliminam pela urina para o meio ambiente, promovendo assim a contaminação do solo, da água e a infecção de outros animais. Os principais reservatórios urbanos das leptospiras são os roedores sinantrópicos, como *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato-preto) e *Mus musculus* (camundongo). Nestes, a doença manifesta-se de maneira subclínica e crônica com eliminação de leptospiras através da urina (leptospiúria) durante longo período ou por toda a vida. Os animais reservatórios são a principal fonte de contaminação ambiental para o homem, esse por sua vez é considerado um hospedeiro acidental ou terminal, pois pode

desenvolver a forma clínica da doença e apresentar leptospirúria intermitente e de curta duração (FAINE et al., 1999; BHARTI et al., 2003).

A exposição humana às leptospiras pode ocorrer tanto por contato direto, com o sangue, tecidos, órgãos ou urina de animais infectados, quanto pelo contato indireto, via solo ou água contaminados com a urina de um animal infectado. A forma mais comum de contrair a doença é pelo contato indireto que pode estar associado com atividades ocupacionais, onde os trabalhadores mais acometidos são profissionais do serviço de água e esgoto, mineradores, tratadores de animais e lavradores, ou em atividades recreativas, como por exemplo, esportes aquáticos (HAAKE et al., 2002) ou triatlo (MORGAN et al., 2002). Fatores socioeconômicos e ambientais, tais como condições precárias de moradia, falta de água potável, enchentes e contato próximo com roedores e animais domésticos aumentam o risco de contaminação (HAAKE; LEVETT, 2015).

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, sendo a região dos trópicos a mais afetada, podendo ocorrer tanto em regiões desenvolvidas quanto em regiões subdesenvolvidas (BHARTI et al., 2003). Esta doença apresenta grande impacto na saúde pública com aproximadamente 1.03 milhões de casos humanos com 59.000 mortes (COSTA et al., 2015). No Brasil a leptospirose humana é uma doença endêmica, podendo ser epidêmica nos períodos chuvosos. Dados coletados até Janeiro de 2019 pelo Ministério da Saúde relatam 2.786 casos de leptospirose confirmados em todo o Brasil, sendo que as regiões mais afetadas foram as regiões sul e sudeste, com 947 e 911 casos confirmados, respectivamente. Com relação aos casos de óbitos por leptospirose foram relatados 244 casos em todo o país no mesmo período, sendo a região sudeste (120 óbitos) e nordeste (51 óbitos) as que apresentam mais casos de óbitos do país. Particularmente no estado de São Paulo, até Janeiro de 2019, foram relatados 469 casos confirmados de leptospirose, destes 78 pessoas vieram a óbito. Ainda segundo o Ministério da Saúde, a doença atinge com maior frequência homens, com idades entre 20-49 anos.

Nos humanos, as leptospiras penetram no organismo através de cortes e abrasões, por membranas mucosas como a conjuntiva, oral ou genital, ou pela ingestão de água e alimentos contaminados. A pele sadia, imersa em água por longo tempo, também possibilita a penetração das leptospiras (GODOI et al., 2005; HAAKE; LEVETT, 2015). Após a penetração através da pele, as leptospiras se disseminam pela corrente sanguínea, onde podem permanecer por mais de 7 dias.

Após essa fase de bacteremia os sintomas começam a surgir, não se sabe ao certo se sob ação de toxinas liberadas pelas leptospiras ou se por componentes celulares tóxicos. As lesões primárias acometem o endotélio de pequenos vasos sanguíneos, levando à isquemia localizada em alguns órgãos, resultando em necrose tubular renal, danos hepáticos e pulmonares, meningites e miosite. Hemorragias, icterícia e deficiência de plaquetas ocorrem em casos graves. Geralmente, há uma leve granulocitose e esplenomegalia. Uma vez que há produção de anticorpos, as leptospiras são removidas da circulação e dos tecidos por opsonofagocitose (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Os mecanismos patogênicos da leptospirose ainda não são totalmente compreendidos, principalmente devido às dificuldades encontradas na manipulação genética das leptospiras. Alguns fatores de virulência já foram descritos e incluem o LPS, o flagelo bacteriano, as proteínas heme-oxigenase, OmpA-like e Loa22, entre outras (ZUERNER, 2015). Dados experimentais têm mostrado que a patogenia da leptospirose pode estar relacionada à capacidade destas bactérias aderirem a proteínas de matriz extracelular, como colágenos I e IV, laminina e fibronectina (MERIEN et al., 2000; BARBOSA et al., 2006; CHOY et al., 2007; ATZINGEN et al., 2008; CINCO, 2010; FERNANDES et al., 2016), ou de escapar dos mecanismos de defesa apresentados pelo hospedeiro, como o sistema fagocitário e o sistema complemento (CINCO; BANFI, 1983; CINCO et al., 2002; VERMA et al., 2006; BARBOSA et al., 2009, 2010; FRAGA; BARBOSA; ISAAC, 2011; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; FRAGA; ISAAC; BARBOSA, 2016) e bem como de secretar toxinas (DOLHNIKOFF et al., 2007).

As manifestações clínicas da leptospirose humana são muito variáveis, podendo ocorrer desde quadros assintomáticos até mais graves, com a disfunção de múltiplos órgãos (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003; HAAKE; LEVETT, 2015). Na maioria dos casos, duas fases distintas de sintomas podem ser observadas. Na fase aguda ou septicêmica, o paciente apresenta febre alta, dores de cabeças e mialgias. A seguir, pode ocorrer um período com aparente melhora. Posteriormente, a fase imune inicia-se com o retorno do estado febril, produção de anticorpos aglutinantes e eliminação de leptospira pela urina. Na leptospirose grave, as manifestações como meningite, miocardite, pneumonia, hepatite ou nefrite podem ocorrer; ou ainda, provocar quadros como a disfunção hepática (icterícia), falência renal e hemorragias (principalmente pulmonar), tríade que caracteriza a forma clínica chamada de

Síndrome de Weil, que pode levar o indivíduo à falência múltipla dos órgãos acompanhada de morte (VINETZ, 2001).

O diagnóstico laboratorial da leptospirose pode ser realizado por diferentes técnicas baseadas na detecção direta ou indireta do agente ou do seu material genético (SANTA ROSA, 1970; FAINE et al., 1999). Dentre os procedimentos laboratoriais aplicados ao diagnóstico da leptospirose, a detecção de anticorpos séricos pela reação de soroaglutinação microscópica (SAM) ainda é a prova de referência, preconizada pela Organização Mundial da Saúde. O isolamento bacteriano é o procedimento que possibilita o diagnóstico, porém apresenta baixa sensibilidade, é trabalhoso e demorado exigindo a observação dos cultivos por um período mínimo de 30 dias (GENOVEZ et al., 1993; SCARCELLI et al., 2004).

As vacinas comerciais disponíveis, até o momento, para a prevenção da leptospirose são produzidas a partir de cultivos totais de diferentes sorovares de *L. interrogans* inativados pela ação do calor e/ou formol (bacterinas) (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Vacinas licenciadas para uso humano podem ser encontradas em países como Cuba (MARTINEZ et al., 2004), França (LAURICHESSE et al., 2007), Japão (MASUZAWA; SUZUKI; YANAGIHARA, 2013) e China (CHENG; QIN; XIE, 2001). Já as vacinas de uso animal são amplamente usadas na pecuária e em cães. Porém as vacinas apresentam certas limitações, como por exemplo, a baixa eficiência, pois promovem proteção apenas contra os sorovares presentes na preparação, além de falhar na indução de uma imunidade de longa duração, o que exige doses de reforço semestrais (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999; SILVEIRA et al., 2017). Além disso, contêm uma série de contaminantes oriundos do processo de obtenção, como componentes do meio e LPS, que têm sido associados à ocorrência de efeitos adversos (LEVETT, 2001; ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). A busca de uma vacina contra a leptospirose que apresente proteção de longa duração contra os diferentes sorovares patogênicos e que não determine reações pós-vacinais indesejáveis tem sido estimulada. Vários estudos estão sendo realizados na busca de possíveis candidatos vacinais que incluem proteínas de membrana externa, lipoproteínas, proteínas envolvidas na motilidade e fatores de virulência (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; ADLER, 2015).

2.2 PLAQUETAS

As plaquetas são as menores células circulantes no sangue, variando de 2 a 5 μm de diâmetro, 0,5 μm de espessura e apresentam um volume celular médio de 6 a 10 fL (WHITE, 2007). Em um ser humano adulto, há aproximadamente um trilhão de plaquetas circulantes no sangue. Por possuírem um tempo de vida curto, entre 7 a 10 dias, 100 bilhões de novas plaquetas são produzidas diariamente na medula óssea, mantendo uma contagem de plaquetas que varia entre 150 a 400 x 10⁹ plaquetas por litro de sangue. As plaquetas são fragmentos de megacariócitos, que são células gigantes, multinucleadas, presentes na medula óssea, que após um rearranjo citoplasmático liberam milhares de plaquetas na circulação (SEMPLE; ITALIANO; FREEDMAN, 2011).

Apesar de serem desprovidas de núcleos, as plaquetas são capazes de realizar a tradução de proteínas a partir de estoques de RNA mensageiros originados dos megacariócitos (KLINGER; JELKMANN, 2002). As plaquetas apresentam três tipos de grânulos em seu interior: os grânulos alfa, que são maiores e mais abundantes (40 a 80 por plaquetas); os grânulos densos, que são menores e em menor quantidade que os grânulos alfa e se encontram presentes somente em megacariócitos e em plaquetas; e os grânulos lisossomais. Quando ocorre a ativação plaquetária, as moléculas estocadas dentro desses grânulos são liberadas rapidamente. Os grânulos alfa possuem proteínas especializadas nas funções homeostáticas, como a adesão (fibrinogênio, trombospondina, vitronectina, fator Von Willebrand entre outras), a coagulação (plasminogênio, inibidor da plasmina α_2 entre outros) e o reparo endotelial (fator de crescimento derivado de plaquetas - PDGF, fator de permeabilidade e os fatores de formação de crescimento – TGF α e TGF β , entre outros) (COLMAN, 1991). Os grânulos alfa também podem conter uma variedade de proteínas com atividade microbicida (WHITE, 1972). Os grânulos densos apresentam em seu interior ATP, ADP, serotonina, pirofosfato, cálcio e magnésio. Já os grânulos lisossomais contêm enzimas hidrolíticas, como hidrolases ácidas, catepsinas D e E, assim como proteínas da membrana lisossomal, como LAMP-1, LAMP-2 e CD63 (REED, 2007; WHITE, 2007).

As membranas das plaquetas possuem diversos receptores tais como lecitinas e integrinas envolvidos nas diferentes funções plaquetárias e também receptores do tipo Toll (TLRs), que reconhecem os padrões moleculares associados

aos patógenos e dessa forma, permitem a interação das plaquetas com microorganismos. Além destes, as plaquetas também expressam receptores do tipo Fc que podem reconhecer imunocomplexos (KERRIGAN; COX, 2010). O receptor Fc γ RIIA tem sido amplamente associado com a interação entre plaquetas e bactérias. Este receptor está relacionado com o reconhecimento de imunocomplexos e alvos revestidos com imunoglobulina G (IgG) (ANTCZAK et al., 2011). Portanto, a ativação das plaquetas não ocorre somente em resposta a uma injúria endotelial e não está limitada aos processos homeostáticos, mas também ocorre em resposta a infecções e outros estímulos (KERRIGAN; COX, 2010).

As plaquetas são conhecidas por atuarem no processo de hemostasia, garantindo a manutenção do fluxo sanguíneo e da integridade vascular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). No entanto, vários estudos têm demonstrado que as plaquetas, também, participam de processos inflamatórios, do reparo de tecidos, da angiogênese e de mecanismos de defesa do organismo a infecções (YEAMAN, 2010).

Em condições normais, as plaquetas circulam no sangue no estado inativo, uma vez que as células endoteliais secretam fatores inibitórios da ativação plaquetária. Entretanto, durante uma injúria vascular ou depois da ativação do endotélio por mediadores inflamatórios, as plaquetas aderem a moléculas subendoteliais e a ativação se inicia (SPETH et al., 2013b). Quando ativadas, as plaquetas respondem de maneiras específicas incluindo: (1) a ativação do seu estado metabólico; (2) a mudança da forma discóide para ameboíde; (3) a expressão de receptores que aumentam a adesividade aos tecidos lesados ou infectados; (4) o aumento da motilidade em direção aos locais de lesão do tecido ou da infecção; (5) a geração de espécies reativas de oxigênio, incluindo superóxido, peróxido, e radicais hidroxil; (6) a extensão de pseudópodes que interagem com patógenos bem como as células hospedeiras; (7) remodelação do citoesqueleto para facilitar mobilização e organização dos grânulos citoplasmáticos; e (8) processamento de moléculas de grânulos pré-formados e degranulação (YEAMAN, 2010). No caso de injúria vascular, as plaquetas ativadas, agregam-se e catalisam a formação do coágulo estável, via cascata da coagulação para prevenir hemorragias (KERRIGAN; COX, 2010).

Plaquetas anucleadas são exclusivas dos mamíferos. Outros vertebrados como aves, répteis, anfíbios e peixes, possuem células nucleadas, que apresentam

funções hemostáticas. Invertebrados possuem hemócitos, circulando pela hemolinfa, que possuem estruturas e funções semelhantes aos macrófagos e expressão de TLRs, e estão envolvidos com a fagocitose e a secreção de peptídeos antimicrobiais. Os hemócitos também estão envolvidos com a cicatrização de feridas, podendo induzir a coagulação da hemolinfa em locais onde houve lesão tecidual ou ruptura exoesquelética. Talvez, durante a evolução, as funções hemostáticas e imunes dos hemócitos tenham se diferenciado em plaquetas e leucócitos. Isso poderia explicar as funções relacionadas à imunidade que ainda persistem nas plaquetas (LEVIN, 2007; SEMPLE; ITALIANO; FREEDMAN, 2011).

Vários trabalhos têm demonstrado que as plaquetas podem interagir direta e indiretamente com uma grande variedade de patógenos, incluindo bactérias, vírus, fungos e protozoários (KERRIGAN; COX, 2010a; YEAMAN, 2010; SEMPLE; ITALIANO; FREEDMAN, 2011; JENNE; KUBES, 2015).

Diversas bactérias são capazes de aderir, ativar, induzir a agregação e a degranulação plaquetária através de diferentes mecanismos (COX; KERRIGAN; WATSON, 2011). Proteínas da superfície bacteriana podem aderir a receptores presentes nas plaquetas, como ocorre em algumas espécies de *Streptococcus* orais (*S. sanguinis*, *S. orais* e *S. gordonii*), que expressam uma família de proteínas ricas em resíduos de serina capazes de se ligarem a glicoproteínas Ib α (GPIb α) das plaquetas (KERRIGAN et al., 2002, 2007; PETERSEN et al., 2010). As bactérias *S. pneumoniae* podem se ligar ao TLR2 de plaquetas através de uma proteína ainda não identificada. Bactérias também interagem com proteínas plasmáticas que se ligam aos receptores das plaquetas. Como as proteínas ClfA e ClfB e proteína A ligante à fibronectina expressas por *Staphylococcus aureus* que são capazes de se ligarem ao fibrinogênio e a IgG, levando à formação de uma ponte entre os receptores α IIbB3 e Fc γ RIIA de plaquetas, respectivamente (COX; KERRIGAN; WATSON, 2011). Além disso, algumas bactérias são capazes de secretar moléculas ativadoras de protrombina, como a coagulase e a proteína ligante ao fator Von Willebrand de *S. aureus* que promovem a formação de emaranhados de fibrina, facilitando a interação das bactérias com as plaquetas (VANASSCHE et al., 2012). Bactérias também podem secretar toxinas capazes de ativar receptores plaquetários. Como observado em *Porphyromonas gingivalis* que secreta a protease gingipain, capaz de ativar o receptor 1 das plaquetas (LOURBAKOS et al., 2001) ou

a α -toxina de *S. aureus* que induz a degranulação plaquetária (COX; KERRIGAN; WATSON, 2011).

Alguns estudos já identificaram proteínas liberadas pelas plaquetas com atividade microbicida, que são conhecidas como PMPs (*platelet microbicidal proteins*). Estas proteínas são catiônicas e apresentam massas moleculares variando de 6 a 40 kDa (YEAMAN, 2010). Como por exemplo, a β -lisina liberada por plaquetas de coelhos, após estimulação com a trombina, que é capaz de matar as bactérias *S. aureus* e *Bacillus subtilis* (TEW; ROBERTS; DONALDSON, 1974).

A agregação plaquetária induzida por bactérias também têm sido observada e pode ser avaliada pela técnica de agregometria de Born (1962), que permite a análise da ativação das plaquetas *in vitro*. Neste ensaio, utiliza-se um aparelho denominado agregômetro capaz de registrar alterações na transmissão da luz de um plasma rico em plaquetas estimuladas por agentes agonistas. Quando a estimulação acontece, ocorre uma diminuição na transmissão da luz devido à mudança na morfologia das plaquetas de discoides a esféricas e em seguida, observa-se um aumento gradual na transmissão da luz, devido à agregação das plaquetas que torna o meio mais claro. Estudos de Clawson e colaboradores demonstraram que as espécies *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* rapidamente aderem e promovem a agregação de plaquetas humanas *in vitro* (CLAWSON, 1973; CLAWSON; WHITE, 1971A, 1971B). Arman e colaboradores (2014) observaram que as espécies bacterianas *S. aureus*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. oralis*, e *S. pneumoniae* são capazes de induzir a agregação plaquetária mediada por uma via comum, que envolve o receptor Fc γ RIIA nas plaquetas.

Já foi observado que as plaquetas possuem TLR7 ativos, que promovem o recrutamento de neutrófilos para eliminação de vírus ssRNA, como por exemplo o vírus da encefalomiocardite. Essa interação com neutrófilos poderia estar relacionada com a diminuição do número de plaquetas nessas infecções virais (KOUPENOVA et al., 2014). Algumas plaquetas também podem apresentar TLR2, que podem ser ativadas por citomegalovírus, promovendo a ativação plaquetária e a liberação do conteúdo de seus grânulos, que por sua vez ativam e promovem a migração de neutrófilos (ASSINGER, 2014). Poxvírus são neutralizados quando as plaquetas interagem com redes extracelulares de neutrófilos, facilitando esse processo (JENNE; URRUTIA; KUBES, 2013).

O sobrenadante da cultura de *Aspergillus fumigatus* já foi relatado como um potente estimulante de plaquetas, de uma forma dependente do tempo e da dose. O fungo secreta serino proteases e micotoxinas, como a gliotoxina, que supostamente estão envolvidas com a indução da liberação dos grânulos alfa e dos grânulos densos, provocando modificações na membrana das plaquetas e agregação plaquetária. Essa ativação plaquetária induzida pelo sobrenadante estimula funções antifúngicas, como por exemplo, a inibição do crescimento fúngico, pois além da ação direta das plaquetas sobre hifas e conídios fúngicos, há a liberação de citocinas (SPETH et al., 2013a).

Desta forma, as plaquetas podem contribuir significativamente nos mecanismos de defesa dos organismos contra as infecções, através da habilidade em reconhecer, sequestrar e matar os patógenos ou através da modulação da resposta imune, como o recrutamento de leucócitos para o sítio da infecção e a ativação de neutrófilos que irão fagocitar e matar os patógenos (KERRIGAN; COX, 2010; SEMPLE; ITALIANO; FREEDMAN, 2011; JENNE; KUBES, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este projeto teve como objetivo investigar se existe algum tipo de interação *in vitro* entre as plaquetas humanas e as leptospiiras.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- » Padronizar testes de agregação plaquetária com amostras de sangue total, plasma rico em plaquetas e plaquetas lavadas;
- » Verificar através dos ensaios de agregação plaquetária se as estirpes de leptospiiras utilizadas são capazes de promover a ativação plaquetária;
- » Verificar se as leptospiiras se ligam às plaquetas através de teste imunoenzimático (ELISA);
- » Verificar através de ensaios de atividade microbicida se as plaquetas promovem a morte das estirpes de leptospiiras utilizadas neste estudo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

4.1.1 Leptospiras

Duas estirpes patogênicas de leptospiras foram utilizadas neste trabalho: a *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni (L1-130), pois é a estirpe que está associada à leptospirose humana no Brasil, e a *Leptospira interrogans* sorovar Canicola (LO4), associada à leptospirose canina. Também foi selecionada uma estirpe saprófita, a *Leptospira biflexa* sorovar Patoc (Patoc 1 – Paris).

Todas as estirpes foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann (FMVZ – USP). As leptospiras foram cultivadas sob condições aeróbicas em meio líquido EMJH (Difco® - EUA) a 29 °C, sob condições estáticas. As bactérias foram monitoradas em microscópio de campo escuro e a contagem celular feita em câmara de Petroff-Hausser. A virulência das estirpes patogênicas foi mantida através da passagem em hamsters experimentalmente infectados, segundo protocolo descrito em Faine et al. (1999). Animais recém-desmamados foram inoculados intraperitonealmente com 200 µL (10^7 células/mL) de cultura. Os animais foram monitorados diariamente para acompanhamento de sintomas clínicos de leptospirose como perda de peso, anorexia e mobilidade. As bactérias foram recuperadas a partir do macerado do fígado ou rim, após a eutanásia dos animais, que ocorre entre 5-10 dias, e cultivadas em meio semi-sólido de Fletcher (Difco™ Laboratories) ou meio EMJH por uma passagem *in vitro*.

4.1.2 *Staphylococcus aureus*

A cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), utilizada para validar a ativação de plaquetas em ensaios de agregação plaquetária, foi gentilmente fornecida pela Dra. Márcia Regina Frazolin (Instituto Butantan – Laboratório de Bacteriologia).

A amostra estoque se encontrava armazenada a -80 °C em meio tripticaseína de soja (TSB) acrescido de glicerol a 80% na proporção de 1:1. Para reativação das bactérias a amostra estoque foi inoculada em TSB (1:100) e incubada a 37 °C por

18h. No dia do experimento as bactérias reativadas foram inoculadas em TSB (1:50) e incubadas a 37 °C a 250 rpm por aproximadamente 2h ou até atingir uma DO_{600nm} (Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific, EUA) igual a 0,360 ($\sim 10^9$ bactérias/mL) (WALLER et al., 2013). Em seguida as bactérias foram lavadas 2 vezes com tampão Tyrode, permanecendo a 37 °C até serem utilizadas.

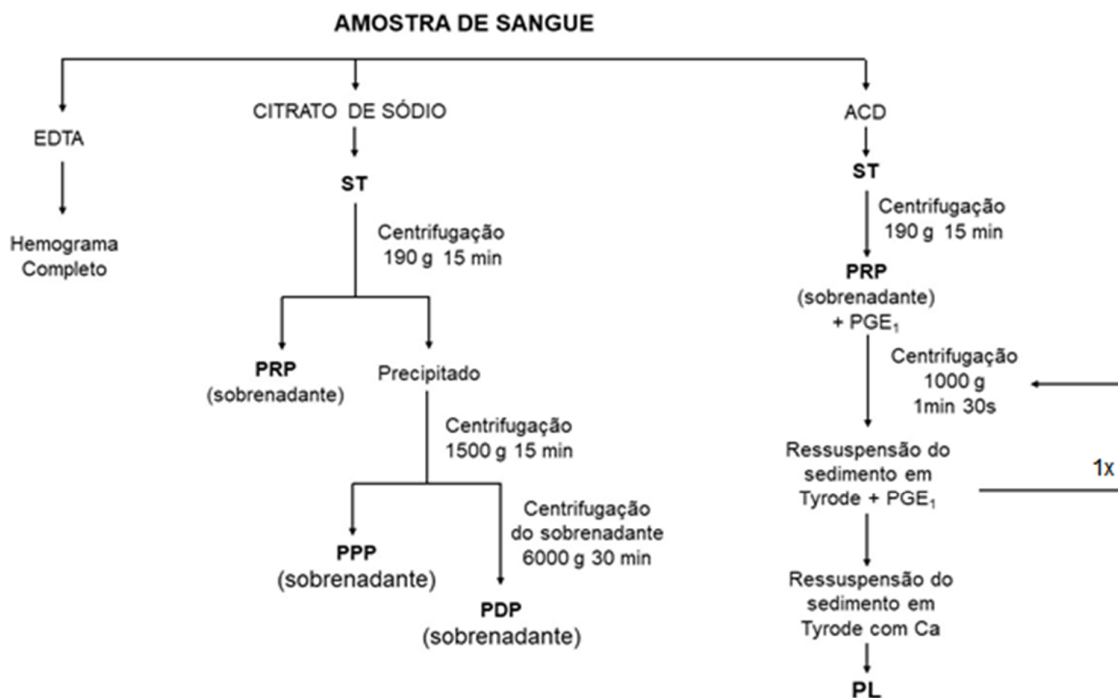
4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE HUMANO

Foram selecionados voluntários saudáveis, com idade entre 24 e 50 anos que não fizeram uso de nenhuma medicação que pudesse interferir nas funções plaquetárias 10 dias antes da doação. Os voluntários tomaram ciência dos procedimentos através Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice B) que foi aprovado pela Plataforma Brasil (CAAE: 81507417.0.0000.0086).

A coleta de sangue foi realizada a partir de punção venosa utilizando um escalpe de calibre 21 G e as amostras de sangue foram recolhidas sem ser feito qualquer tipo de pressão negativa, diminuindo assim o risco de ativação plaquetária. Após ser coletado, o sangue foi transferido para dois tubos contendo anticoagulante, um contendo Na_2 -EDTA 10% (99 partes de sangue para 1 parte de anticoagulante) para realização do hemograma completo e outro com citrato de sódio (1,3 M) (9 partes de sangue para 1 parte de anticoagulante) para realização dos ensaios com sangue total (ST) e plasma rico em plaqueta (PRP) ou ACD (citrato trissódico 85 mM, ácido cítrico 71,4 mM, dextrose 111 mM) (6 partes de sangue para 1 parte de anticoagulante) para obtenção de plaquetas lavadas (PL), conforme delineamento ilustrado na Figura 2. Seguido a transferência para os tubos contendo anticoagulante a amostra já era homogeneizada para evitar a ativação plaquetária, e depois o sangue era mantido em banho seco a 37 °C até utilização.

O hemograma completo, que foi realizado para obtenção da contagem de plaquetas, também foi utilizado para verificação da normalidade dos outros elementos sanguíneos (hemácias e leucócitos) (Apêndice A). O hemograma foi analisado automaticamente em um contador hematológico BC-2800 VET (Mindray - China).

Figura 2 – Representação esquemática do delineamento experimental. Para maiores detalhes ler material e método das respectivas frações plaquetárias.



Legenda: ST: sangue total; PRP: plasma rico em plaquetas; PPP: plasma pobre em plaquetas; PDP: plasma depletado em plaquetas; PL: plaquetas lavadas.

Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

4.3 AVALIAÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL (ST)

A agregação plaquetária em amostras de ST de humanos (CARDINAL; FLOWER, 1980) foi avaliada pelo método da impedância. O ensaio foi realizado em um agregômetro Chrono-log (modelo 560VS). Em uma cubeta, 400 µL de ST citratado foram diluídos com 400 µL de solução salina (0,9%), que permaneceram no agregômetro a 37 °C, sob agitação constante (1000 rpm). Um eletrodo foi inserido na cubeta e por um breve período permitiu-se que a amostra entrasse em equilíbrio, seguindo pela calibração do aparelho para cada amostra analisada. O eletrodo é formado por dois finos fios de paládio, onde as plaquetas se aderem e formam uma monocamada. Na calibração uma pequena diferença de potencial elétrico é aplicada nos dois fios e a impedância causada pelas plaquetas que cobrem os fios é medida. Na ausência de um agonista, as interações entre as plaquetas e os eletrodos se

estabilizam e a impedância entre os dois eletrodos se torna constante, produzindo uma linha de base. Quando um agonista é adicionado, as plaquetas na amostra são ativadas e começam a agregar sobre a monocamada presa ao fio do eletrodo. Esse aumento da agregação plaquetária é diretamente proporcional ao aumento da impedância (SEREBRUANYA et al., 2002).

As plaquetas foram incubadas com diferentes estirpes de leptospiros, em diferentes proporções. Além disso, as plaquetas foram estimuladas com diferentes agonistas: colágeno (Chrono-log Corporation®) na concentração de 12,5 µg/mL, ADP (Chrono-log Corporation®) na concentração de 25 µM ou o peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP) na concentração de 0,4 mM.

A agregação plaquetária foi observada por 10 min após a adição do agonista e a curva obtida pelo programa Aggro/Link for Windows (versão 4.75 – Chrono-log, EUA), foi avaliada para obtenção do resultado em ohms (Ω), onde cada 5 cm do histograma obtido no aparelho corresponde a 20 Ω .

4.4 OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETA (PRP) E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DAS LEPTOSPIRAS EM ATIVAR PLAQUETAS

O protocolo para obtenção das amostras de PRP foi descrito por Sano-Martins et al. (1997). O sangue citratado foi centrifugado a 190 g por 15min em temperatura ambiente, aceleração 9, breque 0. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, que foi mantido a 37 °C. Uma alíquota foi retirada para realização da contagem de plaquetas. O restante do sangue foi novamente centrifugado a 1500 g por 15min em temperatura ambiente, aceleração 9, breque 4 para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP).

Os ensaios realizados com PRP foram analisados pela metodologia da turbidimetria (BORN, 1962), onde o PPP representa 100% de agregação (100% de transparência) e deve ser utilizado somente com sua amostra correspondente de PRP que possui 0% de agregação, e encontrar em uma condição mais opaca.

A agregação foi avaliada após adição de 10 µL de bactéria (aproximadamente 10⁹ células/mL) a 400 µL de PRP sob agitação constante (1000 rpm) a 37 °C no agregômetro. Quando a agregação não foi observada o agonista (colágeno, ADP ou

TRAP) foi adicionado. O agregômetro registrou o aumento da transmissão de luz por 5 min após adição do agonista, conforme a formação dos agregados plaquetários.

Os resultados foram obtidos utilizando o programa Aggro/Link for Windows (versão 4.75 – Chrono-log, EUA) e foram expressos como porcentagem de agregação plaquetária.

4.5 OBTENÇÃO DE PLAQUETAS LAVADAS (PL) E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DAS LEPTOSPIRAS EM ATIVAR PLAQUETAS

Para obtenção de PL (MUSTARD; KINLOUGH-RATHBONE; PACKHAM, 1989) o sangue coletado em tubo contendo o anticoagulante ACD, foi centrifugado a 190 g por 15min em temperatura ambiente, aceleração 9, breque 0, para obtenção do PRP. Ao PRP foram adicionados 12,5 µL de prostaglandina E₁ (PGE₁, 200 µg/mL em etanol) para cada 10 mL de PRP, para se inibir a agregação plaquetária durante a centrifugação. Este foi então transferido para microtubos que foram centrifugados a 10.000 g por um minuto e meio. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão delicadamente em tampão Tyrode (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 3 mM NaH₂PO₄, 0,01 mM HEPES, 5,6 mM glicose, 1 mM MgCl₂, 0,35% albumina bovina, pH 6,2) acrescido de PGE₁ 2,5 µL para cada 10 mL de PL. As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 g por um minuto e meio. O procedimento de lavagens das plaquetas foi realizado novamente e o sedimento foi ressuspensão cuidadosamente em tampão Tyrode com Ca (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 3 mM NaH₂PO₄, 0,01 mM HEPES, 5,6 mM glicose, 1 mM MgCl₂, 0,35% albumina bovina, 2 mM CaCl₂, pH 7,4) (SANO-MARTINS et al., 1997). Uma alíquota foi retirada para contagem do número de plaquetas, que quando necessário foi ajustado para 300 x 10³/µL, diluído com a solução Tyrode com Ca, pH 7,4

Assim como as amostras de PRP, as amostras de PL foram analisadas pelo método da turbidimetria. A agregação foi avaliada após adição de 10 µL de bactéria (aproximadamente 10⁹ células/mL) a 400 µL de PL sob agitação constante (1000 rpm) a 37 °C no agregômetro. Quando a agregação não foi observada o agonista (colágeno) foi adicionado. O agregômetro registrou o aumento da transmissão de luz por 5 min após adição do agonista, conforme a formação dos agregados plaquetários. Os resultados foram obtidos utilizando o programa Aggro/Link for

Windows (versão 4.75 – Chrono-log, EUA) e foram expressos como porcentagem de agregação plaquetária.

4.6 OBTENÇÃO DE PLASMA DEPLETADO DE PLAQUETAS (PDP)

O protocolo de plasma depletado de plaquetas (PDP) (YANG et al., 2015) foi realizado para obtenção do plasma utilizado nos ensaios de ELISA. As amostras de PDP foram obtidas a partir das amostras de PRP, conforme protocolo descrito anteriormente (item 4.4). Após centrifugação para obter o PPP, metade do sobrenadante obtido foi novamente centrifugado a 6000 g por 30min, em temperatura ambiente, para obtenção do PDP (sobrenadante). Uma alíquota do PDP foi medida para confirmação da ausência de plaquetas.

4.7 ELISA

Para verificar se as leptospiras se ligavam às plaquetas, foram realizados ensaios de ELISA. Para adsorção das frações plasmáticas (PL, PRP, PPP e PDP), placas de microdiluição com 96 poços de poliestireno de alta afinidade (MaxiSorp, Nunc, Thermo Fisher) foram expostas a uma solução de 5 µg/mL de cada fração proteica em tampão 0,1 M carbonato pH 9,6 e incubadas por 16h a 4 °C. Posteriormente a placa foi lavada três vezes com PBS-T (PBS com 0,05% *Tween*-20) e os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando-se a placa com solução de bloqueio (BSA 1% em PBS), por 2h a 37 °C. Para retirar o excesso da solução de bloqueio a placa foi novamente lavada, conforme descrito anteriormente, e então a placa foi incubada por 1h a 37 °C com uma solução de PBS juntamente com lisado total de leptospira. Transcorrido esse período a placa foi lavada por seis vezes com PBS-T e permaneceu em incubação por 1h a 37 °C com o anticorpo primário purificado contra leptospira produzido em coelho (GOTTI, 2015), diluído em solução de PBS (1:10.000). Após lavagem com PBS-T, a placa foi incubada por 1h a 37 °C com o anticorpo secundário anti-coelho (Sigma) conjugado com peroxidase, diluído em PBS (1:5.000), seguido por lavagens conforme descrito anteriormente.

O reconhecimento foi realizado através da reação com o substrato ABTS com traços de H₂O₂, por 30 min, em temperatura ambiente, protegido da luz. A reação foi

interrompida pela adição de SDS 5%. A intensidade da reação foi determinada pela leitura da DO_{405nm} (Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific, EUA).

4.8 ATIVIDADE MICROBICIDA

Para esses ensaios foram utilizadas amostras de PL para verificar se as plaquetas exercem alguma atividade microbicida sob a estirpe patogênica de leptospira L1-130. Todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar sob condições assépticas e o ensaio foi realizado em triplicata.

O ensaio foi dividido em 4 grupos a serem testados, sendo eles: (1) grupo de controle da esterilidade: que consistia no teste de todos os elementos utilizados nos ensaios para garantir que não haviam sido contaminados por outra bactéria; (2) grupo experimental de morte das leptospiras, onde as leptospiras foram incubadas com água oxigenada (2 M) ou ampicilina (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$), que são substâncias sabidamente capazes de eliminar as leptospiras; (3) grupo de controle de crescimento das leptospiras, onde 200 μL de leptospira ($\sim 10^7$ células/mL) foram crescidas em 2 mL de meio de cultura EMJH; (4) grupo experimental com PL, onde as plaquetas foram lavadas conforme descrito anteriormente (item 4.6) e metade do volume obtido com a lavagem foi incubado com 100 μL de ADP, por 30 min a 37 °C, com rotação de 200 rpm (Shaker Amerex Instruments INC., Modelo SK - 737R).

Todos os componentes a serem testados foram misturados em microtubos e centrifugados a 300 g por 1 min, para induzir o contato entre as células e em seguida foram incubados a 37 °C por 2 h (ALI et al., 2017). Após esse período, todo o conteúdo dos microtubos foram transferidos para tubos tipo Falcon, contendo 2 mL de meio de cultura EMJH, que foram mantidos a 28-30 °C por 3 dias. No terceiro dia de incubação foram adicionados 200 μL de Resazurina 0,04% em todos os tubos, que foram novamente incubados a 28-30 °C por 3 dias. No sexto dia de incubação, os tubos foram observados para verificar a viabilidade das bactérias ou se houve contaminação nos controles de esterilidade. A Resazurina é um corante indicador de crescimento celular, que muda da cor azul escuro para pink na presença de microrganismos vivos (MURRAY; HOSPENTHAL, 2004).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos ensaios de agregação plaquetária, assim como no ELISA, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via e, posteriormente, o teste de Tukey para comparar as médias dos grupos. Exceto os ensaios realizados com amostra de PRP na proporção de 5:1 e colágeno como agonista, no qual utilizou-se o Teste-t não pareado com correção de Welch. Todas as análises foram realizadas nos programas estatísticos Minitab, versão 18.1 e GraphPad Prism, versão 7. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas valores de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dados da literatura mostram que as bactérias podem interagir com as plaquetas através de três mecanismos gerais. O primeiro é mediado pelo aumento da produção de citocinas inflamatórias, devido à resposta imune decorrente de uma infecção, o que pode levar à ativação plaquetária. O segundo mecanismo pode ocorrer através da liberação de substâncias pelas bactérias que promovem a ativação plaquetária. E, por fim, as bactérias podem se ligar às plaquetas, de forma direta ou indireta. As bactérias se ligam diretamente às plaquetas através da interação de proteínas na superfície bacteriana e de receptores plaquetários, enquanto que a ligação indireta é mediada por proteínas, geralmente plasmáticas, que se ligam tanto na bactéria quanto na plaqueta. A ligação das bactérias com as plaquetas pode levar à ativação plaquetária e conseqüentemente à agregação (KERRIGAN; COX, 2010; HAMZEH-COGNASSE et al, 2015). Neste sentido, um dos objetivos deste trabalho foi verificar se as leptospiros são capazes de interagir com as plaquetas humanas e ativá-las. Para tanto, ensaios de agregação plaquetária, avaliação da capacidade das leptospiros se ligarem às plaquetas humanas por ELISA e avaliação da atividade microbicida das plaquetas sobre as leptospiros foram realizados e serão descritos a seguir:

5.1 PADRONIZAÇÃO DE TESTES EM AGREGÔMETRO COM AMOSTRAS DE ST, PRP E PL

Para padronização dos testes de agregação plaquetária, as amostras de ST, PRP e PL foram incubadas com duas concentrações de colágeno e o perfil de agregação de cada amostra foi avaliado.

O colágeno foi o primeiro agonista a ser testado nos ensaios de agregação plaquetária, por ser considerado um potente ativador de plaquetas, assim como a trombina (ZHOU; SCHMAIER, 2005). Quando ocorre uma ruptura na parede de um vaso, as plaquetas ligam-se ao fator de Von Willebrand, ao colágeno e à fibronectina, que ficam expostos na matriz extracelular do subendotélio. As plaquetas possuem dois receptores para o colágeno na sua superfície, um deles é a GPIa/IIa (integrina $\alpha 2\beta 1$), que tem um papel crítico na adesão plaquetária. O outro é a GPVI, que participa na ativação plaquetária, levando à formação e liberação de TXA₂, assim como na secreção do conteúdo dos grânulos alfa e denso, o que resulta na agregação plaquetária (RAND; LEUNG; PACKHAM, 2003).

Durante todo o experimento, as amostras foram mantidas no agregômetro, sob agitação e temperatura constantes (1000 rpm, 37 °C). As concentrações de colágeno testadas com as amostras de ST foram 6,25 µg/mL e 12,50 µg/mL, respectivamente. Os perfis de agregação obtidos com ST estão apresentados nas Figuras 3 e 4. As amostras de PRP e PL foram testadas com 2,5 e 5 µg/mL de colágeno e os perfis de agregação podem ser observados nas Figuras 5 a 8, respectivamente. Estas concentrações de colágeno testadas foram baseadas em dados obtidos na literatura (KITCHEN; MCGRAW; ECHENAGUCIA, 2010; RAND; LEUNG; PACKHAM, 2003).

Devido à alta turbidez da amostra de ST, a agregação plaquetária foi avaliada em agregômetro pelo método de impedância, que mede a passagem de corrente elétrica entre dois eletrodos imersos na amostra (PANICCIA et al., 2015; RAND; LEUNG; PACKHAM, 2003). Conforme descrito no item 4.3 do Material e Métodos, cada 5 cm do histograma correspondem a 20 ohms (Ω). Como observado nas Figuras 3 e 4, os valores de impedância obtidos com a amostra de ST estimulada com colágeno foram maiores quando mais colágeno foi utilizado. Após a adição do agonista, o valor médio da impedância máxima obtido com 12,5 µg/mL de colágeno foi de $33,5 \pm 0,7 \Omega$, maior que o valor máximo obtido com 6,25 µg/mL de colágeno

(13 Ω). Interessante observar a ocorrência da fase *lag* característica da agregação induzida por agonistas potentes como o colágeno. A duração da fase *lag*, normalmente, é menor que um minuto após adição do agente agregante e reflete a mudança do formato das plaquetas estimuladas pelo colágeno (AVRAM et al., 2001).

Figura 3 – Curva de agregação plaquetária obtida com a amostra de ST (voluntário 1), contendo $9,1 \times 10^8$ plaquetas na presença de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ de colágeno. A adição do agonista foi realizada após 1min 50s do início da incubação. Cada quadrado do histograma tem 1 cm de comprimento e corresponde a 4 Ω . O valor máximo da agregação foi de 13 Ω . A seta indica a ocorrência da fase lag.

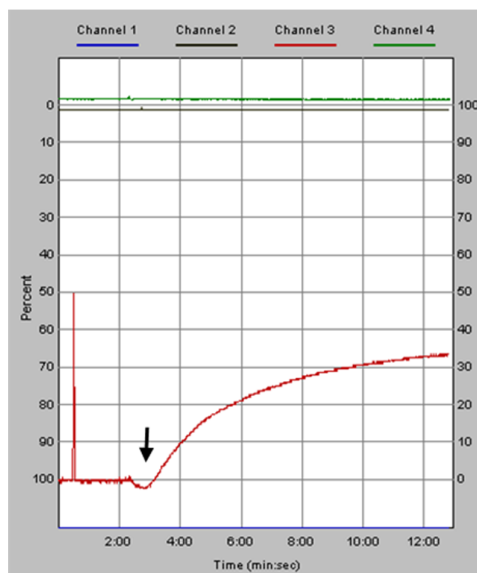
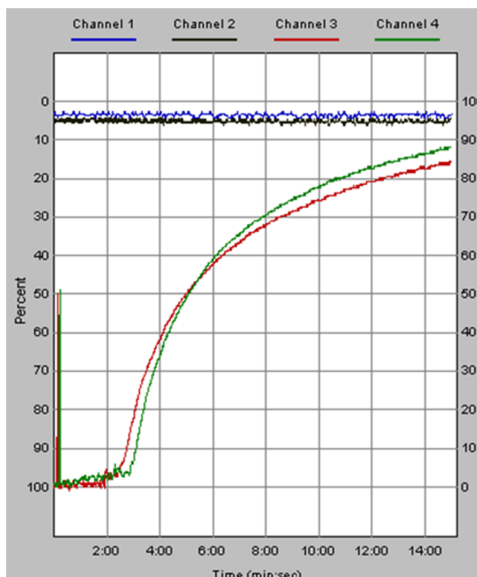


Figura 4 – Curva de agregação plaquetária obtida com a amostra de ST (voluntário 2), contendo $1,3 \times 10^8$ plaquetas na presença de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de colágeno. A adição do agonista foi realizada após 1min e 45s do início da incubação. Os canais 3 e 4 representam duplicatas. Cada quadrado do histograma tem 1 cm de comprimento e corresponde a 4 Ω . O valor médio das agregações nos dois canais foi de $33,5 \pm 0,7 \Omega$.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Nas amostras de PRP e PL, a agregação plaquetária foi avaliada pelo método da turbidimetria (BORN, 1962). Neste caso, após a adição do agonista, os valores de densidade ótica diminuem à medida que os agregados plaquetários são formados. A agregação é expressa pela porcentagem de transmitância, quanto maior a agregação, maior é a transmitância na amostra.

Nos gráficos das Figuras 5 a 8, podemos observar que a adição do colágeno foi capaz de ativar a agregação das plaquetas presentes nas amostras de PRP e PL, respectivamente. As duas concentrações de colágeno testadas ativaram a agregação de maneira similar. Os maiores valores de porcentagem de agregação foram observados com as amostras de PL. Os valores de 68% e 70% de agregação máxima foram obtidos com o estímulo de 2,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de colágeno, respectivamente (Figura 7 e 8). Já os valores máximos obtidos com as amostras de PRP foram de 48% e 54%, quando estimulados com 2,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de colágeno, respectivamente (Figura 5 e 6).

Em resumo, nesta primeira etapa do trabalho, podemos considerar os protocolos utilizados para a obtenção das amostras de ST, PRP e PL adequados para a avaliação da possível capacidade das leptospiras em ativar plaquetas humanas.

Figura 5 – Curva de agregação plaquetária obtida com a amostra de PRP (voluntário 2) contendo $9,3 \times 10^7$ plaquetas na presença de $2,5 \mu\text{g/mL}$ de colágeno. A adição do agonista foi realizada após 2min 10s do início da incubação. O valor máximo obtido foi 48 % de agregação. A seta indica a ocorrência da fase *lag*.]

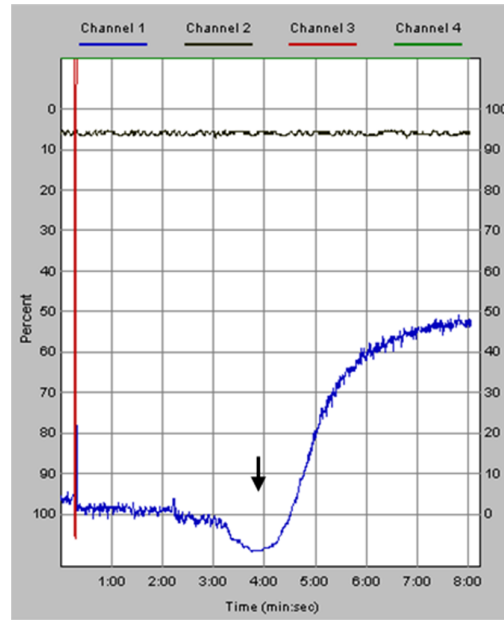
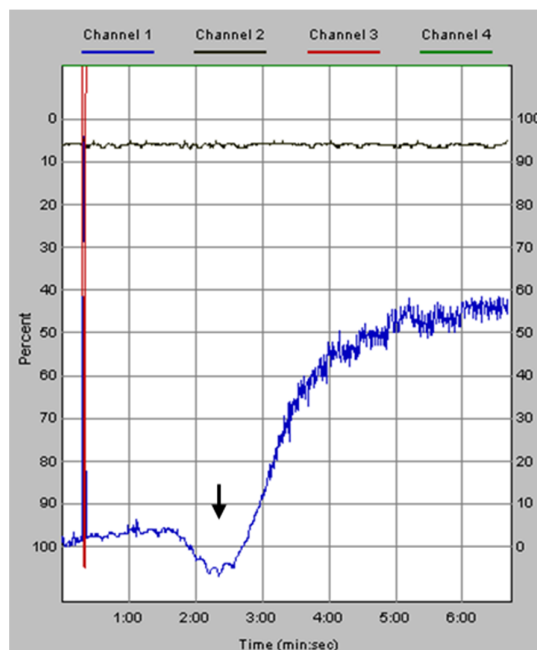


Figura 6 – Curva de agregação plaquetária obtida com a amostra de PRP (voluntário 2), contendo $9,3 \times 10^7$ plaquetas na presença de $5 \mu\text{g/mL}$ de colágeno. A adição do agonista foi realizada após 1min do início da incubação. O valor máximo obtido foi de 54% de agregação. A seta indica a ocorrência da fase *lag*.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Figura 7 – Curva de agregação plaquetária obtida com a amostra de PL (voluntário 2) contendo $1,2 \times 10^8$ plaquetas na presença de $2,5 \mu\text{g/mL}$ de colágeno. A adição do agonista foi realizada após 2min 10s do início da incubação. O valor máximo obtido foi de 68% de agregação. A seta indica a ocorrência da fase *lag*.

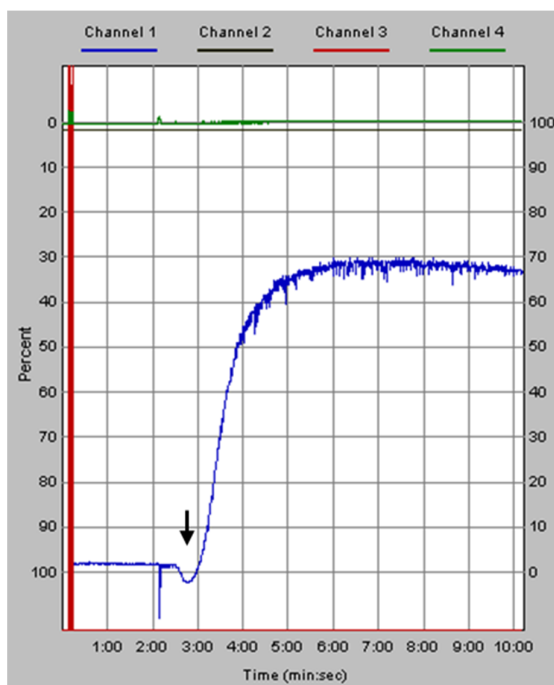
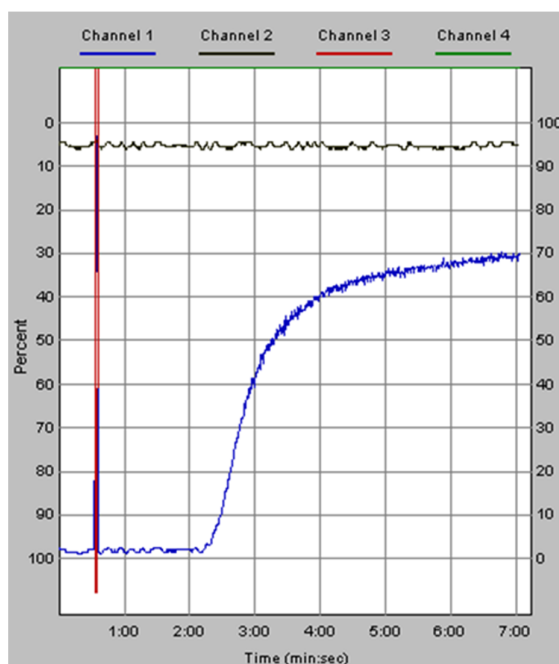


Figura 8 – Curva de agregação plaquetária obtida com a amostra de PL (voluntário 2) contendo $1,2 \times 10^8$ plaquetas na presença de $5 \mu\text{g/mL}$ de colágeno. A adição do agonista foi realizada após 1min 40s do início da incubação. O valor máximo obtido foi de 70% de agregação.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

5.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVAÇÃO DE PLAQUETAS HUMANAS EXPOSTAS A LEPTOSPIRAS, ATRAVÉS DO TESTE DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Foram realizados oito ensaios de agregação de plaquetas na presença de leptospiiras com as amostras de ST, PRP e PL obtidas de cinco doadores. As plaquetas foram testadas com as leptospiiras patogênicas: *L. interrogans* sorovar Copenhageni (L1-130) e *L. interrogans* sorovar Canícola (LO4), e a estirpe saprófita, *L. biflexa* sorovar Patoc e com a bactéria *S. aureus*.

5.2.1 Avaliação da agregação plaquetária em amostras de ST e PL, estimuladas com colágeno, na presença da estirpe patogênica de leptospira

No primeiro experimento de agregação plaquetária foram utilizadas amostras de ST e PL, estimuladas com colágeno, na presença da estirpe patogênica L1-130. Três proporções de leptospira por plaquetas (5:1, 1:5 e 1:20) foram analisadas.

A Figura 9A mostra que o controle positivo do experimento funcionou adequadamente. É possível observar uma curva de agregação plaquetária característica, obtida com a amostra de ST na presença de 6,25 µg/mL de colágeno. Este resultado demonstra que as plaquetas estavam viáveis, pois é possível distinguir a mudança de forma após adição do colágeno (1min 50s), seguida pela fase de agregação, que atinge um valor máximo de 13 Ω. Por outro lado, durante os 5min de incubação da amostra de ST com as leptospiiras nas proporções 1:5 e 1:20 (leptospira:plaquetas), nenhuma ativação plaquetária foi verificada. Devido à ausência de agregação, o agonista colágeno foi adicionado à reação. Nas Figuras 9B e 9C nota-se que ambas amostras contendo leptospiiras e colágeno foram capazes de estimular a agregação das plaquetas. Interessante observar, que os valores de impedância obtidos na presença das leptospiiras e colágeno foram superiores aqueles obtidos somente com o colágeno. O valor de impedância da amostra controle positivo foi de 13 Ω, enquanto a amostra com L1-130 e colágeno atingiu uma agregação de 25 Ω na proporção de 1:5 e 20 Ω na proporção 1:20.

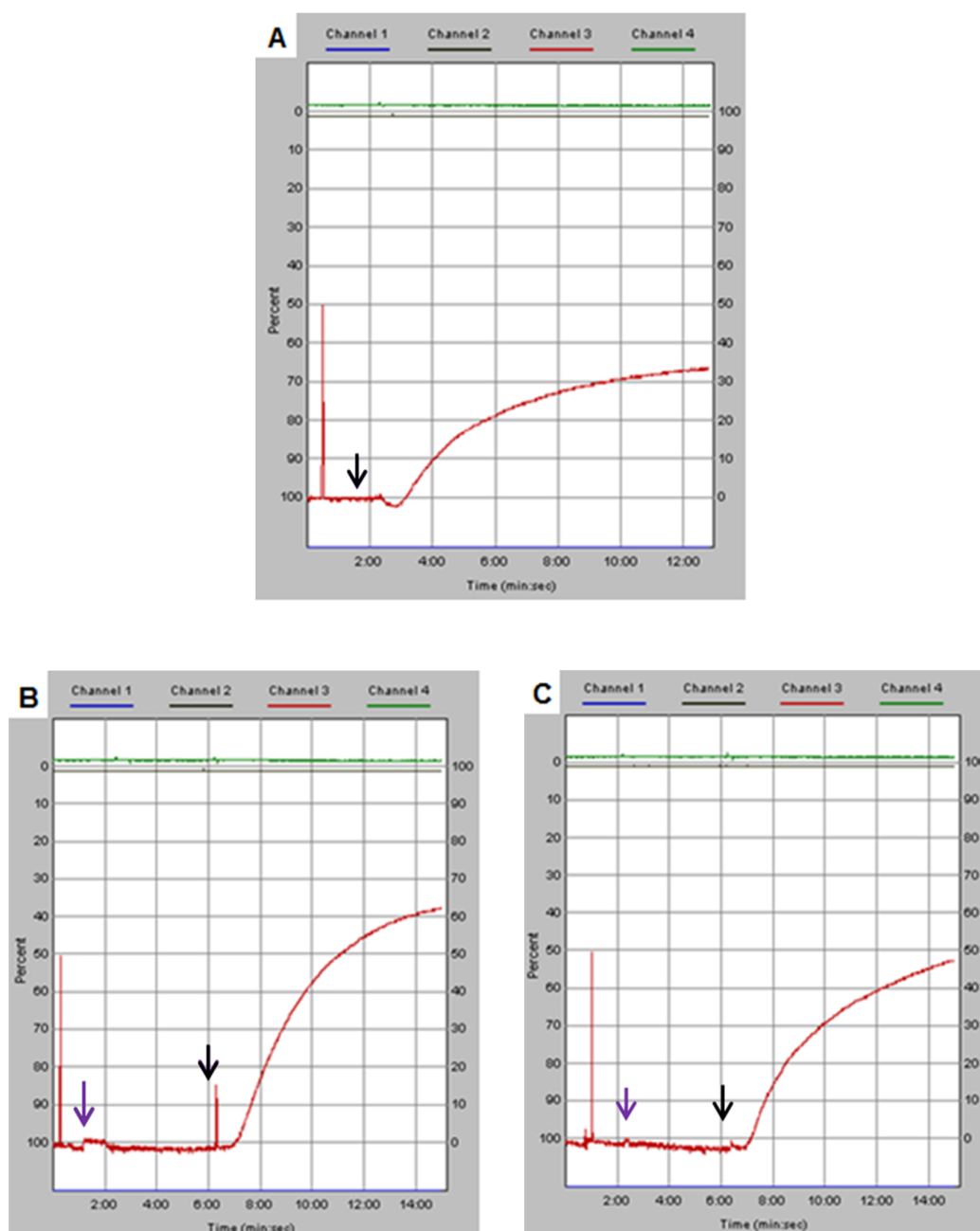
Os ensaios seguintes foram realizados com amostra de PL. Neste caso, as possíveis interferências de moléculas presentes no plasma devem ser mínimas, pois

durante os processos de centrifugações, as plaquetas são lavadas e concentradas, possibilitando o contato direto das leptospiros com as plaquetas.

A Figura 10 mostra os resultados obtidos com a amostra PL, no qual as plaquetas foram incubadas com as leptospiros durante 5min. Novamente, não foi observada a agregação estimulada diretamente pelas leptospiros. Com a ausência da agregação, 2,5 µg/mL de colágeno foram adicionados à reação e a ativação plaquetária ocorreu somente na amostra que continha a proporção de 1 leptospira para 20 plaquetas (Figura 10C). De maneira não esperada, mesmo após adição do colágeno, não houve ativação plaquetária na amostra de PL na proporção de 5 bactérias para cada plaqueta (Figura 10B). O controle positivo (somente colágeno) atingiu uma agregação máxima de 69%, enquanto que a proporção de 1 leptospira para 20 plaquetas atingiu 70% de agregação.

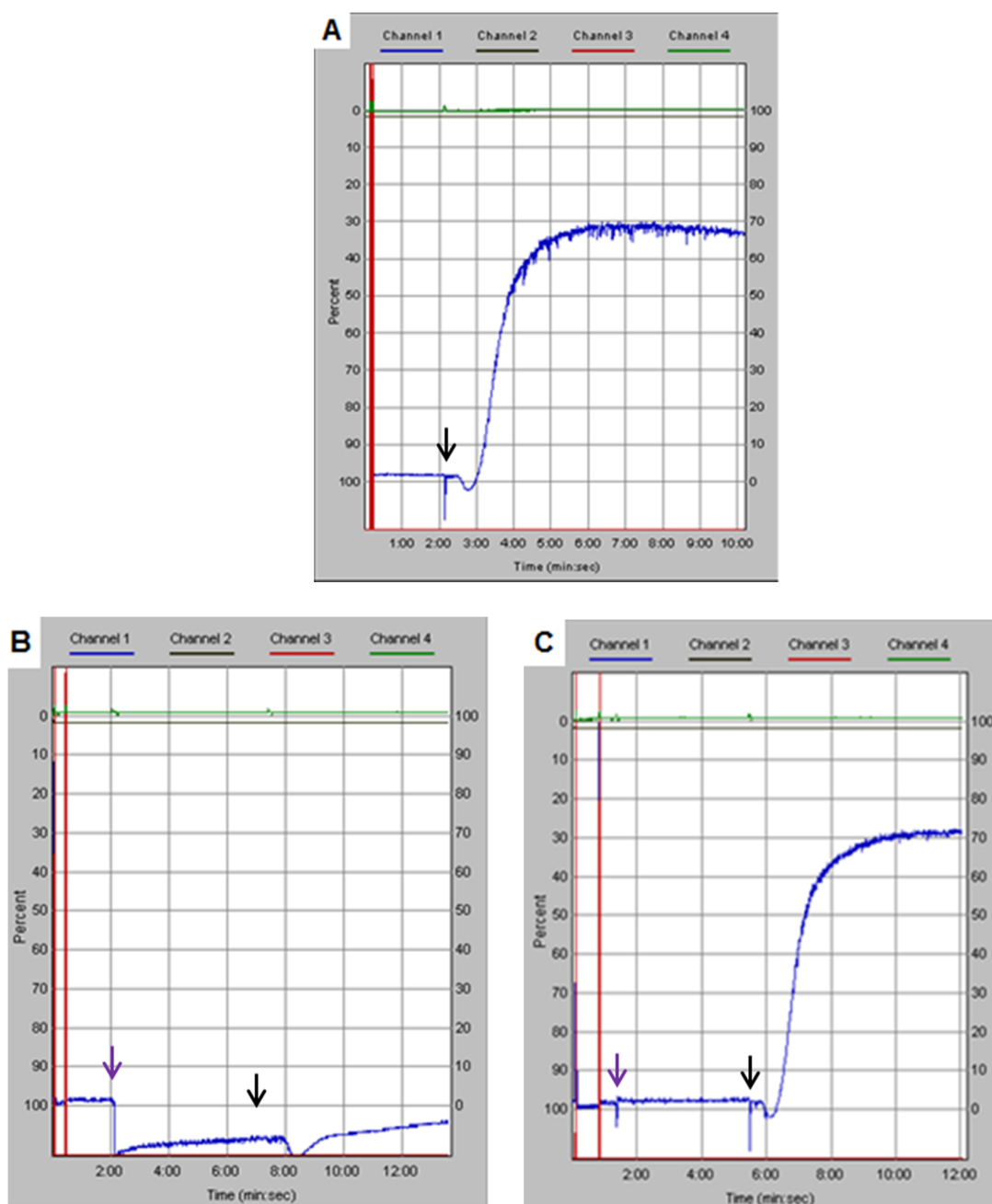
Em resumo, os resultados obtidos neste primeiro ensaio mostraram que as leptospiros da estirpe patogênica L1-130 não foram capazes de estimular diretamente a agregação de plaquetas humanas nas proporções de 1:5 e 1:20 em amostra de ST, nem nas proporções de 1:20 e 5:1 em amostras de PL.

Figura 9 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 1), contendo $9,1 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe L1-130 e colágeno ($6,25 \mu\text{g/mL}$) como agonista. **(A)** Controle positivo, ST estimulado com colágeno, que foi adicionado após 1min 50s de incubação, atingindo um valor de impedância máxima igual a 13Ω . **(B)** ST na presença de leptospiros da estirpe L1-130 na proporção 1:5 (leptospira:plaqueta). Após 5min de incubação das plaquetas com as leptospiros, o colágeno foi adicionado, promovendo uma agregação que atinge uma impedância igual a 25Ω . **(C)** ST na presença de leptospiros da estirpe L1-130 na proporção 1:20 (leptospira:plaqueta). Após 5min de incubação das plaquetas com leptospiros, o colágeno foi adicionado, promovendo uma agregação igual a 20Ω . Cada quadrado do histograma tem 1 cm de comprimento e corresponde a 4Ω . Seta preta indica a adição do colágeno e a seta roxa indica a adição da estirpe L1-130.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Figura 10 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com a amostra de PL (voluntário 2), contendo $1,2 \times 10^8$ plaquetas, na presença da estirpe L1-130 e colágeno ($2,5 \mu\text{g/mL}$) como agonista. **(A)** Controle positivo, amostra PL estimulada com colágeno (2min 10s) que atingiu um valor máximo de agregação igual a 69%. **(B)** PL na presença da estirpe L1-130 (2min 05s) na proporção 5:1 (leptospiras:plaqueta). Após 5min de incubação das leptospiras com as plaquetas o colágeno foi adicionado, porém não foi capaz de desencadear a agregação plaquetária. **(C)** PL na presença de leptospiras da estirpe L1-130 na proporção 1:20 (leptospira:plaquetas). Após 5min de incubação das leptospiras com as plaquetas, o colágeno foi adicionado, atingindo um valor máximo de agregação igual a 70%. Seta preta indica a adição do colágeno e a seta roxa indica a adição da estirpe L1-130.



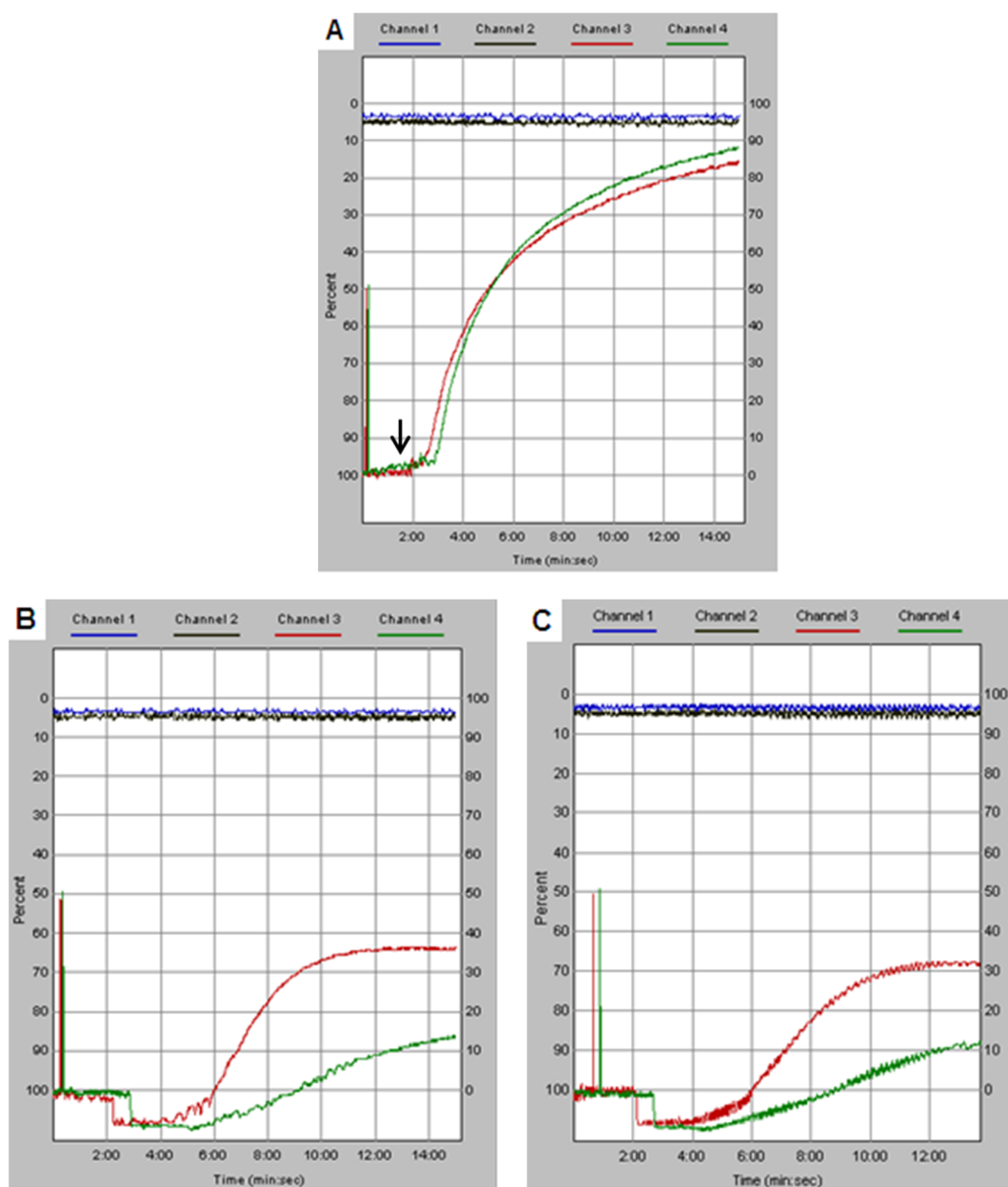
Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

5.2.2 Avaliação da agregação plaquetária em amostras de ST, PRP e PL, estimuladas com colágeno, na presença de uma estirpe patogênica ou uma estirpe saprófita de leptospira

No segundo experimento de ativação plaquetária foram realizados ensaios com as amostras de ST, PRP e PL na presença de duas estirpes de leptospiras: Patoc (saprófita) e a LO4 (patogênica). O objetivo deste ensaio foi testar duas outras estirpes de leptospira em uma proporção de 1 leptospira para 10 plaquetas.

No teste com a amostra de ST, as plaquetas foram estimuladas com 12,5 µg/mL de colágeno, numa proporção de 1:10. Na Figura 11A pode-se visualizar a duplicata do controle positivo, onde em ambos os canais (canal 3 – vermelho e canal 4 – verde) o colágeno foi capaz de ativar as plaquetas e produzir uma agregação que atingiu uma média de $33,5 \pm 0,7 \Omega$. Nas Figuras 11B e C temos os testes nos quais as plaquetas foram incubadas com as leptospiras, porém estas não foram capazes de provocar a ativação plaquetária diretamente. Neste ensaio, o momento da adição das leptospiras ficou evidente, pois há uma queda da linha de base, o que não é observado no controle positivo (Figura 11A). A estirpe Patoc está representada no canal 3 (vermelho), onde a agregação plaquetária só ocorre após adição do colágeno, atingindo valores de 18 Ω (Figura 11B) e 16 Ω (Figura 11C). No canal 4 (verde) está representada a agregação plaquetária na presença da estirpe LO4 juntamente com o colágeno, que atinge valores de 9 Ω (Figura 11B) e 8 Ω (Figura 11C). A agregação média na presença da estirpe Patoc juntamente com o colágeno foi de $17 \pm 1,4 \Omega$, já na presença da estirpe LO4 e colágeno foi de $8,5 \pm 0,7 \Omega$. Aparentemente, há uma inibição da agregação plaquetária estimulada pelo colágeno na presença das leptospiras, sendo mais pronunciada com a estirpe patogênica LO4.

Figura 11 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com a amostra de ST (voluntário 2), contendo $1,3 \times 10^8$ plaquetas, na presença das estirpes Patoc e LO4 (proporção de uma leptospira para dez plaquetas) e colágeno ($12,5 \mu\text{g/mL}$) como agonista. **(A)** Controle positivo, onde após adição do colágeno (seta preta), a agregação média foi de $33,5 \pm 0,7 \Omega$. **(B)** No canal 3 (vermelho), a estirpe Patoc, foi adicionada com 2min 15s e após 1min 30s houve a adição do colágeno, atingindo uma agregação de 18Ω . No canal 4 (verde), a estirpe LO4 foi adicionada com 2min 50s e após 1min 30s houve a adição do colágeno atingindo um valor de agregação igual a 9Ω . **(C)** Repetição do teste com as leptospiras. No canal 3 (vermelho), a estirpe Patoc, foi adicionada com 2min 10s e após 1min 30s, houve a adição do colágeno, atingindo uma agregação de 16Ω . No canal 4 (verde), a estirpe LO4, foi adicionada com 2min 40s e após 1min 30s houve a adição do colágeno, com um valor de agregação igual a 8Ω .



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Os ensaios seguintes foram realizados com amostras de PRP, em uma proporção de uma bactéria para dez plaquetas, na presença de colágeno (5 µg/mL).

Na Figura 12 temos o controle positivo, onde as plaquetas foram estimuladas somente com colágeno. É possível distinguir a curva característica de mudança de forma das plaquetas, seguida por uma agregação máxima de 54%.

Na Figura 13A temos os testes com a estirpe saprófita, onde não foi possível observar a ativação plaquetária. O teste foi repetido (Figura 13B) e os mesmos resultados foram observados. Logo após adição das bactérias há uma queda da linha de base que não sobe nem após adição do colágeno.

Os testes na presença da estirpe LO4 (Figura 14) foram semelhantes aos testes na presença da estirpe Patoc, nos quais podemos verificar que há uma queda da linha de base após a adição das leptospiros. As bactérias permaneceram em contato com as plaquetas por 1min 30s, seguido pela adição do colágeno, mas novamente não foi observada a ativação plaquetária.

Devido à longa duração dos testes, suspeitou-se da viabilidade das plaquetas, então, um novo ensaio controle foi realizado (Figura 15). Após adição do colágeno às plaquetas foi possível observar a fase *lag*, seguida pela ativação plaquetária, que atingiu um valor de 64%, portanto as plaquetas ainda estavam ativas.

Figura 12 – Curva de agregação plaquetária obtida com a primeira amostra de PRP (voluntário 2), contendo $9,3 \times 10^7$ plaquetas, e colágeno (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como agonista. Controle positivo com colágeno (1min), capaz de promover uma agregação plaquetária máxima de 54%. A seta indica a ocorrência da fase lag.

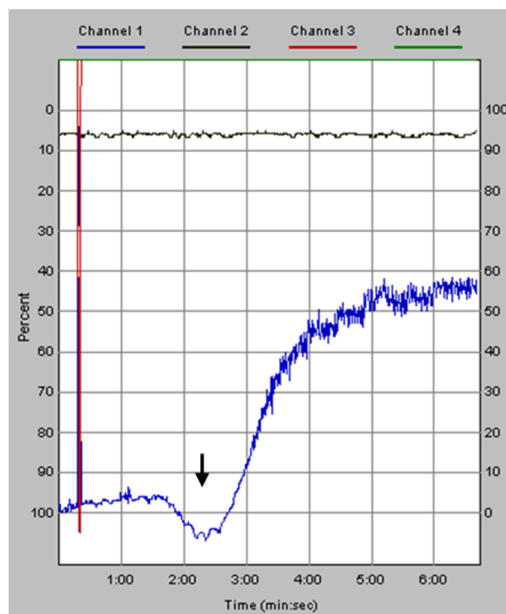
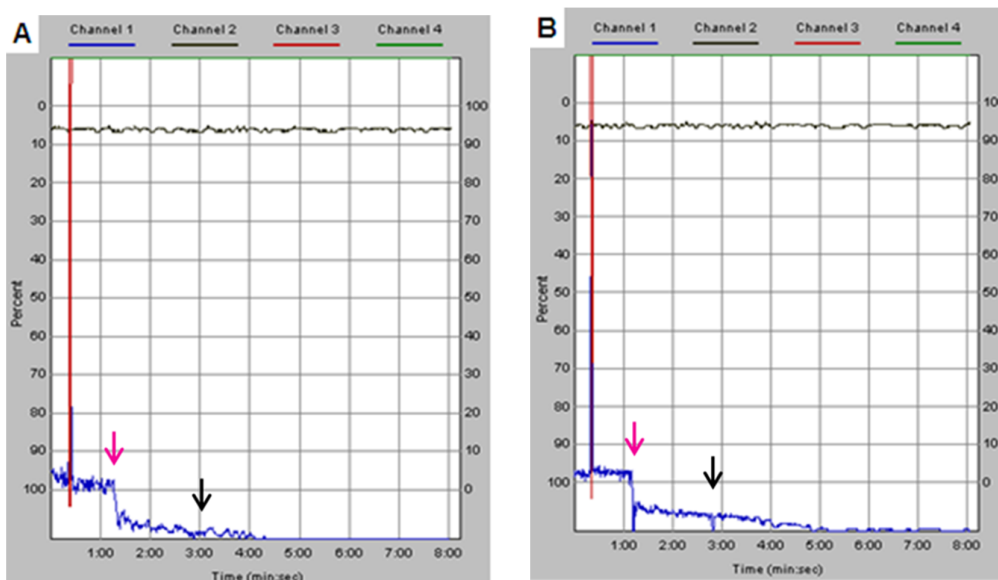


Figura 13 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com a primeira amostra de PRP (voluntário 2), contendo $9,3 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe Patoc (proporção de uma leptospira para dez plaquetas) e colágeno (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como agonista. **(A)** As bactérias foram adicionadas com 1min 15s e após 1min 30s, o colágeno foi adicionado. **(B)** Na repetição do teste com a estirpe Patoc. As bactérias foram adicionadas com 1min 10s, seguido pela adição de colágeno após 1min e 30s. Não houve ativação plaquetária em ambos os ensaios. Seta preta indica a adição do colágeno e a seta rosa indica a adição da estirpe Patoc.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Figura 14 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com primeira amostra de PRP (voluntário 2), contendo $9,3 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe LO4 (proporção de uma leptospira para dez plaquetas) e colágeno ($5 \mu\text{g/mL}$) como agonista. **(A)** As bactérias foram adicionadas com 1min 30s, seguido pela adição de colágeno após 1min 30s. **(B)** Na repetição do teste com a estirpe LO4, as bactérias foram adicionadas com 2min 25s, seguido pela adição de colágeno após 1min 30s. Não houve ativação plaquetária em ambos os ensaios. Seta preta indica a adição do colágeno e a seta verde indica a adição da estirpe LO4.

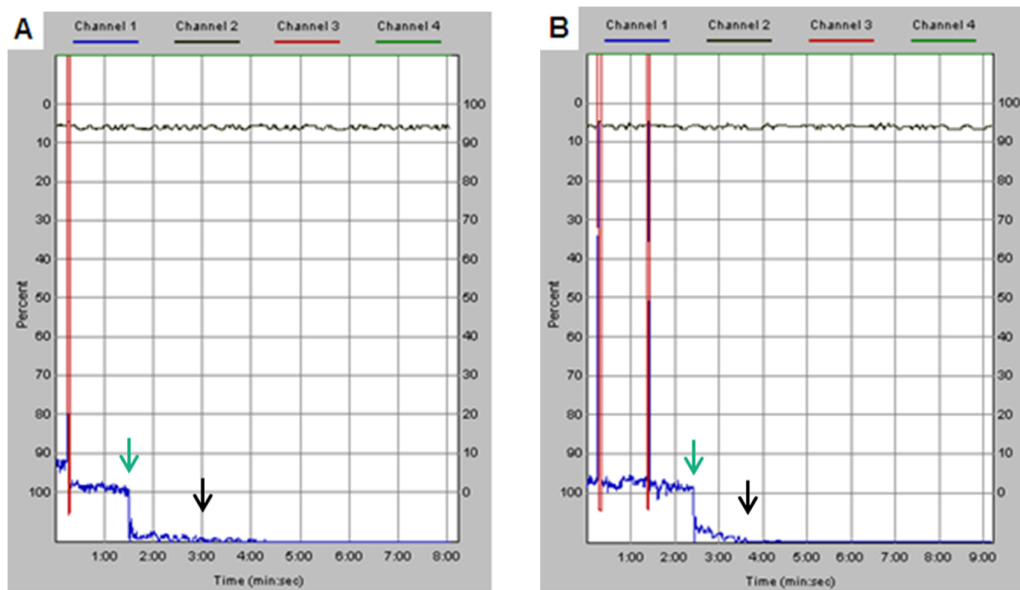
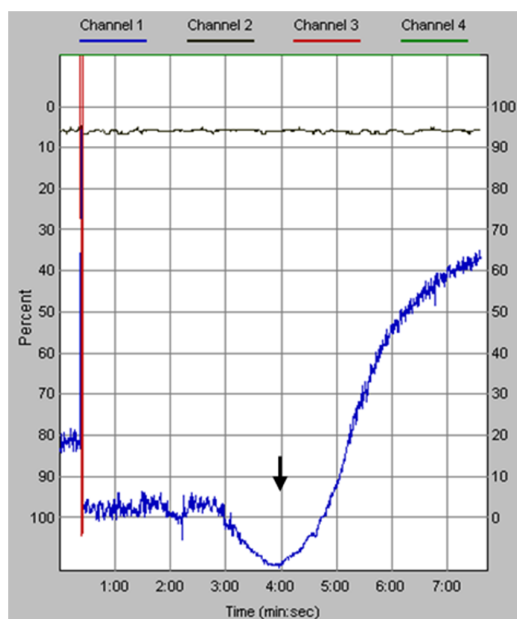


Figura 15 – Curva de agregação plaquetária obtida com a primeira amostra de PRP (voluntário 2), contendo $9,3 \times 10^7$ plaquetas. Verificação da viabilidade das plaquetas na presença de colágeno ($5 \mu\text{g/mL}$). As plaquetas foram incubadas com colágeno adicionado a 2min 10s, sendo capaz de promover uma agregação máxima de 64%. A seta indica a ocorrência da fase *lag*.

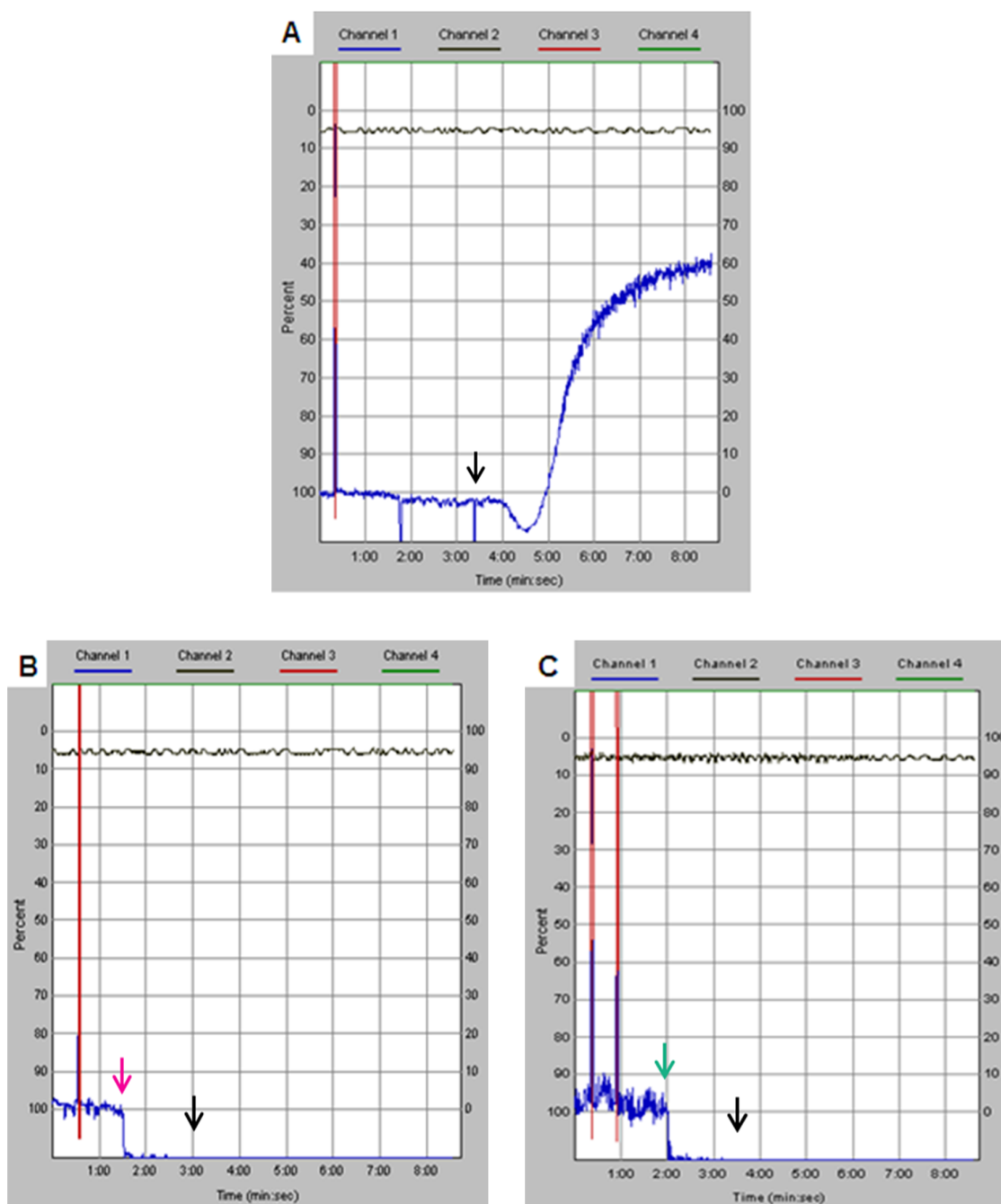


Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Para confirmar os resultados anteriores, uma nova coleta de sangue foi realizada e o teste de agregação foi repetido utilizando-se a proporção de uma leptospira para cada plaqueta. Um novo controle positivo, também, foi realizado e pode ser visualizado na Figura 16A. Para verificar se o tampão no qual as leptospirosas foram ressuspensas estava interferindo no ensaio, 10 μ L de Tyrode pH 6,2 sem cálcio foram adicionados. Pode-se observar a ocorrência de uma linha decrescente no momento da adição do tampão. O colágeno foi adicionado às plaquetas com 3min 20s e uma segunda linha decrescente pode ser observada. Após o quarto minuto pode-se observar a curva característica da mudança de forma das plaquetas, atingindo uma agregação máxima de 63%. Na Figura 16B temos o teste com a estirpe Patoc, no qual pode-se observar uma queda da linha de base, após a adição das leptospirosas. Porém mesmo após adição do colágeno não é possível visualizar a ativação plaquetária. No teste com a estirpe LO4 (Figura 16C), também não foi possível observar agregação plaquetária, pois após adição das bactérias (2min), há uma queda da linha de base, que não sobe nem após adição do colágeno.

Nas amostras de PRP nas quais as leptospirosas (Patoc ou LO4) estavam presentes não foi observada a agregação plaquetária, mesmo após adição do agonista (colágeno). Entretanto as plaquetas se encontravam viáveis como pode ser observado nos ensaios com o controle positivo.

Figura 16 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com a segunda amostra de PRP (voluntário 2), contendo $6,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença das estirpes Patoc e LO4 (proporção de uma leptospira para cada plaqueta) e colágeno ($5 \mu\text{g/mL}$) como agonista. **(A)** Agregação na presença do tampão Tyrode (1min 50s) e colágeno (3min 20s), com um valor de agregação igual a 63%. **(B)** Agregação na presença da estirpe Patoc (1min 30s), seguido pela adição de colágeno após 1min 30s. **(C)** Agregação na presença da estirpe LO4 (2min), seguido pela adição de colágeno após 1min 30s. Nos ensaios realizados na presença das leptospiiras não foi possível observar a agregação plaquetária. Seta preta indica a adição do colágeno, a seta rosa indica a adição da estirpe Patoc e a seta verde indica a adição da estirpe LO4.

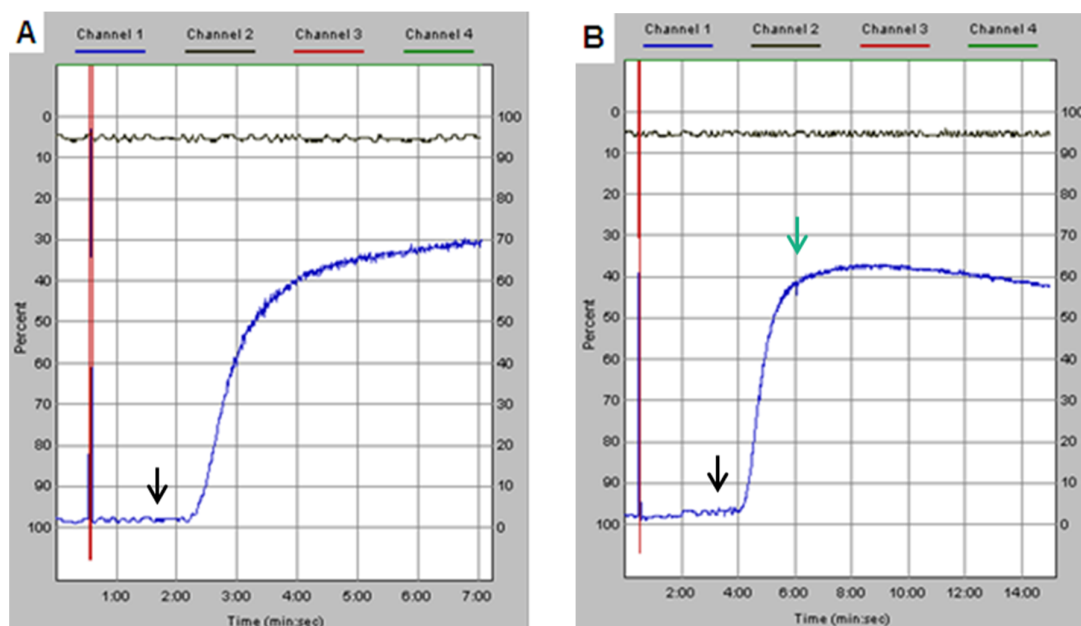


Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

O ensaio de agregação plaquetária com a amostra de PL foi realizado a partir da segunda coleta de sangue, com uma proporção de uma leptospira para 10 plaquetas. Por se tratar de uma segunda amostra de um mesmo doador (voluntário 2), o volume obtido foi suficiente para realização de somente dois testes. Na Figura 17A temos o controle positivo, onde as plaquetas foram ativadas com colágeno, atingindo um valor máximo de agregação igual a 68%. Em um segundo teste decidimos adicionar as leptospiros após o estímulo do colágeno para verificar se haveria inibição da agregação pelas leptospiros. Assim, as plaquetas foram estimuladas com colágeno, que foi capaz de promover a ativação plaquetária. Após 6min do início da incubação, a estirpe LO4 foi adicionada a reação e não houve inibição da agregação plaquetária iniciada pelo colágeno, que chegou a atingir um valor de 59%.

Os resultados obtidos nestes ensaios mostraram que as leptospiros LO4 (patogênica) e Patoc (saprófita) não foram capazes de ativar plaquetas humanas “*in vitro*” na proporção de uma bactéria para 10 plaquetas em amostras de ST, PRP e PL.

Figura 17 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PL (voluntário 2), contendo $1,2 \times 10^8$ plaquetas, na presença das estirpes LO4 (proporção de uma leptospira para dez plaquetas) e colágeno (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como agonista. **(A)** Controle positivo, onde após a adição do colágeno (1min 40s), as plaquetas foram ativadas, o que promoveu uma agregação de 68%. **(B)** Agregação plaquetária na presença de colágeno (3min 30s). Após 6 min do início da incubação, a estirpe de LO4 foi adicionada a reação. A agregação atingiu um valor de 59%. Seta preta indica a adição do colágeno e a seta verde indica a adição da estirpe LO4.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

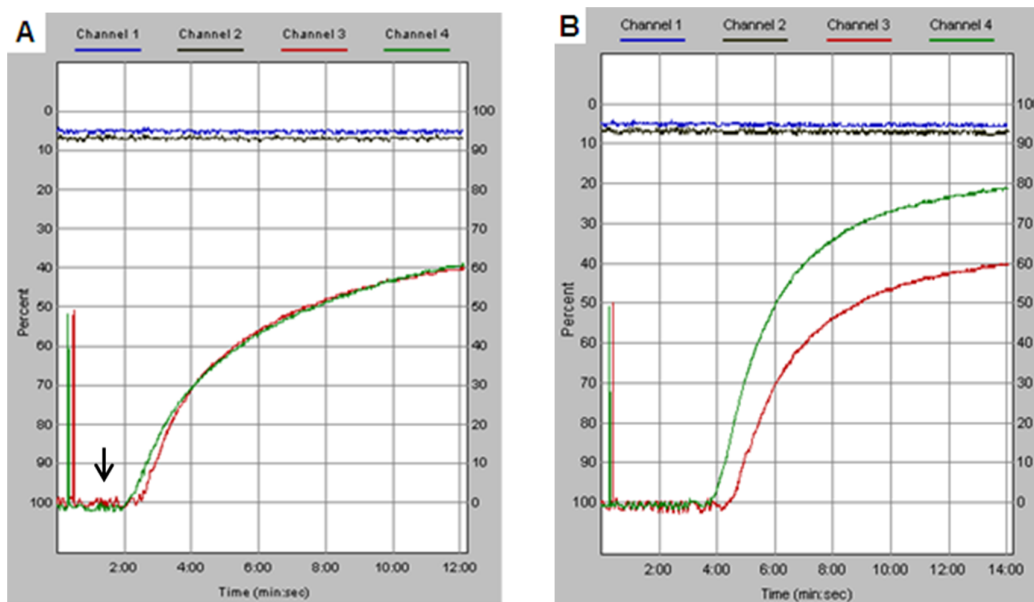
5.2.3 Avaliação da agregação plaquetária em amostras de ST estimuladas com colágeno, ADP ou TRAP, na presença das estirpes patogênicas de leptospira

O terceiro experimento foi realizado com o objetivo de verificar se a agregação plaquetária depende de uma maior quantidade de leptospiras em relação às plaquetas. Neste sentido, duas estirpes patogênicas de leptospira (L1-130 e LO4), foram utilizadas com uma proporção de 10 leptospiras para cada plaqueta. Além disso, três diferentes agonistas foram comparados: colágeno (12,5 µg/mL), ADP (25 µM) ou o peptídeo ativador do receptor da trombina, conhecido como TRAP (0,4 mM).

Neste ensaio, o analisador hematológico estava em manutenção, por isso não foi possível realizar a contagem de plaquetas. Com base nos experimentos anteriores, calculamos a média das concentrações das plaquetas obtidas do voluntário 2 e consideramos o valor médio ($1,3 \times 10^8$ plaquetas) para realização dos testes de agregação plaquetária.

Na Figura 18A temos o controle positivo, no qual em ambos os canais a agregação ocorreu na presença de colágeno, com um resultado médio de $24,5 \pm 0,7 \Omega$. No canal 3 (vermelho) da Figura 18B, temos a agregação na presença da estirpe L1-130, que permaneceu em contato com as plaquetas por 1min 30s, mas essa interação não foi capaz de ativar as plaquetas. A agregação só é observada após adição do colágeno à reação, que proporcionou uma agregação máxima de 25 Ω . Já no canal 4 (verde) da Figura 18B, as plaquetas foram incubadas com a estirpe LO4, que também não foi capaz de ativar as plaquetas. Novamente, a agregação só foi observada após adição do colágeno, atingindo um valor de 32 Ω . Nesse experimento, utilizando a amostra de ST, as plaquetas foram capazes de agregar na presença de ambas as estirpes, mas somente após a adição do agonista. A estirpe LO4 coadministrada com o colágeno estimulou a agregação plaquetária de forma mais acentuada (32 Ω) do que o controle positivo, somente com colágeno ($24,5 \pm 0,7 \Omega$). Enquanto que a estirpe L1-130 na presença de colágeno foi capaz de estimular a agregação plaquetária de maneira similar ao controle positivo, atingindo uma agregação plaquetária de 25 Ω .

Figura 18 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 2), contendo $1,3 \times 10^8$ plaquetas, na presença das estirpes patogênicas L1-130 e LO4 (proporção de dez leptospiras para cada plaqueta) e colágeno ($12,5 \mu\text{g/mL}$) como agonista. **(A)** Em ambos os canais as plaquetas foram ativadas com colágeno, atingindo uma agregação média de $24,5 \pm 0,7 \Omega$. A seta indica o momento em que o colágeno foi adicionado. **(B)** No canal 3 (vermelho) temos uma agregação na presença da estirpe L1-130 adicionada com 2min, seguido pela adição de colágeno após 1min 30s, que ativou as plaquetas com uma agregação de 25Ω . No canal 4 (verde) a agregação ocorreu na presença da estirpe LO4, que foi adicionada com 1min 30s. Após 1min e 30s de incubação, o colágeno foi adicionado provocando uma agregação de 32Ω .



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

O teste seguinte foi realizado com $25 \mu\text{M}$ do agonista ADP em amostra de ST.

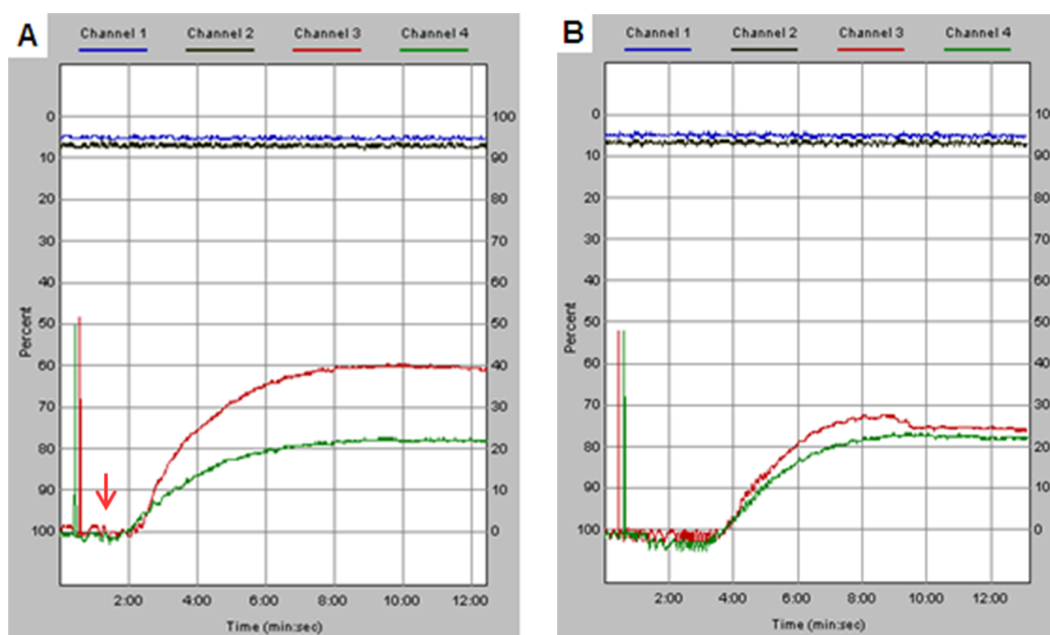
O ADP está presente nos grânulos densos das plaquetas, mas também é utilizado como agonista plaquetário, sendo considerado um agonista fraco quando comparado com o colágeno (RAND; LEUNG; PACKHAM, 2003; ZHOU; SCHMAIER, 2005). O ADP pode ativar as plaquetas através de dois receptores purinérgicos (P2) acoplados à proteína G. O receptor P2Y1 ativa a fosfolipase C, que induz mudança de forma das plaquetas e inicia a onda primária da agregação plaquetária, através da mobilização de cálcio. Já o receptor P2Y12, considerado o principal receptor de ADP, medeia totalmente a agregação plaquetária por inibição da adenilato ciclase e estabilização dos agregados plaquetários (ZHOU; SCHMAIER, 2005).

Na Figura 19A, temos o controle positivo, onde em ambos os canais as plaquetas foram estimuladas com ADP, a agregação atingiu um valor médio de $12,5 \pm 4,9 \Omega$.

Apenas a presença das bactérias não foi suficiente para promover a agregação plaquetária, que só ocorreu após a adição do ADP. Na Figura 19B

podemos observar o perfil de agregação na presença da estirpe L1-130 juntamente com ADP (canal 3 - vermelho) que foi levemente superior à agregação na presença da estirpe LO4 juntamente com ADP (canal 4 - verde), que atingiram valores de agregação de 12 Ω e 10 Ω , respectivamente. Nenhuma das estirpes de leptospiros testadas foi capaz de estimular a agregação plaquetária de maneira mais acentuada do que a média do controle positivo.

Figura 19 - Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 2), contendo $1,3 \times 10^8$ plaquetas, na presença das estirpes L1-130 e LO4 (proporção de dez leptospiros para cada plaqueta) e ADP (25 μ M) como agonista. **(A)** Em ambos os canais as plaquetas foram ativadas com ADP, atingindo uma agregação média de $12,5 \pm 4,9 \Omega$. A seta indica o momento em que o agonista foi adicionado. **(B)** No canal 3 (vermelho) temos uma agregação na presença da estirpe L1-130, que foi adicionada com 1min 30s, seguido pela adição de ADP após 1min 30s de incubação, que ativou as plaquetas de forma que a agregação atingisse 12 Ω . No canal 4 (verde) a agregação ocorreu na presença da estirpe LO4, que foi adicionada com 1min 15s, e após 1min 30s, o ADP foi adicionado provocando uma agregação de 10 Ω .



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

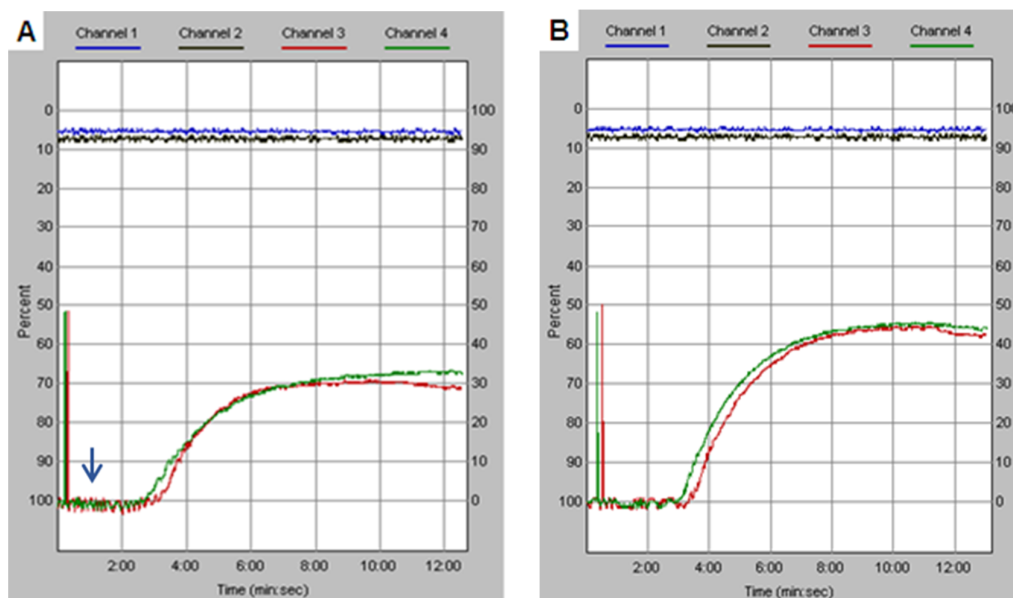
O terceiro agonista utilizado neste experimento foi o TRAP (0,4 mM). O TRAP é um hexapeptídeo (SFLLRN), que corresponde aos aminoácidos 42 a 47 da trombina, imitando seus efeitos, como a agregação plaquetária. A sinalização plaquetária pela trombina é mediada por um receptor ativado por protease (PAR), que está acoplado à proteína G. O PAR é ativado após a ligação à trombina, que é seguido pela clivagem da extremidade amino-terminal do receptor. Esta extremidade atua como um ligante de PAR, resultando em um sinal transmembrânico. Em

contraste, os peptídeos sintéticos como o peptídeo agonista do receptor de trombina (TRAP) ativam o receptor independente da clivagem da extremidade amino-terminal do receptor PAR-1 (LANDESBURG et al., 2005).

Na Figura 20A temos o controle positivo, onde em ambos os canais as plaquetas foram estimuladas com o TRAP, que foi capaz de ativar as plaquetas com uma agregação média de $12,5 \pm 0,7 \Omega$. A Figura 20B ilustra o perfil de agregação na presença das estirpes L1-130 (canal 3 - vermelho) e LO4 (canal 4 - verde). Ambas as estirpes, quando coadministradas com TRAP, promoveram uma agregação superior ao controle, porém não houve diferença entre as estirpes, que atingiram um valor de 18Ω .

De forma geral, os dados obtidos com esses ensaios confirmaram os resultados anteriores, nos quais foram observados que as leptospiros patogênicas (L1-130 e LO4) não foram capazes de ativar as plaquetas humanas em amostras de ST, mesmo numa proporção de maior número de bactérias do que plaquetas (10:1).

Figura 20 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 2), contendo $1,3 \times 10^8$ plaquetas, na presença das estirpes L1-130 e LO4 (proporção de dez leptospiros para cada plaqueta) e TRAP (0,4 mM) como agonista. **(A)** Em ambos os canais as plaquetas foram ativadas com TRAP, atingindo uma agregação média de $12,5 \pm 0,7 \Omega$. A seta indica o momento em que o colágeno foi adicionado. **(B)** No canal 3 (vermelho) temos uma agregação na presença da estirpe L1-130 (1min 20s), seguido pela adição do TRAP após 1min 30s, que ativou as plaquetas (18Ω). No canal 4 (verde) a agregação ocorreu na presença da estirpe LO4 (1min), seguido pela adição do TRAP após 1min 30s, provocando uma agregação de 18Ω .



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

5.2.4 Avaliação da agregação plaquetária em amostras de ST estimuladas com colágeno, ADP ou TRAP, na presença das estirpes patogênicas de leptospira

No quarto experimento, novamente as amostras de ST foram estimuladas com colágeno (12,5 µg/mL), ADP (25 µM) ou TRAP (0,4 mM), na presença das estirpes patogênicas (L1-130 e LO4). O objetivo deste ensaio, foi testar a proporção de uma bactéria para cada plaqueta.

Na Figura 21A, em ambos os canais, as plaquetas foram estimuladas com colágeno, que foi capaz de promover agregação plaquetária, com um valor médio de $16 \pm 5,7 \Omega$. Na Figura 21B, as plaquetas permaneceram em contato com as bactérias por um minuto e meio, mas a agregação só pôde ser observada após a adição do agonista. No canal 3 (vermelho) as plaquetas, que foram incubadas na presença da estirpe L1-130, juntamente com colágeno, foram capazes de agregar as plaquetas com um valor máximo de 40Ω . Já quando as plaquetas foram incubadas na presença da LO4, juntamente com colágeno, a agregação atingiu 38Ω . Na Figura 21C temos uma repetição deste ensaio. No qual as plaquetas foram incubadas na presença da estirpe LO4, juntamente com o colágeno (canal 3 – vermelho), atingindo uma agregação de 28Ω . E a estirpe L1-130 foi incubada com as plaquetas ativadas pelo colágeno (canal 4 – verde) que atingiram uma agregação máxima de 22Ω . As plaquetas que foram estimuladas com colágeno, na presença das bactérias, atingiram valores maiores do que as plaquetas que foram estimuladas somente com o colágeno (valor médio igual $16 \pm 5,7 \Omega$). Sendo que na presença da estirpe LO4 (valor médio igual $33 \pm 7,1 \Omega$), a agregação foi maior que na presença da estirpe L1-130 (valor médio igual $31 \pm 12,7\Omega$).

O teste seguinte foi realizado na presença do agonista ADP. Na Figura 22A, em ambos os canais, as plaquetas foram estimuladas somente com o agonista, que foi capaz de promover agregação plaquetária, com um valor médio de $12 \pm 1,4 \Omega$. Na Figura 22B, pode-se observar que as plaquetas permaneceram em contato com as bactérias por um minuto e meio, mas a agregação só foi observada após a adição do agonista. No canal 3 (vermelho) as plaquetas, incubadas com a estirpe L1-130, e posteriormente com ADP, foram capazes de agregar e atingir um valor máximo de 17Ω . Resultado semelhante foi obtido, quando as plaquetas foram incubadas com LO4, e posteriormente com ADP, no qual a agregação atingiu o valor máximo de 16Ω . A repetição deste ensaio pode ser visualizada na Figura 22C, no qual as

plaquetas incubadas com ambas as estirpes e ADP, atingiram uma agregação máxima de 12 Ω (LO4 no canal 3 e L1-130 no canal 4). Nos ensaios em que as plaquetas foram estimuladas com ADP na presença das estirpes patogênicas de leptospira, os valores atingidos foram um pouco superiores do que quando as plaquetas foram estimuladas somente com o ADP (valor médio igual a $12,5 \pm 0,7 \Omega$). Sendo que a agregação média entre os ensaios realizados na presença da estirpe L1-130 (valor médio igual a $14,5 \pm 3,5 \Omega$) foram semelhantes aos valores médios obtidos com a estirpe LO4 (valor médio igual $14 \pm 2,8 \Omega$).

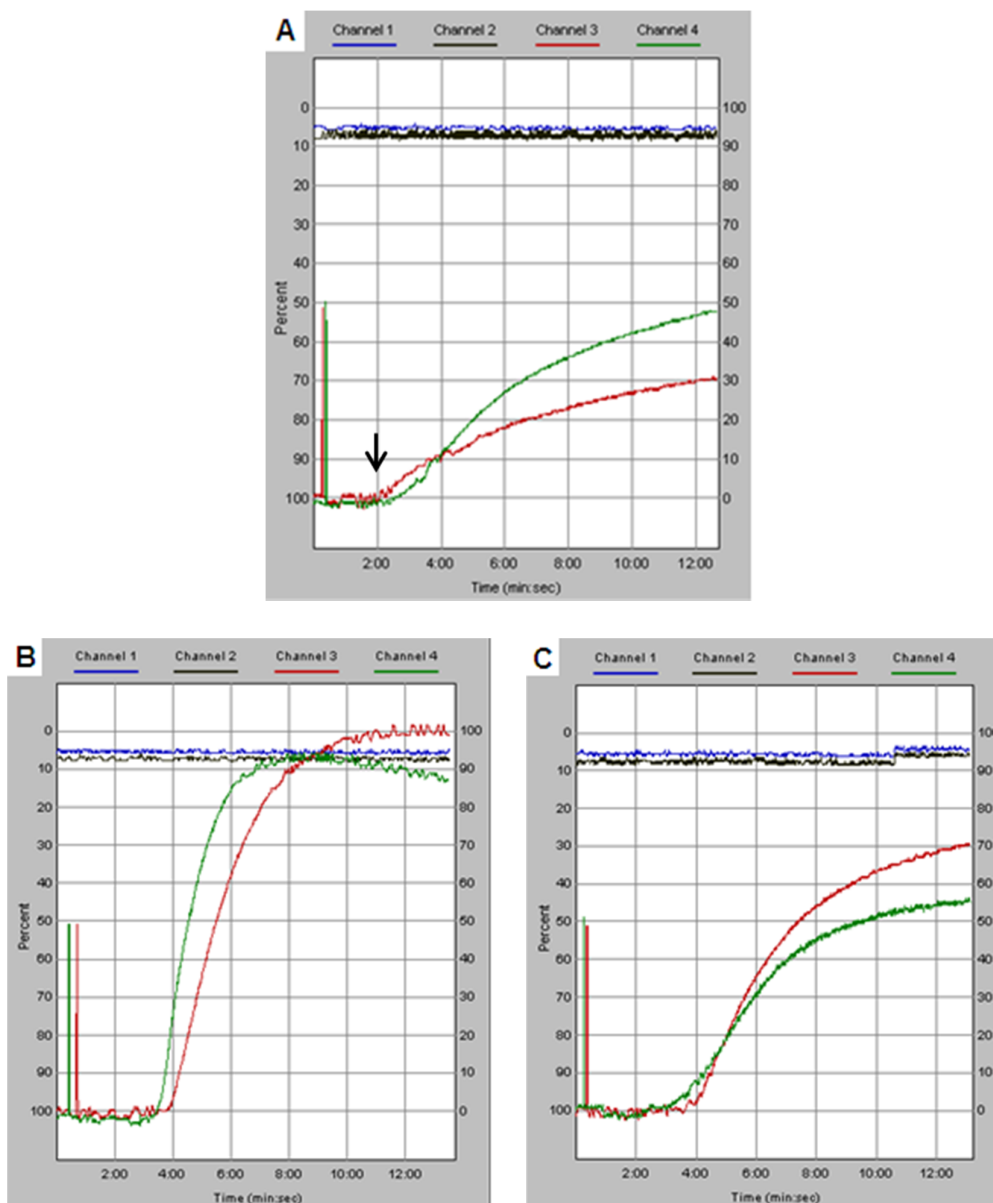
Os ensaios seguintes foram realizados na presença do agonista TRAP. Na Figura 23A, em ambos os canais, as plaquetas foram estimuladas somente com o agonista, que foi capaz de promover a agregação plaquetária, com um valor médio de $19,5 \pm 0,7 \Omega$. Na Figura 23B, as plaquetas permaneceram em contato com as bactérias por um minuto e meio, mas a agregação só pode ser observada após a adição do agonista. No canal 3 (vermelho) as plaquetas que foram incubadas na presença da estirpe L1-130, juntamente com TRAP, foram capazes de agregar com um valor máximo de 22 Ω . Já quando as plaquetas foram incubadas na presença da LO4, juntamente com TRAP, a agregação atingiu o valor máximo de 16 Ω (canal 4 - verde). Na Figura 23C temos uma repetição deste ensaio. As plaquetas foram incubadas com a estirpe LO4, juntamente com o TRAP, no canal 3 (vermelho), com uma agregação de 21 Ω . E a estirpe L1-130 quando incubada com as plaquetas e ativadas pelo TRAP (canal 4 - verde) atingiu uma agregação máxima de 16 Ω . Não houve grande diferença entre os valores máximos de agregação obtidos com as plaquetas que foram estimuladas com as bactérias e TRAP. O valor médio da agregação no controle positivo (somente TRAP) foi de $19,5 \pm 0,7 \Omega$, enquanto que o valor médio na presença de LO4 e TRAP foi de $18,5 \pm 3,5 \Omega$ e na presença de L1-130 e TRAP foi de $19 \pm 4,2 \Omega$.

O terceiro e quarto experimentos foram realizados utilizando amostras de ST estimuladas com diferentes agonistas (colágeno, TRAP e ADP). Na presença do colágeno, pode-se observar que ambas as estirpes apresentam um valor médio de agregação superior ao controle ($20,3 \pm 5,9 \Omega$), sendo que a estirpe LO4 foi ainda superior à estirpe L1-130, com $33 \pm 5,6 \Omega$ e $30,3 \pm 10,4 \Omega$, respectivamente. Nos testes em que o agonista foi o TRAP, pode-se observar que ambas as estirpes apresentam um valor médio de agregação superior ao controle ($16 \pm 4,1 \Omega$), sendo que a estirpe L1-130 ($19,3 \pm 3,2 \Omega$) foi um pouco superior à estirpe LO4 ($18,7 \pm 3,1$

Ω). Nas amostras onde o agonista utilizado foi o ADP, o valor médio de agregação na presença da estirpe L1-130 ($13,7 \pm 3,8 \Omega$) foi levemente superior ao valor médio de agregação na presença da estirpe LO4 ($12,3 \pm 2,5 \Omega$), que foi muito semelhante ao valor médio do controle ($12,3 \pm 2,9 \Omega$).

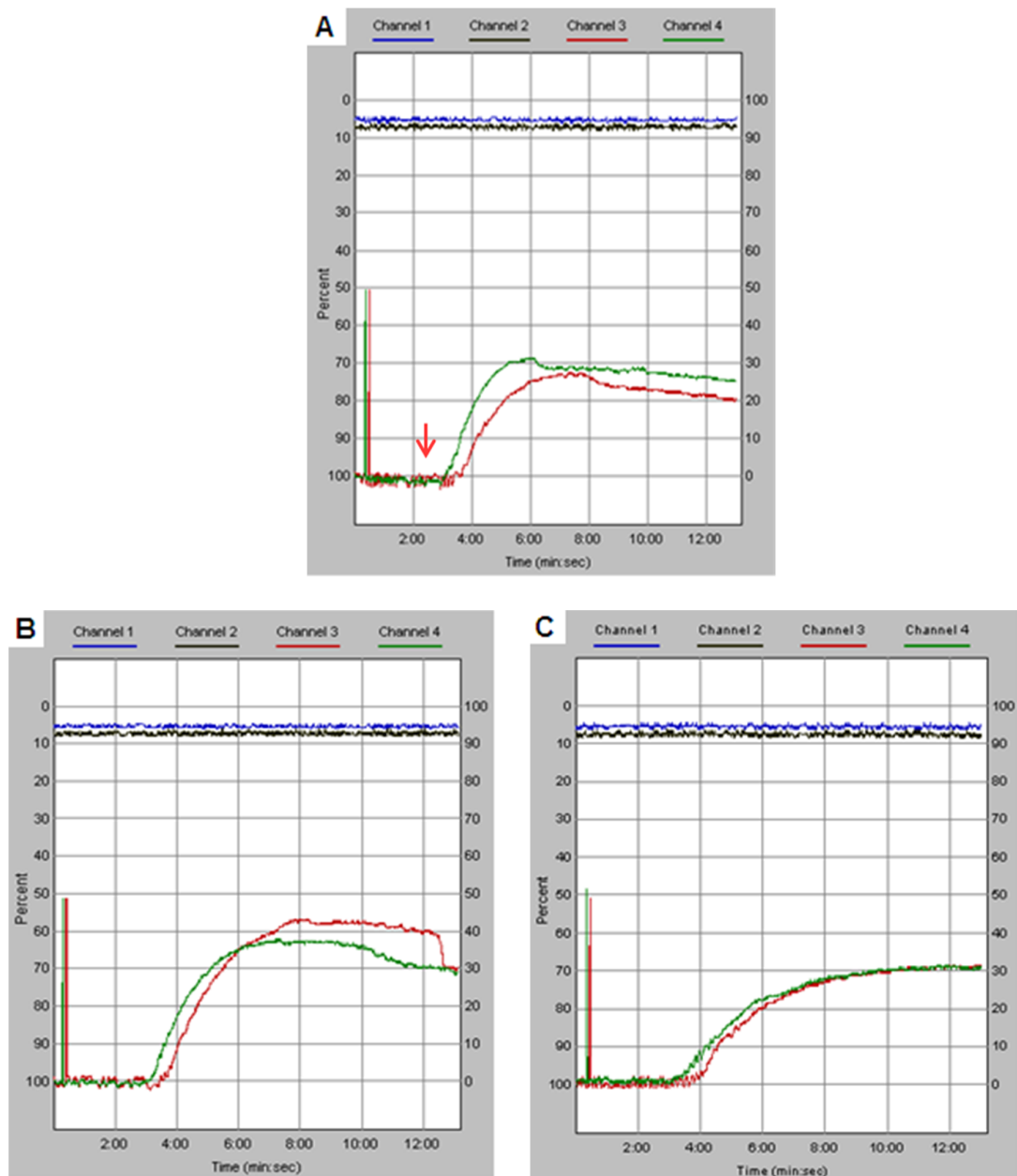
Em resumo, nos ensaios com amostra de ST, utilizando diferentes agonistas (colágeno, TRAP ou ADP), na presença das estirpes patogênicas (L1-130 e LO4), os resultados foram coerentes com a potência do agonista. Onde o agonista mais potente foi o colágeno, seguido pelo TRAP e ADP. E mais uma vez, foi observado que as estirpes de leptospiras testadas não são capazes de induzir a agregação plaquetária.

Figura 21 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 1), contendo $1,1 \times 10^8$ plaquetas, na presença das estirpes L1-130 e LO4 (proporção de uma leptospira para cada plaqueta) e colágeno ($12,5 \mu\text{g/mL}$) como agonista. **(A)** Em ambos os canais as plaquetas foram ativadas com colágeno, atingindo uma agregação média de $16,5 \pm 5,7 \Omega$. A seta indica o momento em que o colágeno foi adicionado. **(B)** No canal 3 (vermelho) temos a agregação na presença da estirpe L1-130 (1min 45s), seguido pela adição do colágeno após 1min 30s, que ativou as plaquetas, de forma que a agregação atingisse 40Ω . No canal 4 (verde) a agregação ocorreu na presença da estirpe LO4 (1min 20s), seguido pela adição do colágeno após 1min 30s, provocando uma agregação de 38Ω . **(C)** No canal 3 (vermelho) temos uma agregação na presença da estirpe LO4 (1min 15s), seguido pela adição do colágeno após 1min 30s, no qual a agregação atingiu 28Ω . No canal 4 (verde) a agregação ocorreu na presença da estirpe L1-130 (55s), seguido pela adição do colágeno após 1min 30s, provocando uma agregação de 22Ω .



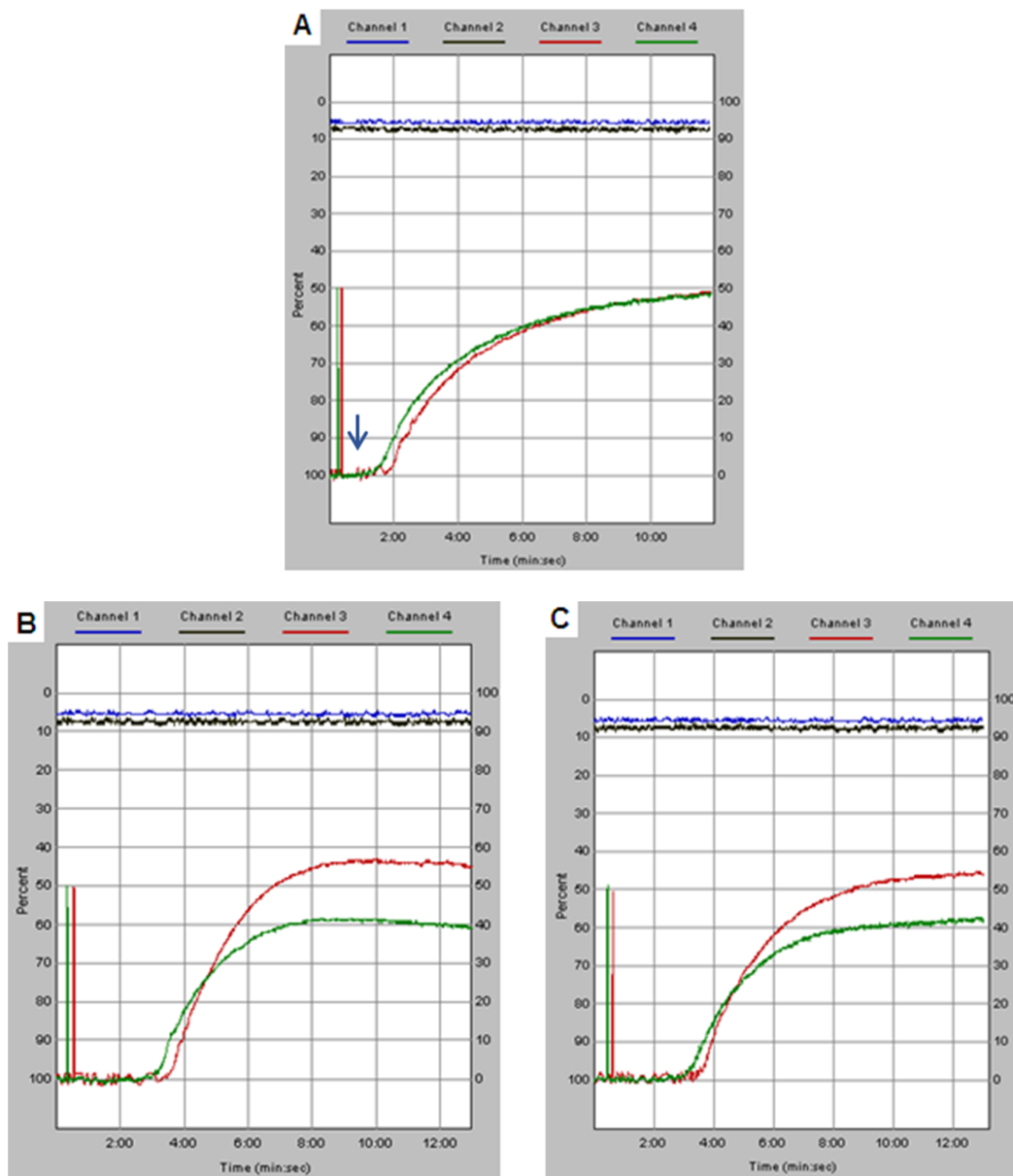
Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Figura 22 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 1), contendo $1,1 \times 10^8$ plaquetas na presença das estirpes L1-130 e LO4 (proporção de uma leptospira para cada plaqueta) e ADP (25 μ M) como agonista. **(A)** Em ambos os canais as plaquetas foram ativadas com ADP, atingindo uma agregação média de $12 \pm 1,4 \Omega$. A seta indica o momento em que o ADP foi adicionado. **(B)** No canal 3 (vermelho) temos uma agregação na presença da estirpe L1-130 (1min 25s), seguido pela adição do ADP após 1min 30s, que ativou as plaquetas, de forma que a agregação atingisse 17 Ω . No canal 4 (verde) a agregação ocorreu na presença da estirpe LO4 (1min), seguido pela adição do ADP após 1min 30s, provocando uma agregação de 16 Ω . **(C)** No canal 3 (vermelho) temos uma agregação na presença da estirpe LO4 (1min 25s), seguido pela adição do ADP após 1min 30s, a agregação atingiu 12 Ω . No canal 4 (verde) a agregação ocorreu na presença da estirpe L1-130 (1min), seguido pela adição do ADP após 1min 30s, provocando uma agregação de 12 Ω .



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Figura 23 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 1), contendo $1,1 \times 10^8$ plaquetas, na presença das estirpes L1-130 e LO4 (proporção de uma leptospira para cada plaqueta) e TRAP (0,4mM) como agonista. **(A)** Em ambos os canais as plaquetas foram ativadas com TRAP, atingindo uma agregação média de $19,5 \pm 0,7 \Omega$. A seta indica o momento em que o TRAP foi adicionado. **(B)** No canal 3 (vermelho) temos uma agregação na presença da estirpe L1-130 (1min 20s), seguido pela adição do TRAP após 1min 30s, que ativou as plaquetas, de forma que a agregação atingisse 22Ω . No canal 4 (verde) a agregação ocorreu na presença da estirpe LO4 (1min), seguido pela adição do TRAP após 1min 30s, provocando uma agregação de 16Ω . **(C)** No canal 3 (vermelho) temos uma agregação na presença da estirpe LO4 (1min 20s), seguido pela adição do TRAP após 1min 30s, a agregação atingiu 21Ω . No canal 4 (verde) a agregação ocorreu na presença da estirpe L1-130 (1min), seguido pela adição do TRAP após 1min 30s, provocando uma agregação de 16Ω .



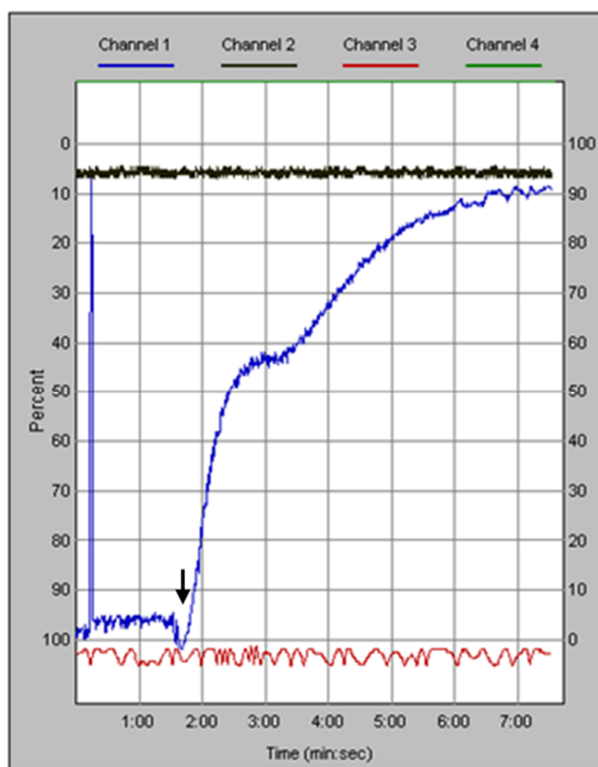
Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

5.2.5 Avaliação da agregação plaquetária em amostras de PRP estimuladas com a *S. aureus* ou com uma estirpe patogênica leptospira

O objetivo deste ensaio foi comparar os resultados de uma bactéria descrita na literatura como capaz de agregar plaquetas com os da estirpe de leptospira patogênica (L1-130). Para tanto, a *S. aureus* (ATCC 25923) foi utilizada numa proporção de cinco bactérias para cada plaqueta em amostra de PRP. Essa proporção foi escolhida com base em estudo previamente publicado com *S. aureus* (BAYER et al., 1995).

Para verificar se as plaquetas se encontravam viáveis foi realizado um teste controle, no qual as plaquetas foram estimuladas com ADP (25 μ M). Na Figura 24 (canal 1 – azul) observa-se que as plaquetas se encontravam viáveis, pois após a adição do agonista (1min) as plaquetas mudaram de forma (seta), promovendo uma agregação de 87%.

Figura 24 – Curva de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 2), contendo $1,5 \times 10^8$ plaquetas e ADP (25 μ M) como agonista. No canal 1 – azul, o agonista foi adicionado após 1min do início da incubação. O valor máximo obtido foi de 87%. A seta indica a ocorrência da fase lag.



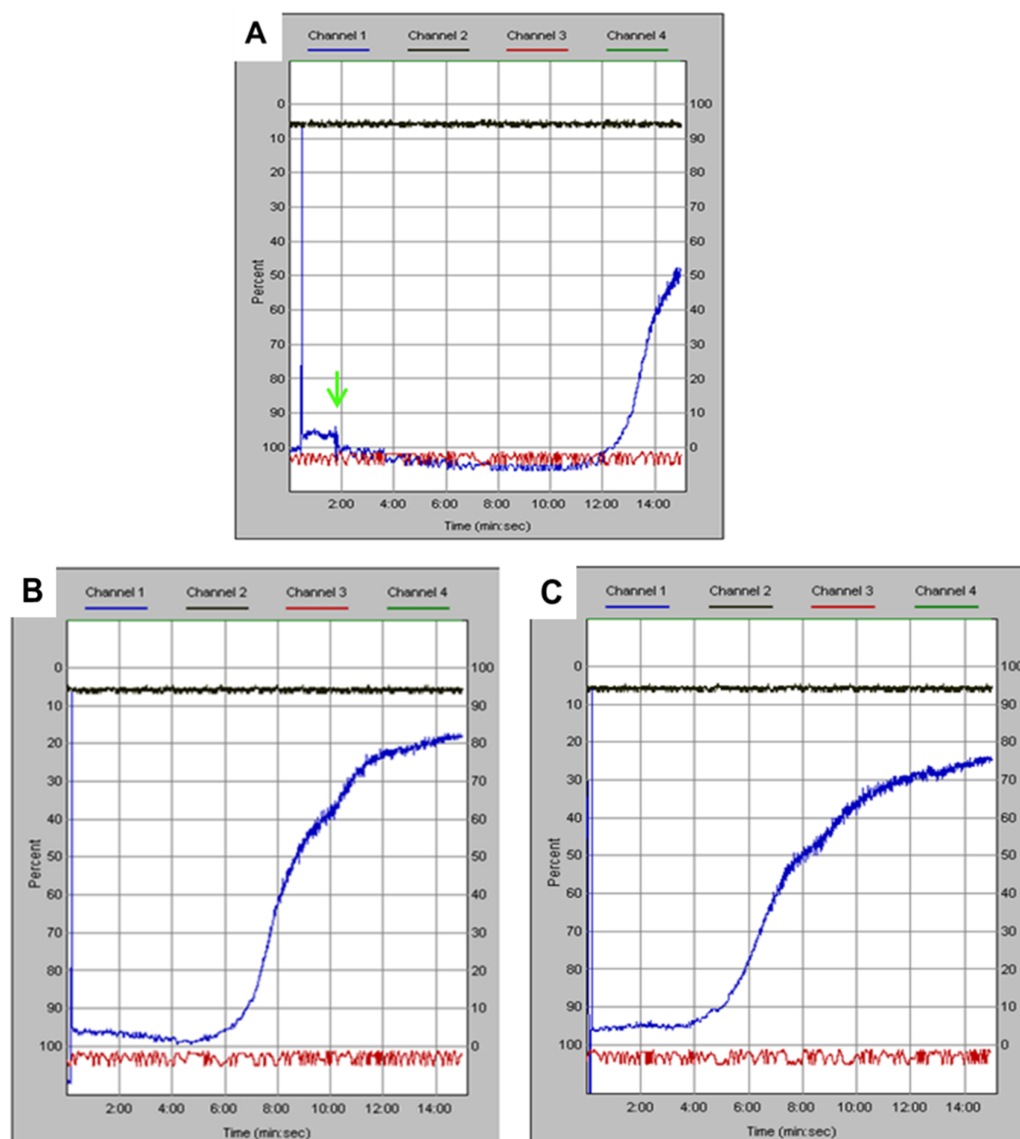
Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Em seguida foram realizados os testes com a bactéria *S. aureus*. Na Figura 25A observa-se que a cepa utilizada de *S. aureus* é capaz de promover a ativação plaquetária (canal 1 – azul). As bactérias foram adicionadas com 2min de reação e as plaquetas só começaram a agregar com aproximadamente 12min de reação, atingindo uma agregação máxima de 52% em um tempo total de 15min. Essa demora na agregação plaquetária já foi relatada anteriormente na literatura. Existem duas hipóteses para explicar esse fenômeno. A primeira seria de que esse é o tempo necessário para que as plaquetas se liguem às bactérias, principalmente se essa ligação for do tipo indireta. E a segunda seria que a ativação do receptor plaquetário, pode não ser tão forte, resultando em uma fase *lag* mais prolongada. Diferentemente da agregação provocada por agonistas hemostáticos que geralmente levam cerca de 10s, algumas bactérias, dependendo de sua concentração, podem levar até 20min antes de induzir a agregação plaquetária (KERRIGAN; COX, 2010; HAMZEH-COGNASSE et al., 2015).

O agregômetro utilizado possui uma limitação com relação ao tempo, no qual só é possível registrar um tempo total de 15min. Como foi visto no teste descrito anteriormente, as plaquetas demoram cerca de 10min para iniciar a agregação quando induzidas pela cepa de *S. aureus* utilizada. Por esse motivo as plaquetas foram incubadas com as bactérias em microtubos por 10min em banho seco a 37 °C, antes de serem transferidas para o agregômetro. Desta forma, foi possível registrar o valor máximo da agregação induzida por essas bactérias. Como pode ser observado na Figura 25B (canal 1 – azul), após a incubação em microtubo por 10min, as bactérias começaram a agregar com aproximadamente 6min e ao final dos 15min (tempo total de 25min) as plaquetas atingiram uma agregação máxima de 77%. Realizamos uma repetição do teste descrito anteriormente, porém desta vez as plaquetas foram incubadas em microtubo com as bactérias por 15min, antes de serem transferidas para o agregômetro. Como pode-se observar na Figura 25C (canal 1 – azul) as plaquetas começaram a agregar com aproximadamente 5min de reação no agregômetro, atingindo uma agregação máxima de 72% após 15min de registro da agregação (tempo total de 30min).

As plaquetas ativadas por *S. aureus* apresentaram uma agregação média igual a $74,5 \pm 3,5\%$, um valor um pouco inferior quando comparado com as plaquetas ativadas por ADP (87%).

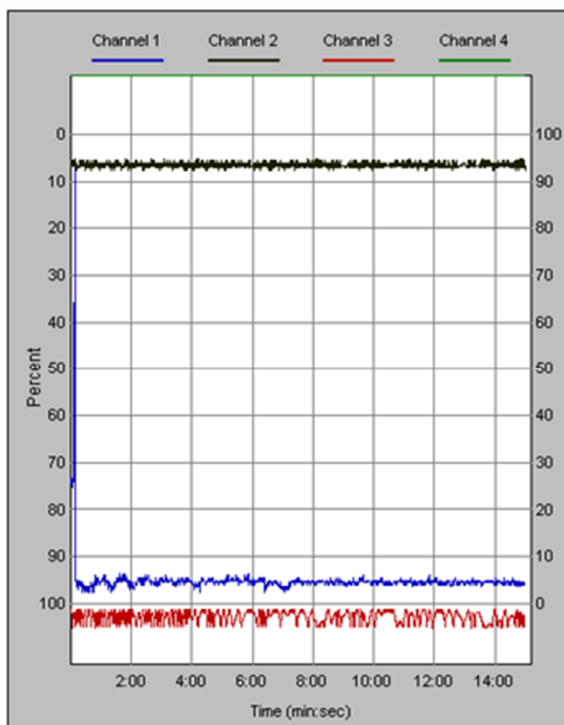
Figura 25 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 2), contendo $1,5 \times 10^8$ plaquetas, na presença de *S. aureus*. No agregômetro todos os ensaios foram realizados no canal 1 – azul, com um tempo total de 15min de registro. **(A)** As bactérias foram adicionadas após 2min do início da incubação (seta). As plaquetas iniciaram a agregação após 10min de incubação na presença das bactérias. Atingindo uma agregação máxima de 52%. **(B)** As plaquetas foram incubadas com as bactérias em microtubos e permaneceram por 10min em banho seco a 37 °C. Após esse período de incubação, a reação passou a ser registrada no agregômetro. As plaquetas iniciam a agregação após 6min do início do registro no agregômetro, atingindo uma agregação máxima de 77%. **(C)** As plaquetas foram incubadas com as bactérias em microtubos e permaneceram por 15min em banho seco a 37 °C. Após esse período de incubação a reação passou a ser registrada no agregômetro. As plaquetas iniciam a agregação após 4min do início do registro no agregômetro, atingindo uma agregação máxima de 72%.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Nos experimentos anteriores havia sido padronizado um tempo de interação entre as plaquetas e as leptospiras de um minuto e meio, após perceber que com 5min de interação as leptospiras não haviam promovido a ativação plaquetária. Pensando que as leptospiras também necessitariam de um tempo maior de interação com as plaquetas para induzir a ativação plaquetária, o seguinte ensaio foi realizado. As plaquetas foram incubadas com as leptospiras em microtubos por 30min em banho seco a 37 °C. Transcorrido esse período de incubação a reação passou a ser registrada no agregômetro. Nota-se na Figura 26 (canal 1 – azul) que as leptospiras não foram capazes de ativar a agregação plaquetária mesmo em tempo mais longos (tempo total de 45min).

Figura 26 – Curva de agregação plaquetária obtida com amostras de PRP (voluntário 2), contendo $1,5 \times 10^8$ plaquetas, na presença da estirpe L1-130 (proporção de cinco leptospiras para cada plaqueta). No canal 1 (azul) as plaquetas foram incubadas com as leptospiras em microtubos por 30min em banho seco a 37 °C. Transcorrido esse período a reação passou a ser registrada no agregômetro, porém não foi registrada agregação plaquetária.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

5.2.6 Avaliação da agregação plaquetária em amostras de PRP, estimuladas com colágeno ou ADP, na presença de uma estirpe patogênica

No sexto experimento foram utilizadas amostras de PRP, na presença da estirpe patogênica de leptospira, a L1-130. As plaquetas foram estimuladas por dois agonistas: o colágeno e o ADP.

Antes de iniciar os ensaios propostos para esse experimento, foram feitos testes com diferentes proporções de bactéria:plaqueta sem a utilização de um agonistas. Com isso esperávamos verificar se um tempo maior de incubação das leptospiras com as plaquetas, em diferentes proporções, influenciaria na ativação plaquetária.

Na Figura 27A (canal 1 – azul) temos uma proporção de cinco bactérias para cada plaqueta. As plaquetas permaneceram por 30min em incubação com as leptospiras, em microtubo a 37°C em banho seco, antes de serem transferidas ao agregômetro. Após transferência para o agregômetro, a reação foi registrada por mais 15min, porém a agregação plaquetária não foi observada. Já na Figura 27B (canal 1 – azul) temos uma proporção de uma bactéria para cada plaqueta. Como a agregação não foi observada com um tempo total de 45min, esse tempo foi diminuído aos 15min de registro no agregômetro. Novamente não foi possível observar uma ativação plaquetária provocada pelas leptospiras, agora em uma proporção de 1:1. Por último uma proporção de uma bactéria para cada 10 plaquetas foi testada. Na Figura 27C (canal 1 – azul) podemos observar que as leptospiras também não provocaram ativação plaquetária em um tempo total de 15min. Como não foi observada a ativação plaquetária provocada pelas leptospiras, os experimentos seguintes foram realizados na presença do agonista.

O primeiro agonista a ser utilizado foi o ADP. Na Figura 28A temos o ensaio controle, no qual as plaquetas foram incubadas somente com o agonista, para verificar a viabilidade das células. O ADP foi adicionado após 1min do início da incubação, logo em seguida as plaquetas iniciaram a fase *lag* e atingiram uma agregação máxima de 65%. Na Figura 28B as plaquetas foram incubadas na presença das leptospiras, em uma proporção de cinco bactérias para cada plaqueta. As bactérias foram adicionadas ao agregômetro após 1min do início da incubação e permaneceram em contato com as plaquetas por 5min. Transcorrido esse período e com a ausência da ativação plaquetária, o ADP foi adicionado (6min) e então a

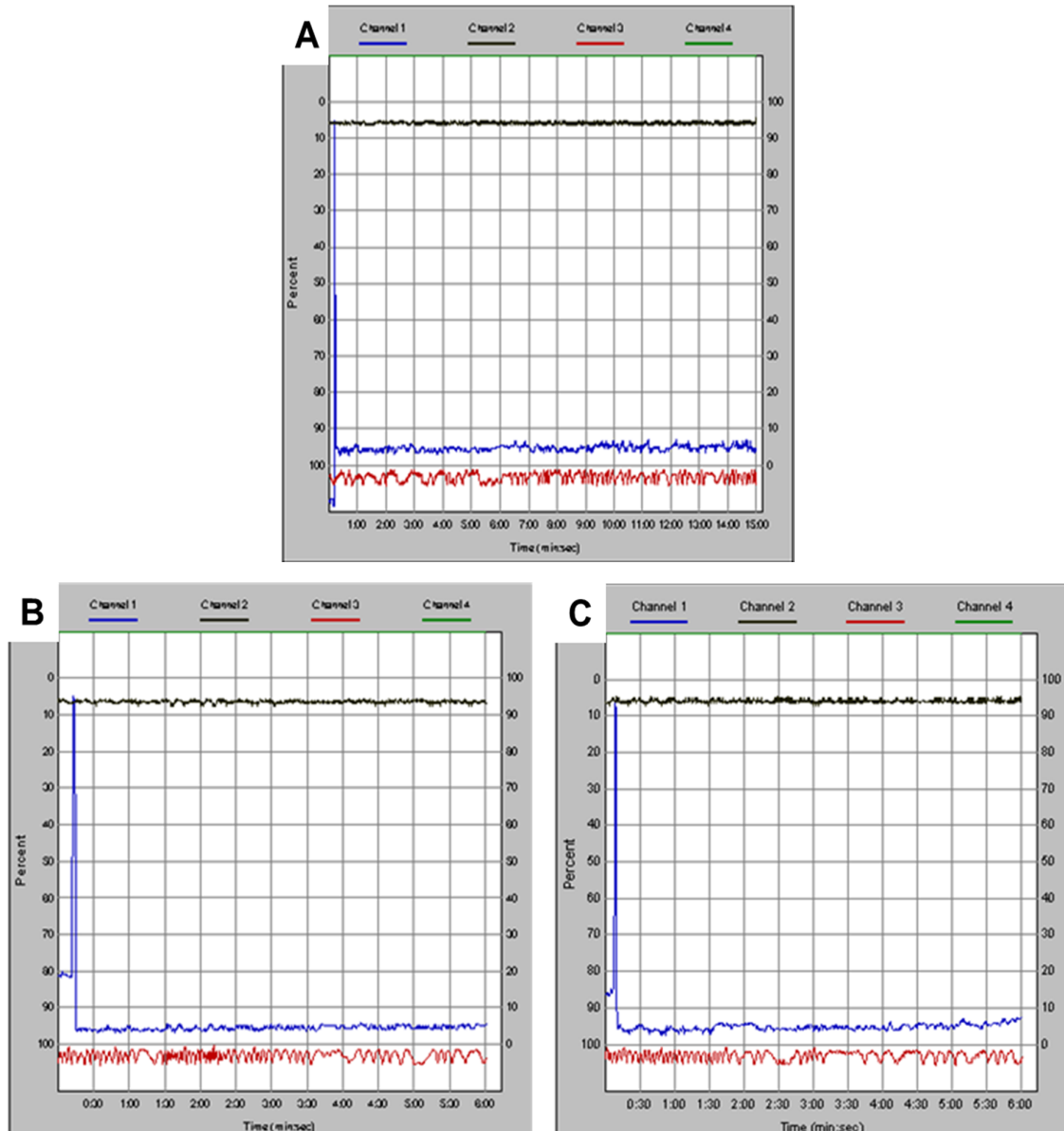
agregação teve início. A agregação atingiu um valor máximo de 45%. A Figura 28C é uma repetição do ensaio descrito anteriormente. No qual a agregação atingiu um valor máximo de 47%. Neste experimento as plaquetas estimuladas por ADP, na presença da estirpe L1-130, apresentaram uma agregação média igual a $46 \pm 1,4\%$, valor inferior ao controle positivo (65%).

O segundo agonista utilizado neste experimento foi o colágeno. Na Figura 29A as bactérias foram adicionadas ao agregômetro após 1min do início da incubação e permaneceram em contato com as plaquetas por 5min. Transcorrido esse período e com a ausência da ativação plaquetária, o colágeno foi adicionado (6min) e então a agregação teve início. A agregação atingiu um valor máximo de 49%. A Figura 29B é uma repetição do ensaio descrito anteriormente. No qual a agregação atingiu um valor máximo de 51%.

As plaquetas, na presença da estirpe L1-130, agregaram em média mais com o colágeno ($50 \pm 1,4\%$), do que quando ativadas por ADP ($46 \pm 1,4\%$), resultado coerente com a potência do agonista.

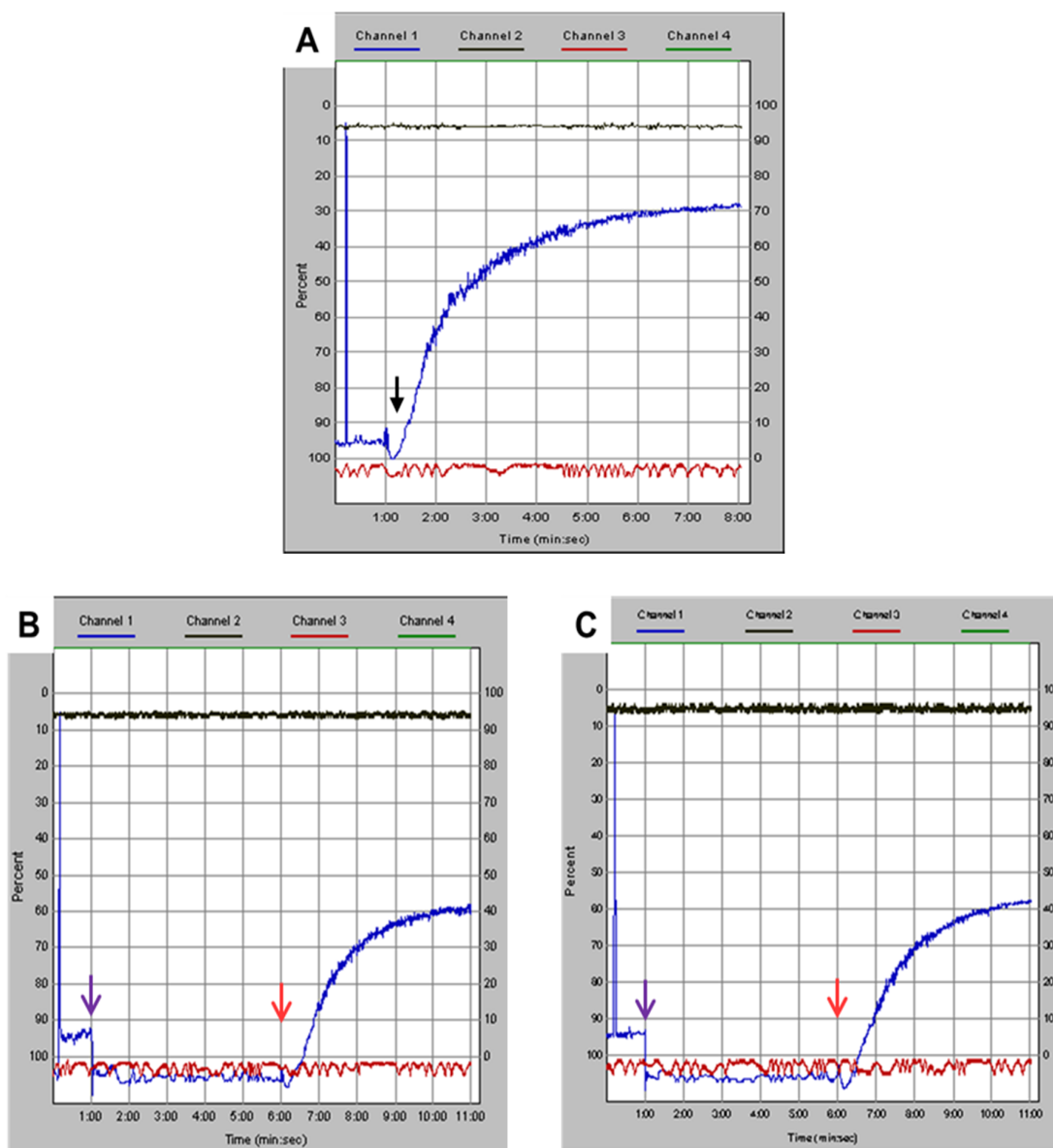
Em resumo, os dados obtidos com este ensaio mostraram que mesmo com um tempo maior de incubação, a leptospira patogênica L1-130 não foi capaz de estimular a agregação plaquetária em amostra de PRP.

Figura 27 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 3), contendo $3,9 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe L1-130. No agregômetro todos os ensaios foram realizados no canal 1 – azul. **(A)** As plaquetas foram incubadas com as leptospiras (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta) em microtubos e permaneceram por 30 min em banho seco a 37 °C. Após esse período de incubação a reação passou a ser registrada no agregômetro por mais 15 min. **(B)** As plaquetas permaneceram em contato com as leptospiras (proporção de uma bactéria para cada plaqueta) por 15 min **(C)** As plaquetas permaneceram em contato com as leptospiras (proporção de uma bactéria para cada dez plaquetas) por 15 min. A agregação não foi observada em nenhuma das condições testadas.



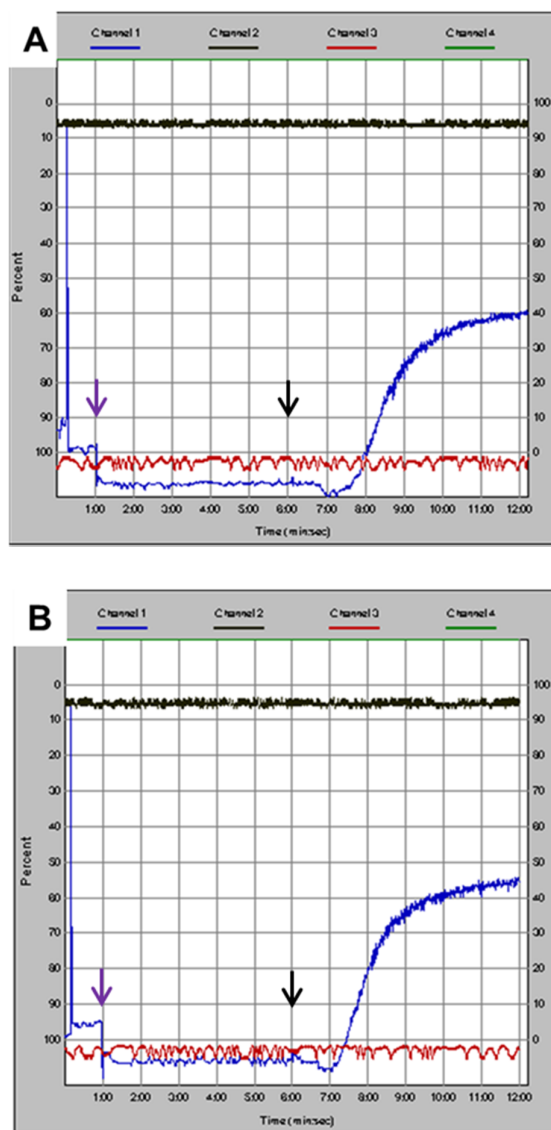
Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Figura 28 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 3), contendo $3,9 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe L1-130 (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta) e ADP ($25 \mu\text{M}$) como agonista. No agregômetro todos os ensaios foram realizados no canal 1 – azul. **(A)** Controle positivo, no qual as plaquetas foram estimuladas com ADP após 1min do início da incubação, atingindo uma agregação máxima de 65%. A seta preta indica a ocorrência da fase *lag*. **(B)** e **(C)** As plaquetas foram incubadas com as bactérias após 1min do início do registro da reação, permanecendo em contato por mais 5min, seguido pela adição do agonista. A agregação máxima obtida foi de 45% e 47% respectivamente. Seta vermelha indica a adição do ADP e a seta roxa indica a adição da estirpe L1-130.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Figura 29 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 3), contendo $3,9 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe L1-130 (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta) e colágeno (12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como agonista. No agregômetro todos os ensaios foram realizados no canal 1 – azul. **(A)** e **(B)** As plaquetas foram incubadas com as bactérias após 1min do início do registro da reação, permanecendo em contato por mais 5min, seguido pela adição do agonista. A agregação máxima atingida foi de 49% e 51% respectivamente. Seta preta indica a adição do colágeno e a seta roxa indica a adição da estirpe L1-130.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

5.2.7 Avaliação da agregação plaquetária em amostras de ST e PRP, estimuladas com colágeno ou ADP, na presença de uma estirpe patogênica ou uma estirpe saprófita de leptospira

No sétimo experimento foram utilizadas amostras de PRP e ST, na presença das estirpes LO4 e Patoc, no qual as plaquetas foram estimuladas com ADP ou colágeno.

Novamente, antes de iniciar os ensaios propostos para esse experimento, foram realizados testes sem a utilização de um agonista, com duas estirpes de leptospira, em uma proporção de 5 bactérias para cada plaqueta. Na Figura 30 (canal 1 – azul) a estirpe LO4 (A) e a estirpe Patoc (B) permaneceram por 30min em incubação com as plaquetas, em microtubo a 37 °C em banho seco, antes de serem transferidas ao agregômetro. Após a transferência, a reação foi registrada por mais 15min, porém para ambas estirpes não foi observada ativação plaquetária.

Nos ensaios controles as plaquetas foram incubadas somente com o agonista (ADP ou colágeno), para verificar sua viabilidade. Na Figura 31A, o ADP foi adicionado após 1min do início da incubação, logo em seguida as plaquetas iniciaram a fase *lag* e atingiram uma agregação máxima de 60%. Na Figura 31B, o controle foi realizado na presença de colágeno que foi adicionado após 1min do início da incubação, porém com o colágeno as plaquetas permaneceram mais tempo na fase *lag*, quando comparado com o controle utilizando ADP, contudo as plaquetas foram ativadas e a agregação máxima obtida foi de 32%.

O primeiro agonista a ser testado em PRP foi o ADP. Na Figura 32 a estirpe LO4 se encontrava em uma proporção de 5 bactérias para cada plaqueta. Na Figura 32A as bactérias foram adicionadas ao agregômetro após 1min do início da incubação e permaneceram em contato com as plaquetas por 5min. Transcorrido esse período e com a ausência da ativação plaquetária, o agonista foi adicionado (6min) e então a agregação teve início. A agregação atingiu um valor máximo de 48%. A Figura 32B é uma repetição do ensaio descrito anteriormente. No qual a agregação atingiu um valor máximo de 45%.

Ainda utilizando o ADP como agonista, a estirpe Patoc foi utilizada no ensaio seguinte. Na Figura 33 as bactérias se encontravam em uma proporção de cinco bactérias para cada plaqueta. Estas foram adicionadas ao agregômetro após 1min do início da incubação e permaneceram em contato com as plaquetas por 5min.

Transcorrido esse período e com a ausência da ativação plaquetária, o agonista foi adicionado (6min) e então a agregação teve início, atingindo um valor máximo de 36%.

O segundo agonista utilizado foi o colágeno. Na Figura 34A as plaquetas presentes na amostra de PRP, permaneceram em contato com a estirpe LO4 por 5min. Transcorrido esse período, o agonista foi adicionado (6min), porém as plaquetas não foram capazes de agregar. O teste foi repetido (Figura 34B), da mesma forma descrita anteriormente, e apesar das plaquetas iniciarem a fase *lag* a agregação obtida apresentou um valor baixo, de 16%.

Em seguida, a agregação plaquetária estimulada por colágeno, ocorreu na presença da estirpe saprófita. Na Figura 35A as bactérias foram adicionadas ao agregômetro após 1min do início da incubação e permaneceram em contato com as plaquetas por 5min. Transcorrido esse período, o colágeno foi adicionado (6min), porém as plaquetas não foram capazes de agregar. O ensaio foi repetido (Figura 35B) com uma concentração um pouco maior de colágeno, porém novamente as plaquetas não foram ativadas.

Em amostra de PRP não foi possível observar uma ação agregadora por parte das estirpes (LO4 e Patoc) utilizadas, na ausência de um agonista. Quando o ADP foi utilizado como agonista, as plaquetas agregaram menos quando a bactéria estava presente, quando comparado ao controle positivo (60%), sendo a agregação na presença da estirpe saprófita (36%) menor que a agregação média da estirpe patogênica ($46,5 \pm 2,1\%$). Quando o colágeno foi o agonista utilizado, as plaquetas na presença das bactérias, não agregaram ou apresentaram um valor menor de agregação quando comparado ao controle positivo. Porém, o controle positivo com colágeno já havia apresentado um valor menor do que o controle positivo com o ADP (32% e 60% respectivamente), indicando que as plaquetas já não estavam respondendo adequadamente ao estímulo do agonista.

Por causa do tempo entre um ensaio e outro, as plaquetas na amostra de PRP já não estavam respondendo adequadamente, por isso os ensaios seguintes foram realizados com amostra de ST. Na Figura 36 os ensaios foram realizados com a estirpe LO4, em uma proporção de uma bactéria para cada plaqueta, estimuladas com ADP. Na Figura 36A as plaquetas foram incubadas na presença das bactérias, que foram adicionadas ao agregômetro após 1min do início da incubação e

permaneceram em contato com as plaquetas por 2min. Transcorrido esse período e com a ausência da ativação plaquetária, o ADP foi adicionado (3min) e então a agregação teve início. A agregação atingiu um valor máximo de 15 Ω . A Figura 36B é uma repetição, no qual a agregação atingiu um valor máximo de 12 Ω .

Já na Figura 37 os ensaios também foram realizados com a estirpe LO4, só que em uma proporção de dez bactérias para cada plaqueta, estimuladas com colágeno. Na Figura 37A as plaquetas foram incubadas na presença das bactérias, que foram adicionadas ao agregômetro após 1min do início da incubação e permaneceram em contato com as plaquetas por 2min. Transcorrido esse período e com a ausência da ativação plaquetária, o colágeno foi adicionado (3min) e então a agregação teve início. A agregação atingiu um valor máximo de 28 Ω . A Figura 37B é uma repetição do ensaio descrito anteriormente. No qual a agregação atingiu um valor máximo de 24 Ω .

Os ensaios realizados em amostra de ST foram coerentes com a potência do agonista utilizado. Entretanto de forma inesperada os resultados obtidos com a amostra de PRP indicam que as plaquetas responderam de forma inadequada ao estímulo com o colágeno, pois a média de agregação obtida com o ADP foi maior que a média de agregação obtida com o colágeno. Porém, mais uma vez foi observado que as leptospiras não são capazes de estimular a agregação plaquetária.

Figura 30 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 4), contendo $5,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença das estirpes LO4 **(A)** ou Patoc **(B)** (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta). As plaquetas foram incubadas com as bactérias em microtubos, permanecendo por 30min em banho seco a 37 °C. Após esse período de incubação a reação passou a ser registrada no agregômetro por mais 15min, porém não foi registrada agregação plaquetária. No agregômetro os ensaios foram realizados no canal 1 – azul.

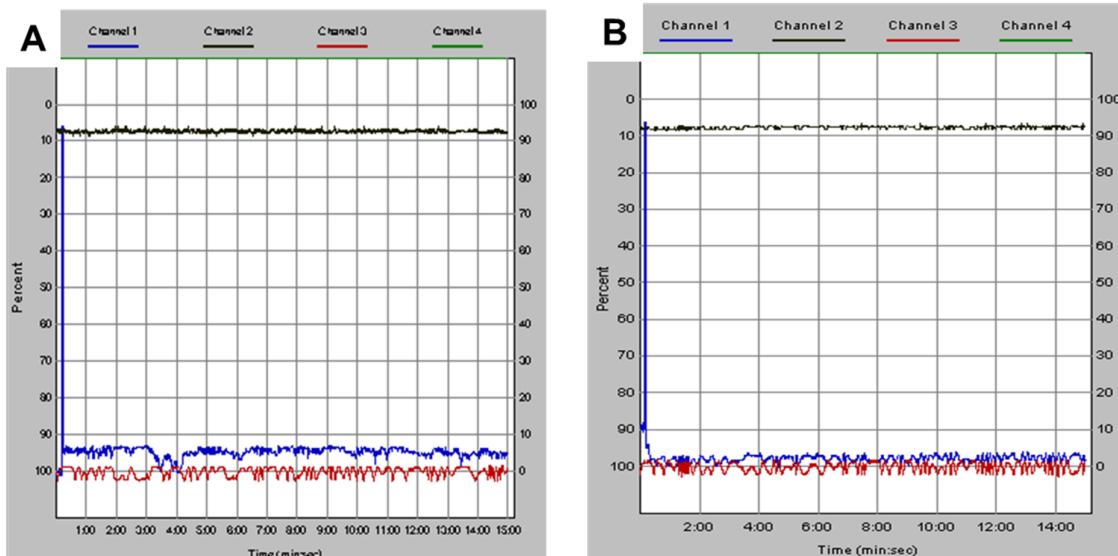
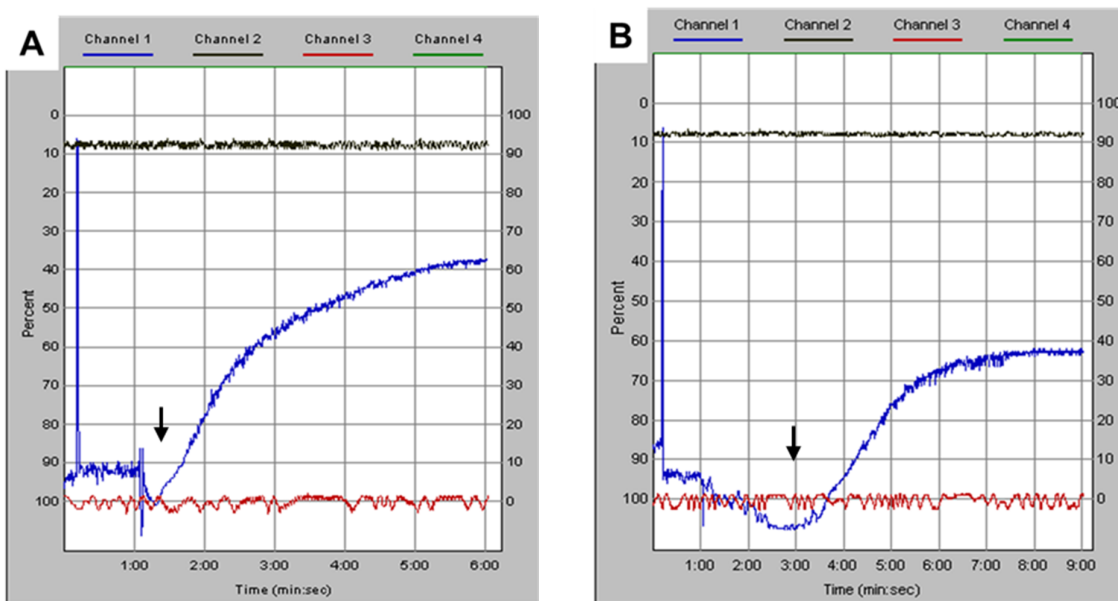


Figura 31 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 4), contendo $5,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença de ADP (25 μ M) **(A)** ou colágeno (12,5 μ g/mL) **(B)**. Ensaios de controle positivo, nos quais as plaquetas foram incubadas com os agonistas após 1min do início da incubação, atingindo uma agregação máxima de 60% e 32% respectivamente. A seta indica a ocorrência da fase *lag*.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Figura 32 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 4), contendo $5,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe LO4 (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta) e ADP ($25 \mu\text{M}$) como agonista. No agregômetro todos os ensaios foram realizados no canal 1 – azul. As plaquetas foram incubadas com as bactérias após 1min do início do registro da reação, permanecendo em contato por mais 5min, seguido pela adição do agonista (seta vermelha). A agregação máxima obtida foi de 48% (A) e 45% (B).

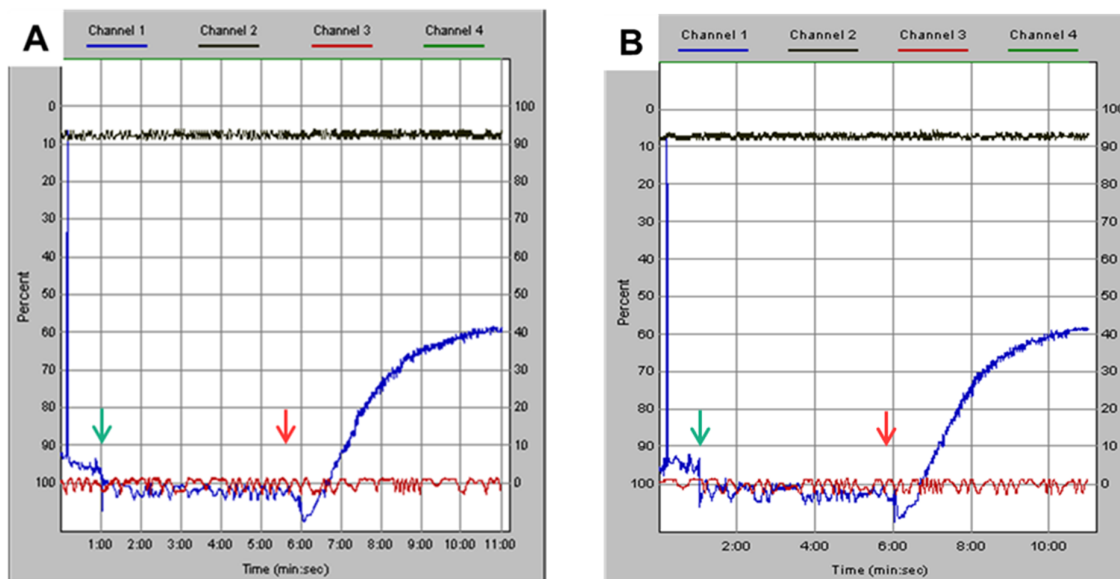
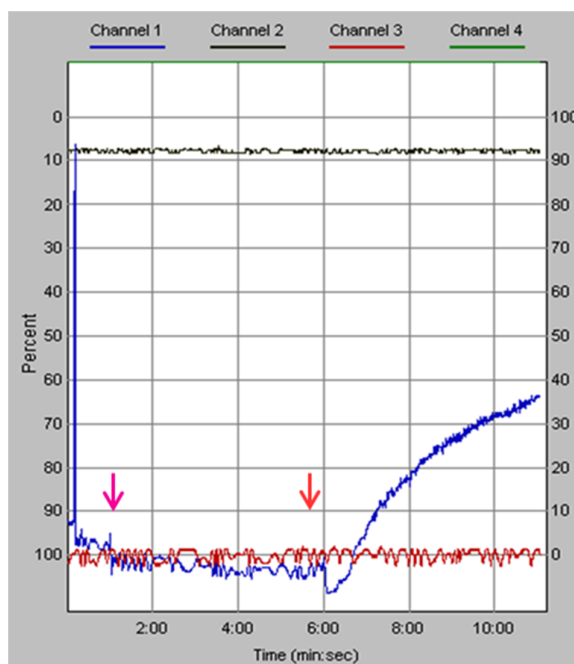


Figura 33 – Curva de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 4), contendo $5,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe Patoc (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta) e ADP ($25 \mu\text{M}$) como agonista. No agregômetro o ensaio foi realizado no canal 1 – azul. As plaquetas foram incubadas com as bactérias após 1min do início do registro da reação, permanecendo em contato por mais 5min, seguido pela adição do agonista. A agregação máxima obtida foi de 36%. Seta vermelha indica a adição do ADP e a seta rosa indica a adição da estirpe Patoc.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Figura 34 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 4), contendo $5,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe LO4 (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta) e colágeno ($12,5 \mu\text{g/mL}$) como agonista. No agregômetro todos os ensaios foram realizados no canal 1 – azul. As plaquetas foram incubadas com as bactérias após 1min do início do registro da reação (seta verde), permanecendo em contato por mais 5min, seguido pela adição do agonista (seta preta). **(A)** Não foi observada agregação plaquetária. **(B)** Agregação plaquetária foi de 16%.

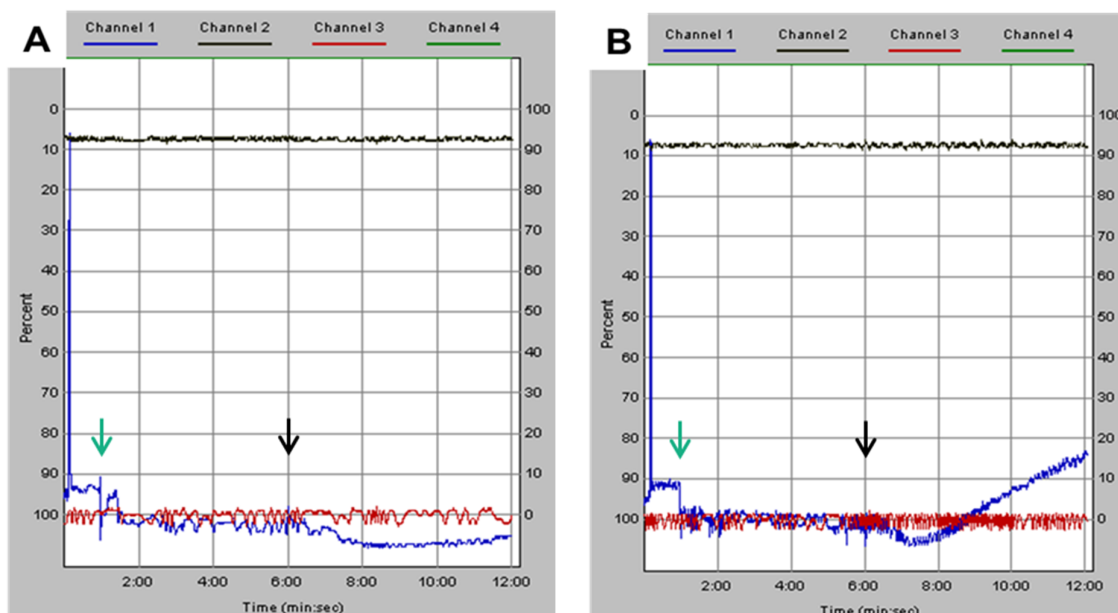
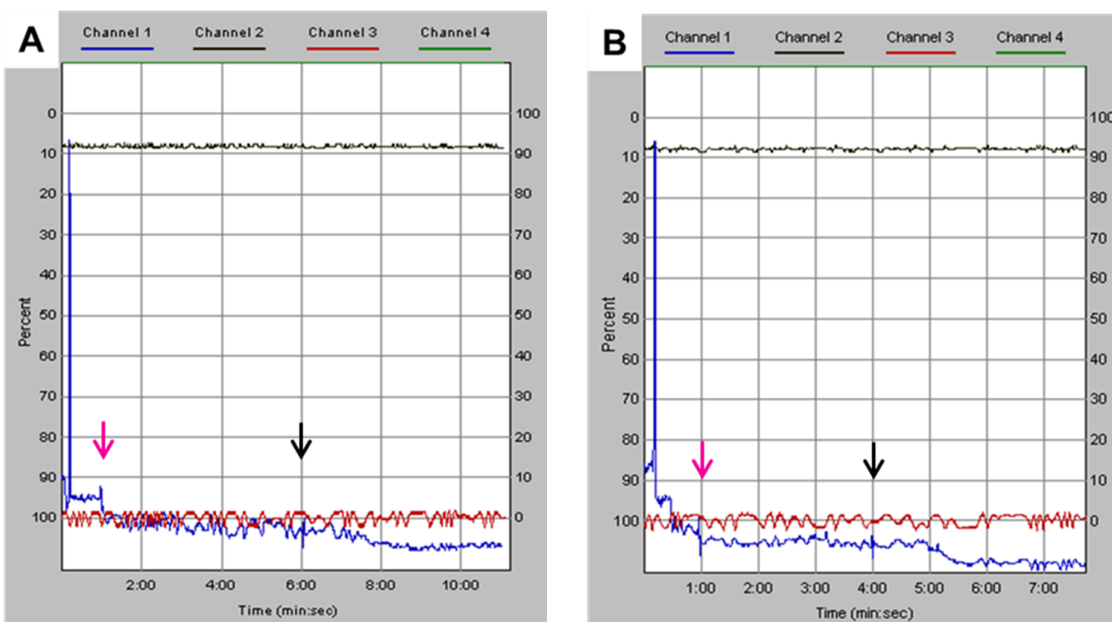


Figura 35 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de PRP (voluntário 4), contendo $5,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe Patoc (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta) e colágeno ($12,5 \mu\text{g/mL}$) como agonista. No agregômetro todos os ensaios foram realizados no canal 1 – azul. As plaquetas foram incubadas com as bactérias após 1min do início do registro da reação (seta rosa), permanecendo em contato por mais 5min, seguido pela adição de $5 \mu\text{g/mL}$ **(A)** ou $6,25 \mu\text{g/mL}$ **(B)** de colágeno (seta preta). Em ambos os ensaios não foi observada agregação plaquetária.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Figura 36 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 4), contendo $5,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe LO4 (proporção de uma bactéria para cada plaqueta) e ADP (25 μM) como agonista. No agregômetro os ensaios foram realizados no canal 4 – verde. As plaquetas foram incubadas com as bactérias após 1min do início do registro da reação, permanecendo em contato por mais 2min, seguido pela adição do agonista. A agregação máxima atingida foi de 15 Ω (A) e 12 Ω (B).

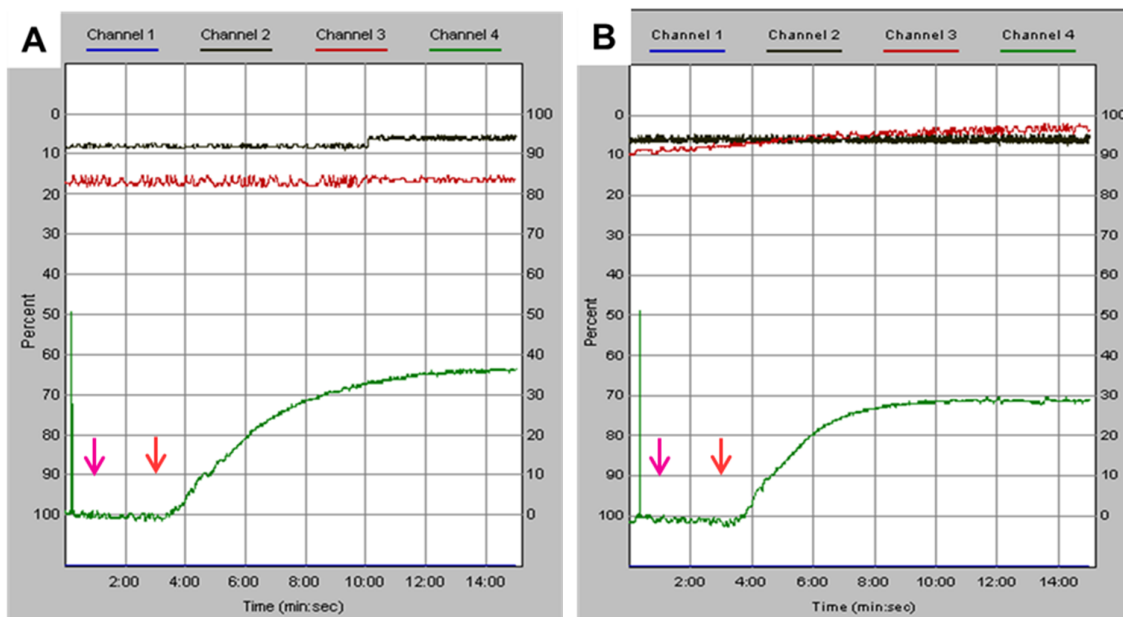
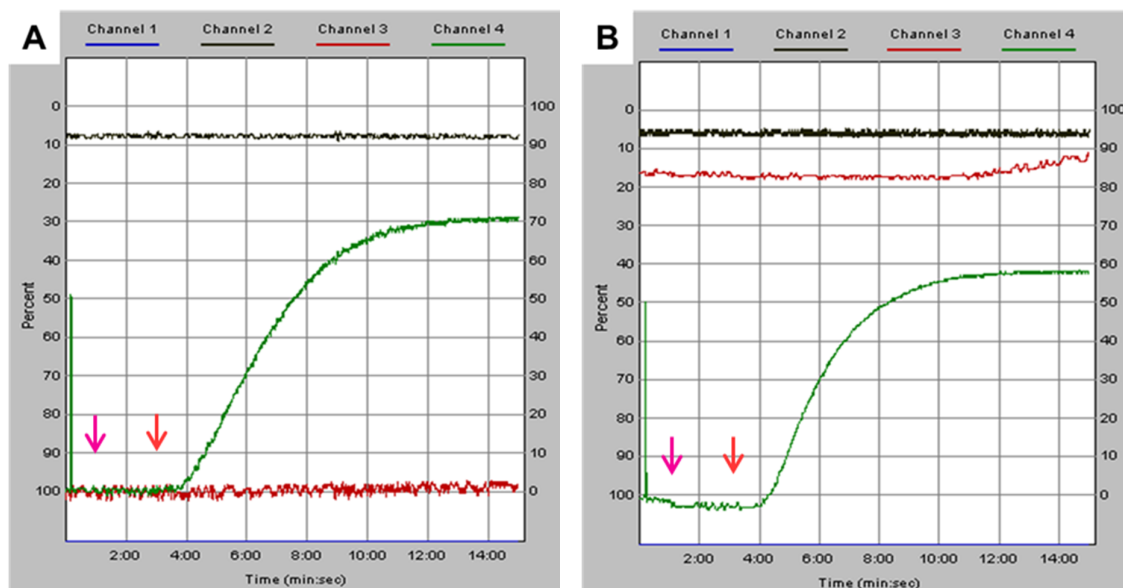


Figura 37 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 4), contendo $5,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe LO4 (proporção de dez bactérias para cada plaqueta) e colágeno (12,5 $\mu\text{g/mL}$) como agonista. No agregômetro os ensaios foram realizados no canal 4 – verde. As plaquetas foram incubadas com as bactérias após 1min do início do registro da reação (seta rosa), permanecendo em contato por mais 2min, seguido pela adição do agonista (seta vermelha). A agregação máxima atingida foi de 28 Ω (A) e 24 Ω (B).



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

5.2.8 Avaliação da agregação plaquetária em amostras de ST, estimuladas com colágeno ou ADP, na presença das estirpes patogênicas de leptospira

No oitavo experimento foram utilizadas amostras de ST na presença das estirpes patogênicas de leptospira (L1-130 e LO4) e de *S. aureus*, no qual as plaquetas foram estimuladas por dois agonistas: o colágeno e o ADP.

Antes de iniciar os ensaios propostos para esse experimento, foram feitos testes sem a utilização de um agonista, para verificar se uma quantidade diferente de leptospira, assim como a utilização de outra estirpe, influenciaria na ativação plaquetária. Na Figura 38 (canal 4 – verde) as duas estirpes patogênicas de leptospira foram testadas, em uma proporção de dez bactérias para cada plaqueta. As plaquetas permaneceram por 30min em incubação com as leptospiras, em microtubo a 37°C em banho seco, antes de serem transferidas ao agregômetro. Após a transferência para o agregômetro, a reação foi registrada por mais 15min, porém a agregação plaquetária não foi observada.

Em seguida, foram realizados os testes com a *S. aureus*, em uma proporção de cinco bactérias para cada plaqueta. A cepa utilizada neste projeto também é capaz de ativar plaquetas em amostra de ST, como pode ser observado na Figura 39, porém a ativação demora mais a acontecer. Na Figura 39A as bactérias foram adicionadas ao agregômetro após 1min do início da incubação, ao final dos 15min as plaquetas estavam iniciando o processo de agregação, por isso o teste foi reiniciado e a continuação dele se encontra na Figura 39B, no qual a agregação atingiu um valor máximo de 10 Ω . Assim como ocorreu nos ensaios com PRP, que necessitou de um tempo maior para que essas bactérias ativassem as plaquetas, com amostra de ST também houve a necessidade de uma incubação prévia. Por isso as plaquetas foram incubadas com as bactérias por 15min, em microtubo a 37°C em banho seco, antes de serem transferidas ao agregômetro. Após a transferência, a reação foi registrada por mais 10min, atingindo uma agregação máxima de 12 Ω (Figura 39C).

Os ensaios seguintes foram realizados com as leptospiras, nos quais a primeira estirpe a ser utilizada foi a L1-130, em uma proporção de dez bactérias para cada plaqueta, utilizando o colágeno como agonista (Figura 40). Na Figura 40A temos o ensaio controle, no qual as plaquetas foram incubadas somente com o agonista. O colágeno foi adicionado após 1min do início da incubação, seguindo

pela ativação plaquetária, que atingiu uma agregação máxima de 21 Ω . Na Figura 40B as plaquetas foram incubadas na presença das leptospiras, no qual as bactérias foram adicionadas ao agregômetro após 1min do início da incubação e permaneceram em contato com as plaquetas por 2min. Transcorrido esse período e com a ausência da ativação plaquetária, o colágeno foi adicionado (3min) e então a agregação teve início. A agregação atingiu um valor máximo de 41 Ω . A Figura 40C é uma repetição do ensaio descrito anteriormente, no qual a agregação atingiu um valor máximo de 34 Ω .

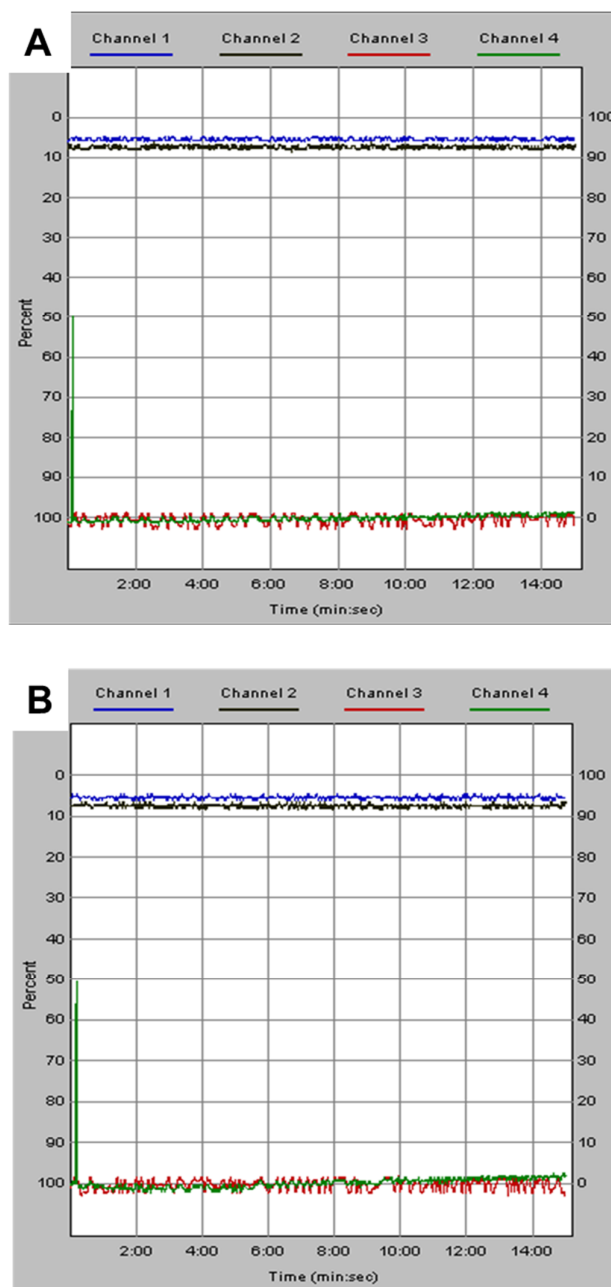
Ainda com a estirpe L1-130, em uma proporção de dez bactérias para cada plaqueta, as plaquetas foram estimuladas com um segundo agonista, o ADP (Figura 41). Na Figura 41A temos o ensaio controle, no qual as plaquetas foram incubadas somente com o agonista. O ADP foi adicionado após 1min do início da incubação, seguindo pela ativação plaquetária, que atingiu uma agregação máxima de 6 Ω . Na Figura 41B as plaquetas foram incubadas na presença das bactérias, que foram adicionadas ao agregômetro após 1min do início da incubação e permaneceram em contato com as plaquetas por 2min. Transcorrido esse período e com a ausência da ativação plaquetária, o ADP foi adicionado (3min) e então a agregação teve início. A agregação atingiu um valor máximo de 17 Ω . A Figura 41C é uma repetição do ensaio descrito anteriormente, no qual a agregação atingiu um valor máximo de 6 Ω .

Na Figura 42 os ensaios foram realizados com a estirpe LO4, na mesma proporção de dez bactérias para cada plaqueta, estimuladas com ADP. Na Figura 42A as plaquetas foram incubadas na presença das bactérias, que foram adicionadas ao agregômetro após 1min do início da incubação e permaneceram em contato com as plaquetas por 2min. Transcorrido esse período e com a ausência da ativação plaquetária, o ADP foi adicionado (3min) e então a agregação teve início. A agregação atingiu um valor máximo de 10 Ω . A Figura 42C é uma repetição do ensaio descrito anteriormente, no qual a agregação atingiu um valor máximo de 5 Ω .

Nos ensaios nos quais as plaquetas foram estimuladas por colágeno, na presença da estirpe L1-130, a agregação foi em média maior que a agregação plaquetária somente na presença do agonista, $37,5 \pm 4,9 \Omega$ e 21 Ω respectivamente. Nos ensaios com amostras de ST, utilizando o ADP como agonista, as plaquetas na presença das bactérias agregaram em média mais que o controle positivo (6 Ω). Sendo que na presença da estirpe L1-130 a agregação média foi maior que a

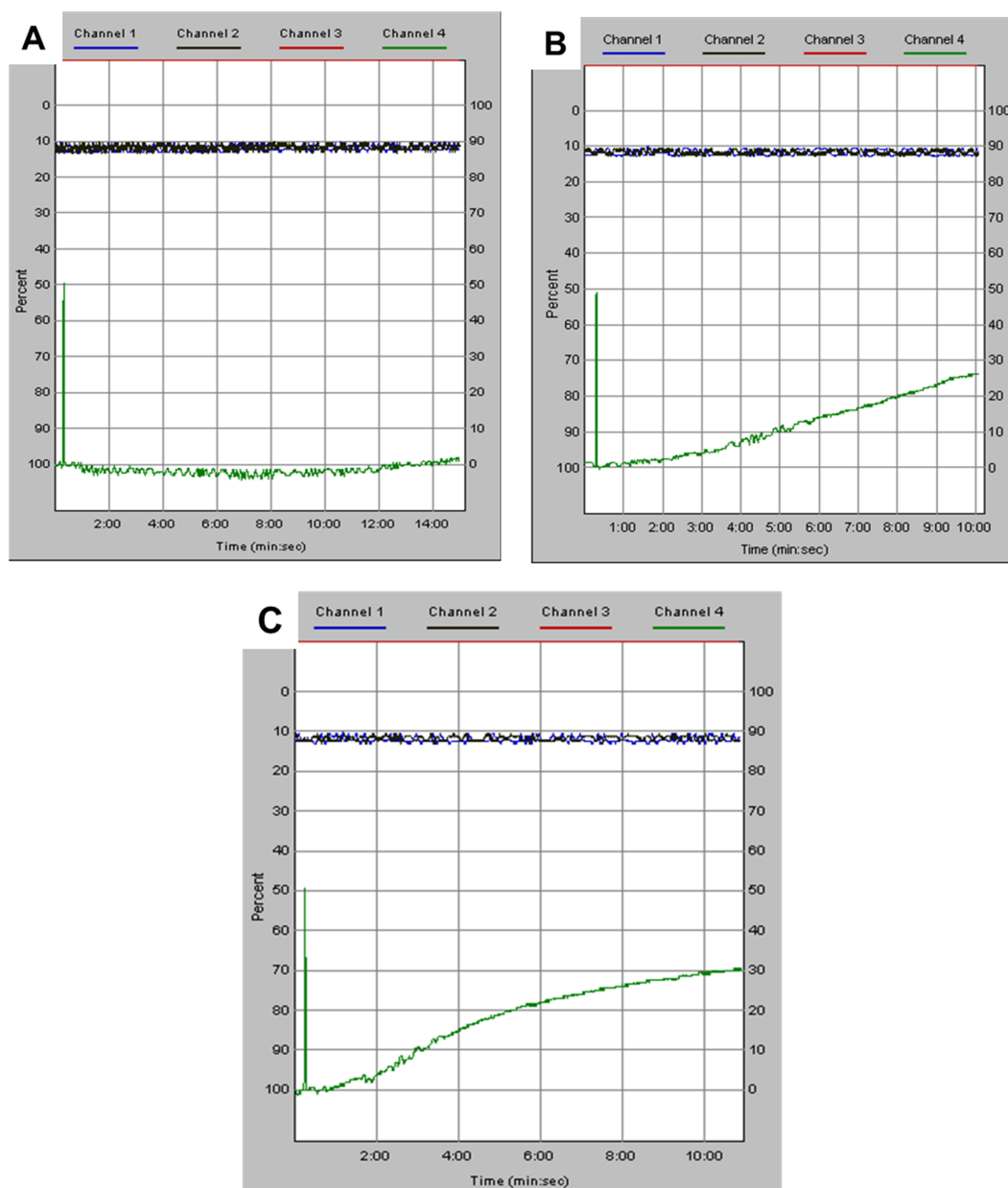
agregação média na presença da estirpe LO4, $11,5 \pm 7,8 \Omega$ e $7,5 \pm 3,5 \Omega$, respectivamente.

Figura 38 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 5), contendo $7,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença das estirpes patogênicas de leptospira (proporção de dez bactérias para cada plaqueta). No agregômetro todos os ensaios foram realizados no canal 4 – verde. As plaquetas foram incubadas com a estirpe L1-130 (**A**) ou com a estirpe LO4 (**B**) em microtubos por 30min em banho seco a 37 °C. Transcorrido esse período a reação passou a ser registrada no agregômetro por mais 15min, porém não foi registrada agregação plaquetária.



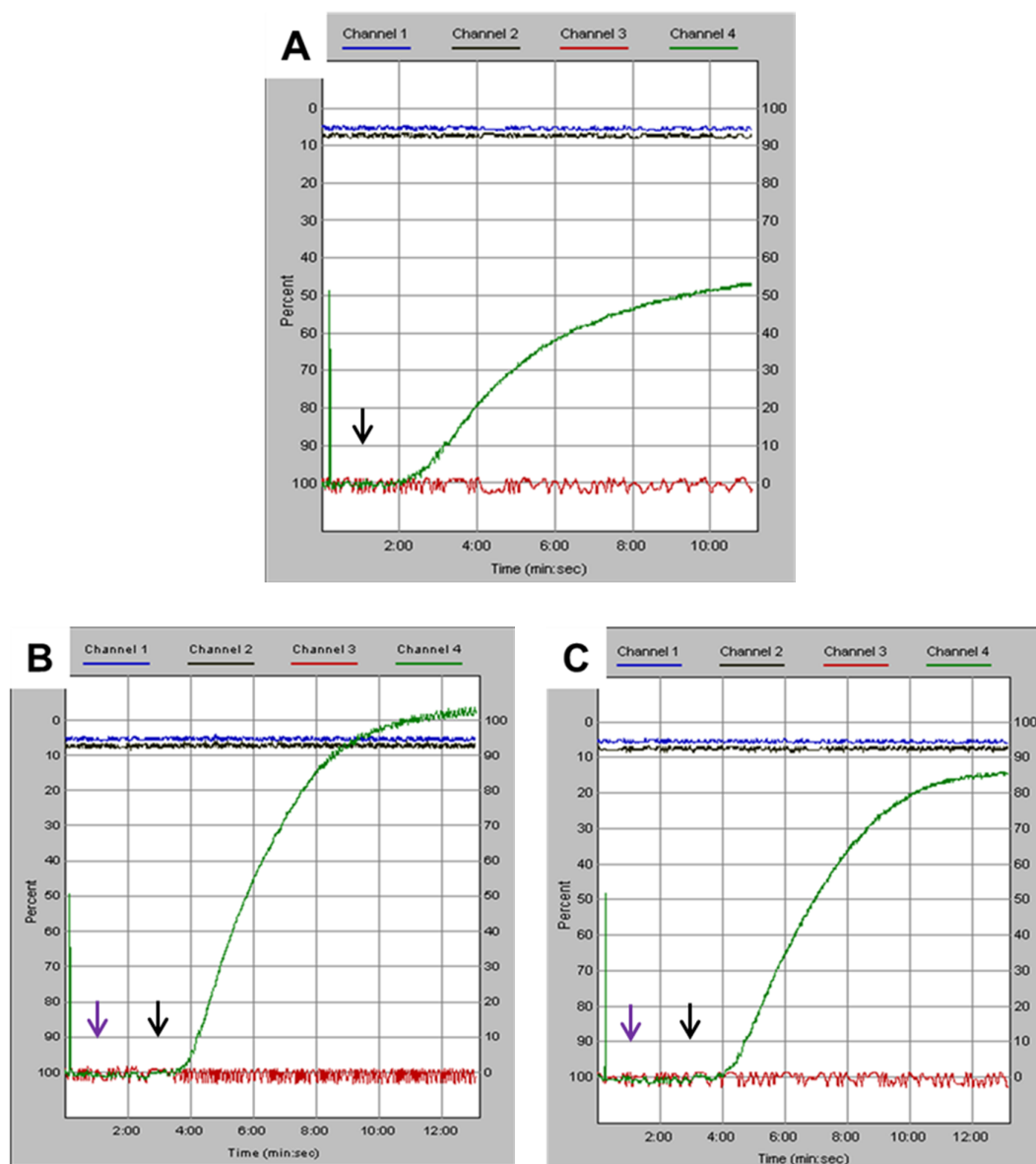
Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Figura 39 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 5), contendo $7,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença de *S. aureus* (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta). No agregômetro todos os ensaios foram realizados no canal 4 – verde. **(A)** As plaquetas foram incubadas com as bactérias após 1min do início do registro da reação. Ao final dos 15min o agregômetro encerrou o registro da reação. **(B)** O registro do ensaio anterior foi reiniciado e a agregação máxima atingida foi igual a 10 Ω . **(C)** As plaquetas foram incubadas com as bactérias em microtubo, permanecendo em incubação por 15min em banho seco a 37 °C. Após esse período de incubação a reação passou a ser registrada no agregômetro por mais 10min. A agregação máxima atingida foi igual a 12 Ω .



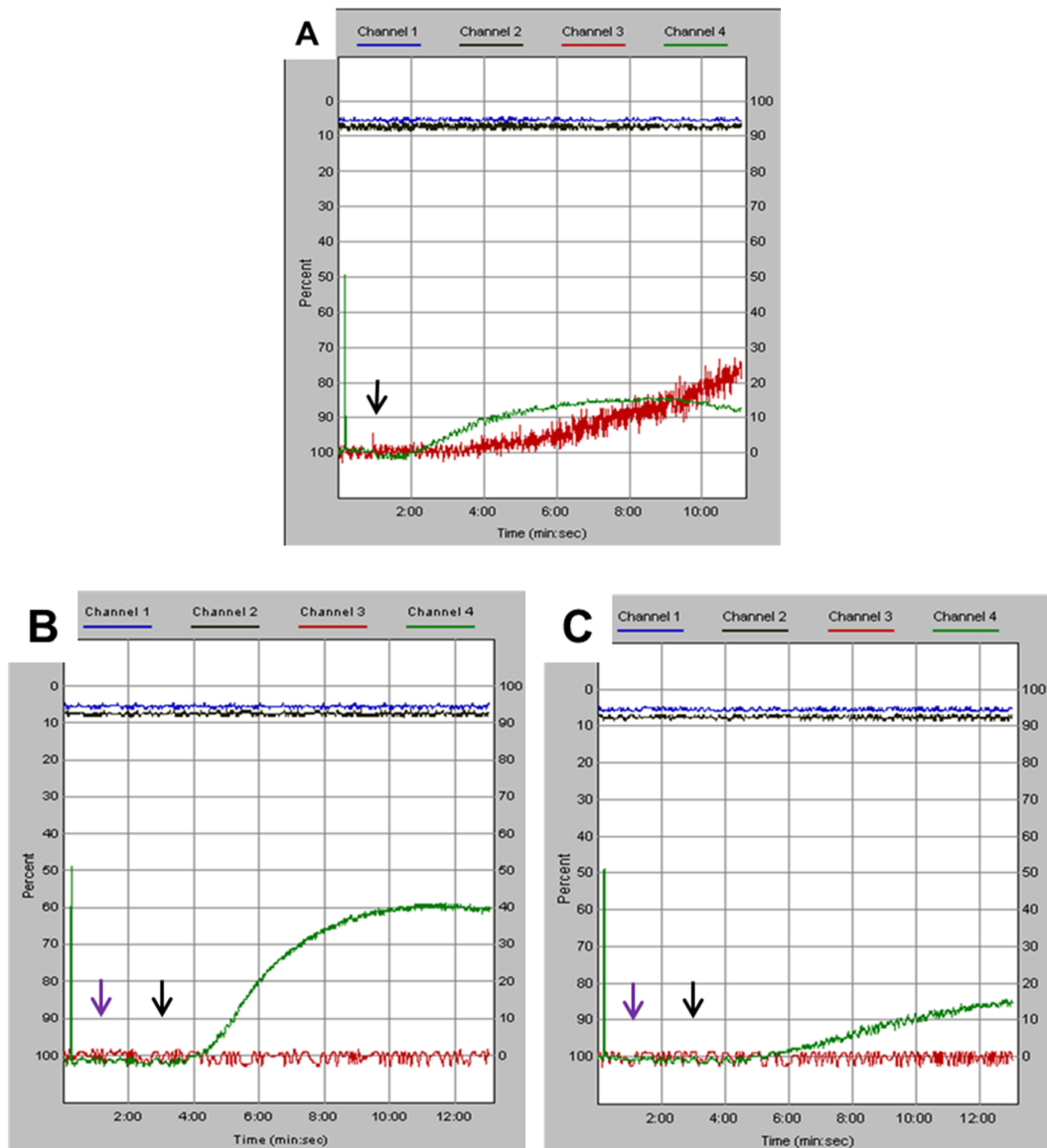
Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Figura 40 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 5), contendo $7,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe L1-130 (proporção de dez bactérias para cada plaqueta) e colágeno (12,5 $\mu\text{g/mL}$) como agonista. No agregômetro todos os ensaios foram realizados no canal 4 – verde. **(A)** Controle positivo, no qual as plaquetas foram estimuladas com colágeno após 1min do início da incubação, atingindo uma agregação máxima de 21 Ω . **(B)** e **(C)** As plaquetas foram incubadas com as bactérias após 1min do início do registro da reação, permanecendo em contato por mais 2min, seguido pela adição do agonista. A agregação máxima atingida foi de 41 Ω e 34 Ω respectivamente. Seta preta indica a adição do colágeno e a seta roxa indica a adição da estirpe L1-130.



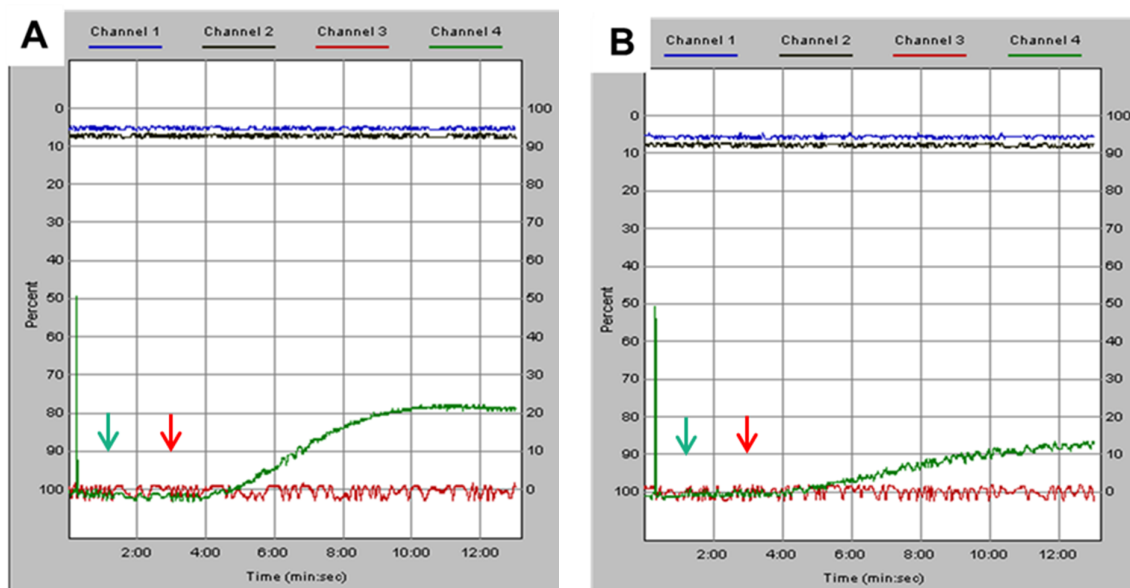
Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Figura 41 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 5), contendo $7,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe L1-130 (proporção de dez bactérias para cada plaqueta) e ADP ($25 \mu\text{M}$) como agonista. No agregômetro todos os ensaios foram realizados no canal 4 – verde. **(A)** Controle positivo, no qual as plaquetas foram estimuladas com colágeno após 1min do início da incubação, atingindo uma agregação máxima de 6Ω . **(B)** e **(C)** As plaquetas foram incubadas com as bactérias após 1min do início do registro da reação, permanecendo em contato por mais 2min, seguido pela adição do agonista. A agregação máxima atingida foi de 17Ω e 6Ω respectivamente. Seta preta indica a adição do colágeno e a seta roxa indica a adição da estirpe L1-130.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Figura 42 – Curvas de agregação plaquetária obtidas com amostras de ST (voluntário 5), contendo $7,2 \times 10^7$ plaquetas, na presença da estirpe LO4 (proporção de dez bactérias para cada plaqueta) e ADP ($25 \mu\text{M}$) como agonista. No agregômetro todos os ensaios foram realizados no canal 4 – verde. As plaquetas foram incubadas com as bactérias após 1min do início do registro da reação, permanecendo em contato por mais 2min, seguido pela adição do agonista. A agregação máxima atingida foi de 10Ω (A) e 5Ω (B). Seta vermelha indica a adição do ADP e a seta verde indica a adição da estirpe LO4.



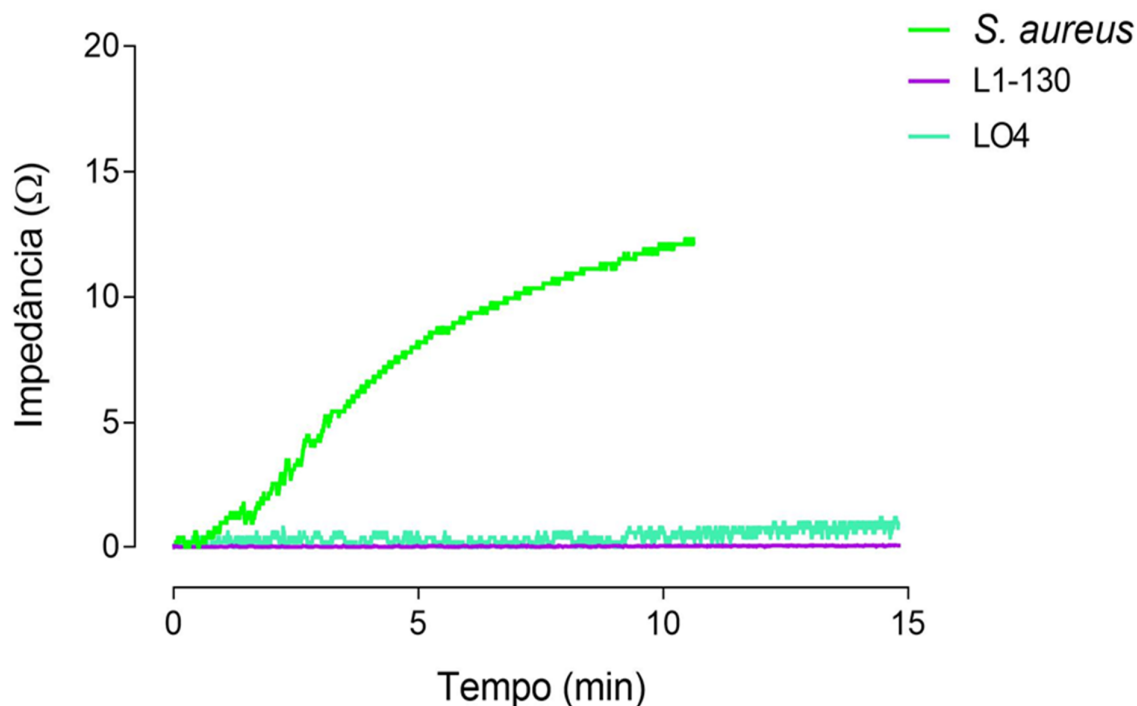
Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

5.2.9 Comparação dos Resultados Obtidos com os Ensaio de Agregação Plaquetária

Primeiramente, as leptospiras foram testadas quanto a sua capacidade de ativar as plaquetas através do método de agregação. Na Figura 43, temos os ensaios realizados em amostras de ST, onde foram testadas duas estirpes patogênicas de leptospiras (L1-130 e LO4) e um controle positivo de agregação induzida pela bactéria *S. aureus*. Sabe-se que algumas estirpes de *S. aureus* são capazes de ativar plaquetas em uma proporção de cinco bactérias para cada plaqueta (BAYER et al., 1995), porém não há esse mesmo tipo de estudo para leptospiras, por isso utilizou-se uma proporção maior de bactérias, a de dez bactérias para cada plaqueta. Pode-se observar que a cepa de *S. aureus* utilizada nestes ensaios, em um tempo total de 25min, é capaz de ativar as plaquetas *in vitro* em amostras de ST, com um valor médio de agregação igual a $11 \pm 1 \Omega$. As

leptospiras também foram testadas em tempos mais longos, de 45min (30min de incubação em microtubo seguido de 15min de registro das atividades no agregômetro), caso também fosse necessário um maior tempo de interação entre bactérias e plaquetas, porém nenhuma agregação foi registrada pelo agregômetro sob as condições testadas neste trabalho.

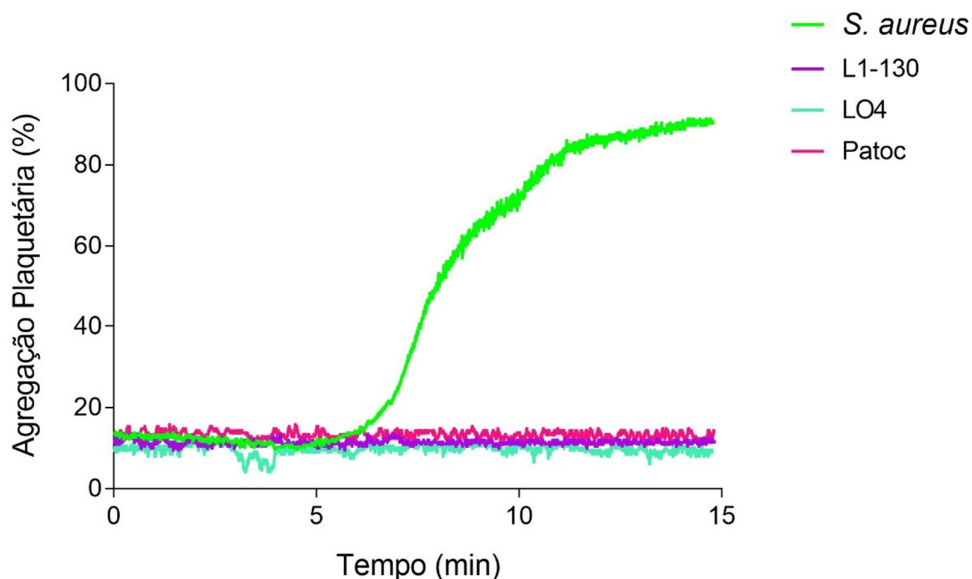
Figura 43 – Curvas representativas da agregação plaquetária, em amostras de ST, induzidas por bactérias, sem a utilização de um agonista. No ensaio no qual foi utilizado cinco bactérias para cada plaqueta, a *S. aureus* induziu a agregação plaquetária, que atingiu um valor máximo de 12 Ω (as bactérias permaneceram em incubação no microtubo por 15min a 37 °C, antes de serem transferidas ao agregômetro, totalizando um tempo de 25min). Nos ensaios nos quais as leptospiras patogênicas foram utilizadas, em uma proporção de dez bactérias para cada plaqueta, não foi detectada a agregação plaquetária (as bactérias permaneceram em incubação no microtubo por 30min a 37 °C, antes de serem transferidas ao agregômetro, onde foram observadas por mais 15min). Dados representativos de ensaios realizados em duplicata.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

A ativação plaquetária induzida por leptospiros também foi testada em amostras de PRP. Nestas amostras, provavelmente, não existem hemácias, e grande parte dos leucócitos são eliminados através dos processos de centrifugação, restando somente a porção plasmática do sangue e as plaquetas. Na Figura 44, pode-se observar os ensaios realizados em PRP, no qual foram testadas as três estirpes de leptospira, sendo duas estirpes patogênicas e uma estirpe saprófita, além do controle positivo com a bactéria *S. aureus*. Diferentemente dos ensaios realizados com amostras de ST, nesses ensaios utilizamos uma proporção de cinco bactérias para cada plaqueta para todas as bactérias utilizadas, para verificar se de alguma forma uma maior quantidade de leptospira não estaria interferindo na ativação plaquetária. Semelhante aos resultados obtidos com ensaios realizados em ST, as estirpes de leptospiros não foram capazes de ativar as plaquetas sob as condições testadas. Já nos ensaios realizados com *S. aureus*, como esperado, foram observados valores máximos de agregação maiores do que aqueles obtidos em amostra de ST, apresentando um valor médio de agregação igual a $74,5 \pm 3,5\%$.

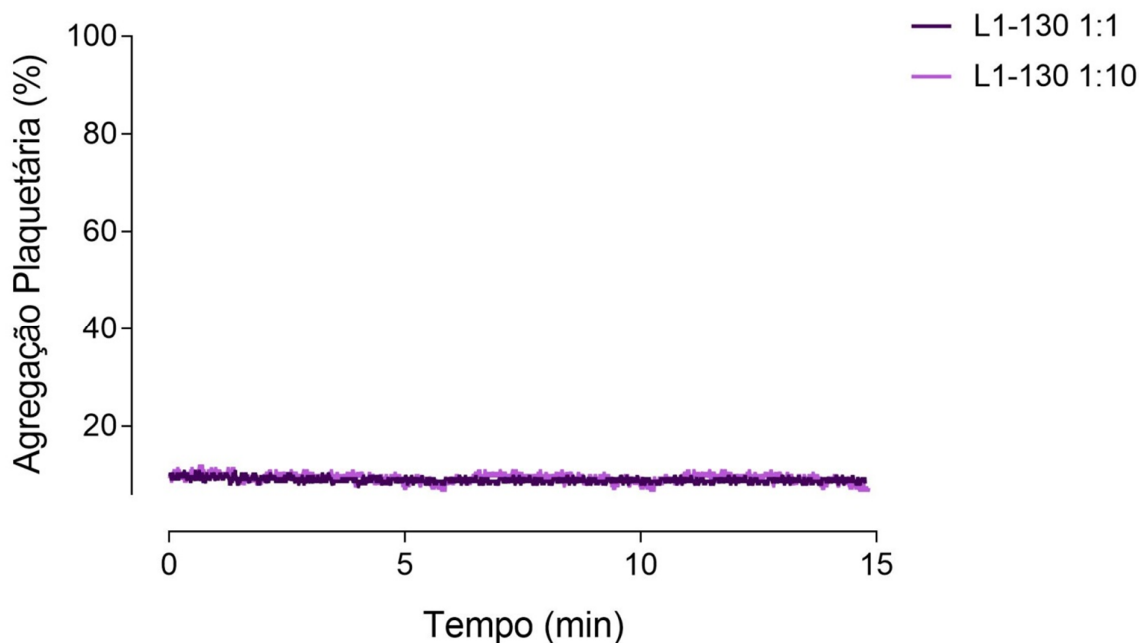
Figura 44 – Curvas representativas da agregação plaquetária, em amostras de PRP, induzidas por bactérias, sem a utilização de um agonista. Os ensaios foram realizados na presença das seguintes bactérias (proporção de cinco bactérias para cada plaqueta): *S. aureus* cuja agregação plaquetária foi igual a 77% (as bactérias permaneceram em incubação no microtubo por 10min a 37 °C, antes de serem transferidas ao agregômetro, totalizando um tempo de 25min); e as estirpes L1-130, LO4 e Patoc cuja agregação não foi detectada (as bactérias permaneceram em incubação no microtubo por 30min, a 37 °C, antes de serem transferidas ao agregômetro, totalizando um tempo de 45min). Dados expressos como porcentagem de agregação plaquetária, representativos dos ensaios realizados em duplicata.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Para verificar se a quantidade de leptospiiras utilizadas não estariam interferindo na ativação plaquetária, outras duas proporções foram testadas com a estirpe L1-130, a de uma bactéria para cada plaqueta e de uma bactéria para cada dez plaquetas. Conforme pode ser observado na Figura 45, a proporção de leptospiiras em relação à quantidade de plaquetas não altera a ausência da ativação plaquetária em um tempo total de 45min.

Figura 45 – Representação dos ensaios de agregação plaquetária em amostra de PRP na presença da estirpe patogênica (L1-130), nas proporções de 1:1 e 1:10 (bactéria:plaqueta). As plaquetas juntamente com as leptospiiras permaneceram em incubação em microtubo por 30min a 37 °C, antes de serem transferidas ao agregômetro, no qual a reação foi observada por mais 15min. A agregação não foi detectada sob as condições testadas. Dados expressos como porcentagem de agregação plaquetária, representativos de ensaios únicos.



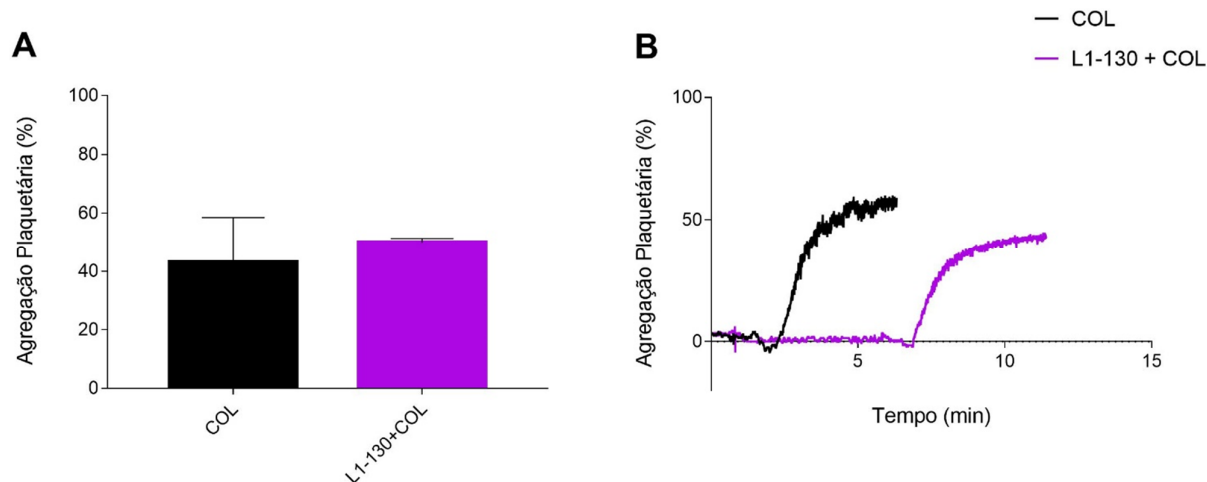
Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

A partir destes ensaios, não foi possível observar o estímulo da agregação plaquetária pelas estirpes de leptospiiras utilizadas, nem sob as condições de tempo e proporções estabelecidas neste trabalho. Mesmo assim, a técnica para obtenção das plaquetas foi validada, uma vez que houve ativação plaquetária quando as plaquetas foram estimuladas por outra bactéria, a *S. aureus*.

Descartada a possibilidade das leptospiras em ativar plaquetas, verificou-se a influência da presença da bactéria na agregação, quando estimuladas por um agonista.

Na Figura 46 estão representados os ensaios realizados com amostras de PRP na presença da estirpe L1-130 em uma proporção de cinco bactérias para cada plaqueta. Pode-se observar que as amostras estimuladas somente com colágeno apresentaram uma agregação média de $43 \pm 15,5\%$, enquanto que as plaquetas ativadas com colágeno na presença da L1-130 apresentaram uma agregação média um pouco maior que a agregação do controle positivo, atingindo $50 \pm 1,4\%$. Na análise estatística, verificou-se que essa diferença entre a agregação na presença da estirpe patogênica e o controle positivo não é significativa ($p = 0,640$).

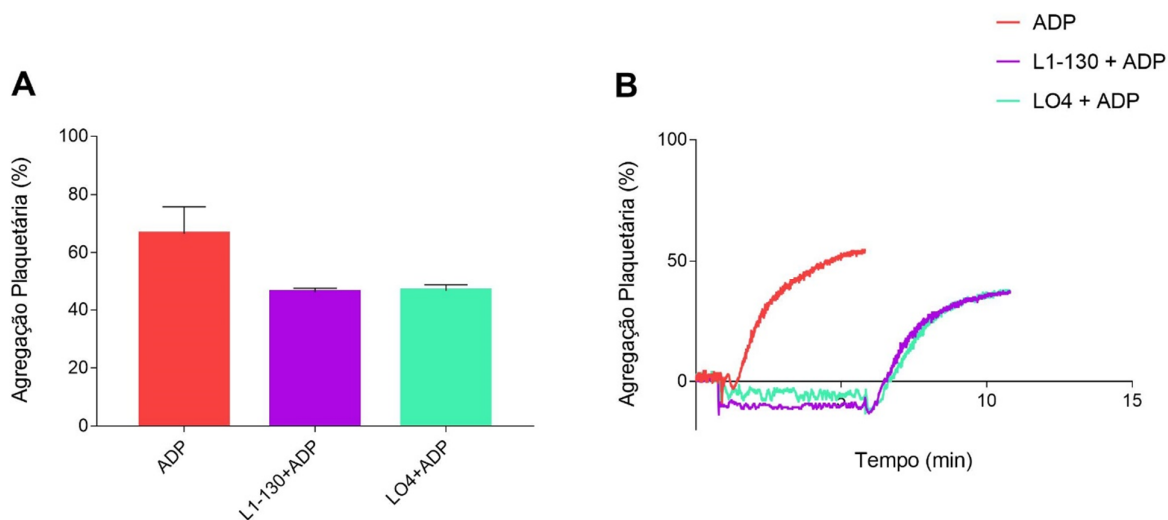
Figura 46 – Comparação entre a agregação plaquetária em amostras de PRP na presença da estirpe patogênica L1-130 (proporção de cinco leptospiras para cada plaqueta) induzida por colágeno (12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). **(A)** Média da intensidade de agregação plaquetária quando estimuladas por colágeno na presença ou não de leptospiras. Resultados expressos como média \pm DP (número de ensaios = 2). **(B)** Curvas representativas de agregação plaquetária induzida por colágeno. Nos testes realizados na presença de L1-130, estas foram adicionadas com 1min de reação, após 5min de observação e ausência da agregação o colágeno foi adicionado, finalizando os testes com um tempo total de 12min.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Ainda em amostra de PRP com uma proporção de cinco bactérias para cada plaqueta, as estirpes patogênicas foram testadas na presença de um segundo agonista, o ADP. Pode-se observar na Figura 47 que as amostras do controle positivo apresentaram uma agregação média maior que a agregação na presença das estirpes patogênicas, atingindo uma agregação máxima média de $66,5 \pm 9,1\%$. Já as plaquetas na presença da estirpe L1-130 agregaram em média $46 \pm 1,4\%$. De forma semelhante, a agregação na presença da estirpe LO4 apresentou uma média de $46,5 \pm 2,1\%$. Apesar de aparentemente haver uma diminuição da agregação em amostras de PRP na presença das estirpes patogênicas de leptospiras essa diminuição não é significativa ($p = 0,054$).

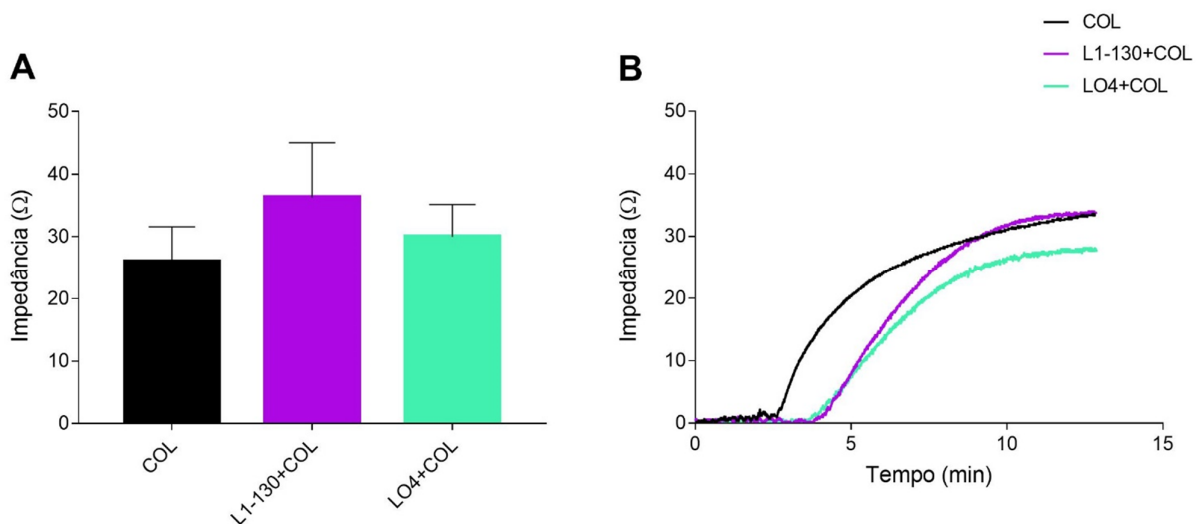
Figura 47 – Comparação entre a agregação plaquetária em amostras de PRP na presença das estirpes patogênicas de leptospira (proporção de cinco leptospiras para cada plaqueta) induzida por ADP ($25 \mu\text{M}$). **(A)** Média da intensidade de agregação plaquetária quando estimuladas por ADP na presença ou não de leptospiras. Resultados expressos como média \pm DP (número de ensaios = 2). **(B)** Curvas representativas da agregação plaquetária induzida por ADP. Nos testes realizados na presença de bactérias, estas foram adicionadas com 1min de reação, após 5min de observação e ausência da agregação o ADP foi adicionado, finalizando os testes com um tempo total de 12min.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Em amostras de ST quando as plaquetas foram estimuladas com colágeno na presença das estirpes patogênicas de leptospiros, em uma proporção de dez bactérias para cada plaqueta (Figura 48), pode-se observar que com a estirpe L1-130 a agregação plaquetária apresentou a maior média de agregação ($36,25 \pm 8,7 \Omega$), seguindo pela agregação na presença da estirpe LO4 ($30 \pm 5,1 \Omega$) e pelo controle positivo ($26 \pm 5,6 \Omega$). Contudo essas diferenças não são significativas ($p = 0,149$).

Figura 48 – Comparação entre a agregação plaquetária em amostras de ST na presença ou ausência das leptospiros patogênicas (proporção de dez leptospiros para cada plaqueta) induzida por colágeno ($12,5 \mu\text{g/mL}$). **(A)** Média da intensidade de agregação plaquetária quando estimuladas por colágeno na presença ou não de bactérias. Resultados expressos como média \pm DP (número de ensaios = 4). **(B)** Curvas representativas de agregação plaquetária induzida por colágeno. Nos testes realizados na presença de bactérias, estas foram adicionadas com 1min de reação, após 2min de observação e ausência da agregação o colágeno foi adicionado (tempo total 12min).

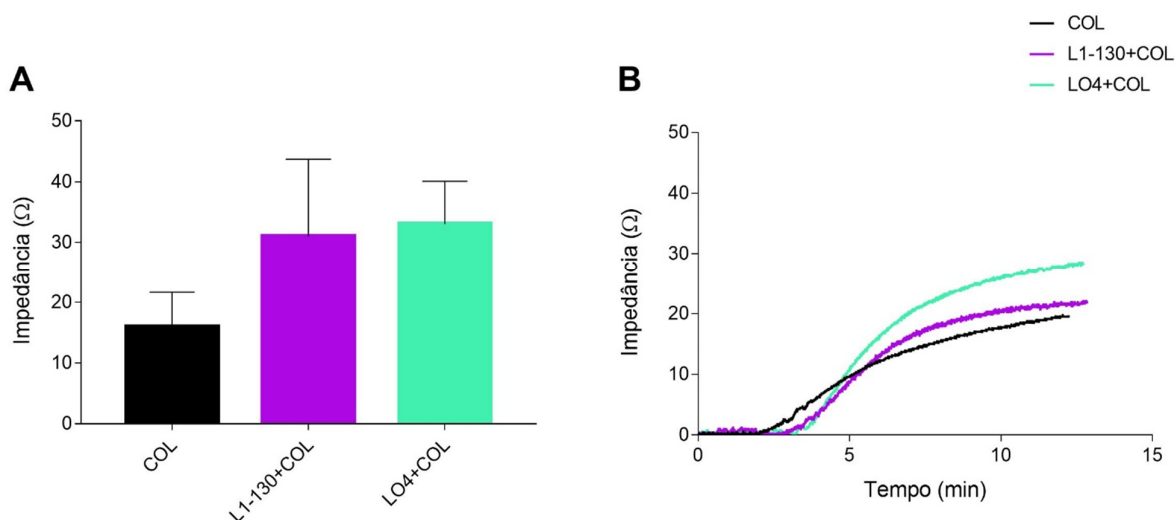


Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Ainda em amostra de ST, as estirpes patogênicas de leptospiros foram testadas quanto a sua capacidade de alterar a agregação plaquetária quando estimuladas com colágeno, agora em uma proporção de uma bactéria para cada plaqueta. Na Figura 49 observa-se que a agregação na presença das leptospiros apresenta valores médios de agregação maiores que os valores obtidos com o controle positivo ($16 \pm 5,66 \Omega$), sendo que na presença da estirpe LO4 essa média foi maior do que na presença da estirpe L1-130, cujos valores médios de agregação foram $33 \pm 7,1 \Omega$ e $31 \pm 12,7\Omega$, respectivamente. Apesar de aparentemente haver um estímulo da agregação na presença das estirpes patogênicas de leptospiros essa diferença não se mostrou significativa ($p = 0,266$).

A estirpe L1-130 foi testada em outras duas proporções, a de 1:5 e 1:20 (bactéria:plaqueta), mas também não houve diferença estatística entre as amostras agregadas na presença das bactérias e o valor médio de agregação dos controles positivos, 25Ω , 20Ω e $23 \pm 8,1 \Omega$, respectivamente (primeiro experimento).

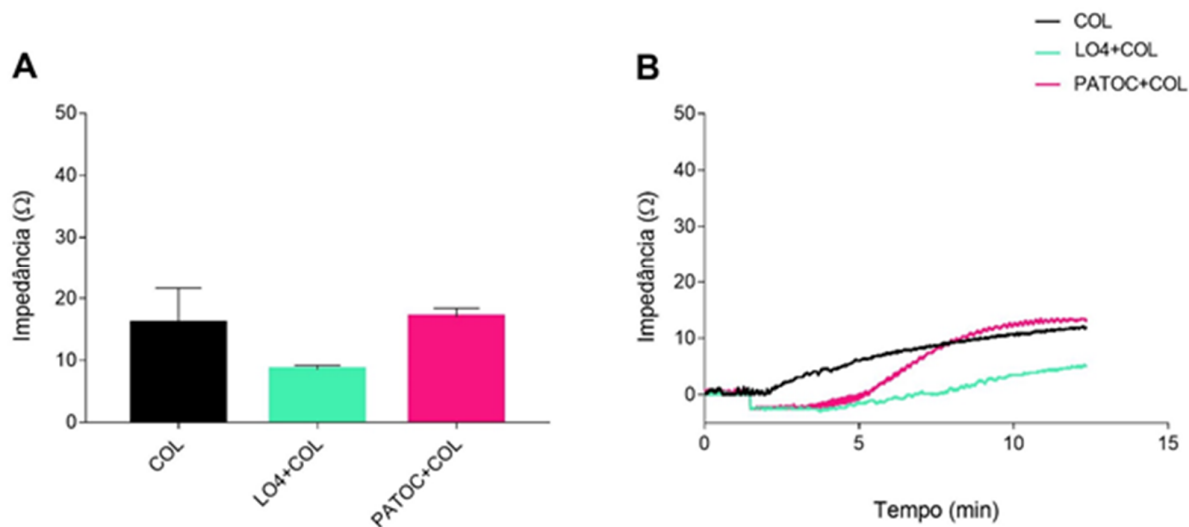
Figura 49 – Comparação entre a agregação plaquetária em amostras de ST na presença das leptospiros patogênicas (proporção de uma leptospira para cada plaqueta) e colágeno ($12,5 \mu\text{g/mL}$) como agonista. **(A)** Média da intensidade de agregação plaquetária quando estimuladas por colágeno na presença ou não de leptospiros. Resultados expressos como média \pm DP (número de ensaios = 2). **(B)** Curvas representativas de agregação plaquetária induzida por colágeno. Nos testes realizados na presença de bactérias, estas foram adicionadas com 1min de reação, após 1min e 30s de observação e ausência da agregação o colágeno foi adicionado. Os testes foram finalizados com 12min.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Ainda utilizando o colágeno para promover a ativação plaquetária em amostra de ST, as estirpes LO4 e Patoc foram testadas em uma proporção de uma bactéria para cada 10 plaquetas. Como observa-se na Figura 50 o valor médio da agregação plaquetária estimulada por colágeno foi semelhante ao valor médio da agregação plaquetária estimulada por colágeno na presença da estirpe saprófita (Patoc), $16 \pm 5,7 \Omega$ e $17 \pm 1,4 \Omega$, respectivamente. O valor médio da agregação plaquetária estimulada por colágeno na presença da estirpe patogênica (LO4) foi menor ($8,5 \pm 0,7 \Omega$). Contudo a análise estatística não apontou diferença significativa quando os grupos foram comparados entre si ($p = 0,153$).

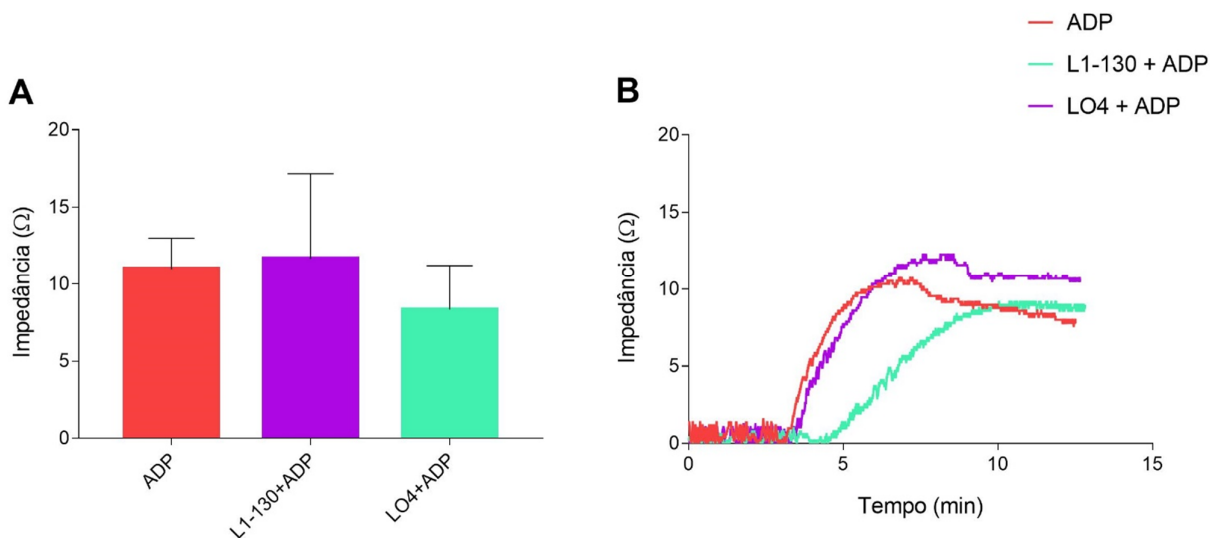
Figura 50 – Comparação entre a agregação plaquetária em amostras de ST na presença da estirpe patogênica (LO4) ou da estirpe saprófita (Patoc) de leptospira (proporção de uma leptospira para cada dez plaquetas) induzida por colágeno ($12,5 \mu\text{g/mL}$). **(A)** Média da intensidade de agregação plaquetária quando estimuladas por colágeno na presença ou não de leptospiras. Resultados expressos como média \pm DP (número de ensaios = 2). **(B)** Curvas representativas da agregação plaquetária induzida por colágeno. Nos testes realizados na presença de bactérias, estas permaneceram em contato com as plaquetas por 1min e 30s. Como a agregação não foi observada as plaquetas foram estimuladas com colágeno, promovendo assim a ativação plaquetária. Os testes foram finalizados com 12min.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

As plaquetas, em amostra de ST, foram testadas com um segundo agonista, o ADP. Nesses experimentos as estirpes L1-130 e LO4 foram avaliadas em uma proporção de dez bactérias para cada plaqueta. Na Figura 51 observa-se que os valores médios de agregação na presença da estirpe L1-130 ($11,67 \pm 5,5 \Omega$) foram semelhantes aos valores médios de agregação plaquetária quando estas foram estimuladas por ADP ($11 \pm 2 \Omega$). Enquanto que as plaquetas estimuladas com ADP na presença da estirpe LO4 apresentaram valores médios de agregação menor que os dos grupos anteriores, $8,33 \pm 2,9 \Omega$. Entretanto essa diferença não é significativa ($p = 0,552$).

Figura 51 – Comparação entre a agregação plaquetária em amostras de ST na presença das estirpes patogênicas de leptospira (proporção de dez leptospiras para cada plaqueta) induzida por ADP ($25 \mu\text{M}$). **(A)** Média da intensidade de agregação plaquetária quando estimuladas por ADP na presença ou não de leptospiras. Resultados expressos como média \pm DP (número de ensaios = 3). **(B)** Curvas representativas da agregação plaquetária induzida por ADP. Nos testes realizados na presença de bactérias, estas permaneceram em contato com as plaquetas por 1min e 30s, com ausência da agregação o ADP foi adicionado promovendo assim a ativação plaquetária. Os testes foram finalizados após um tempo total de 12min.

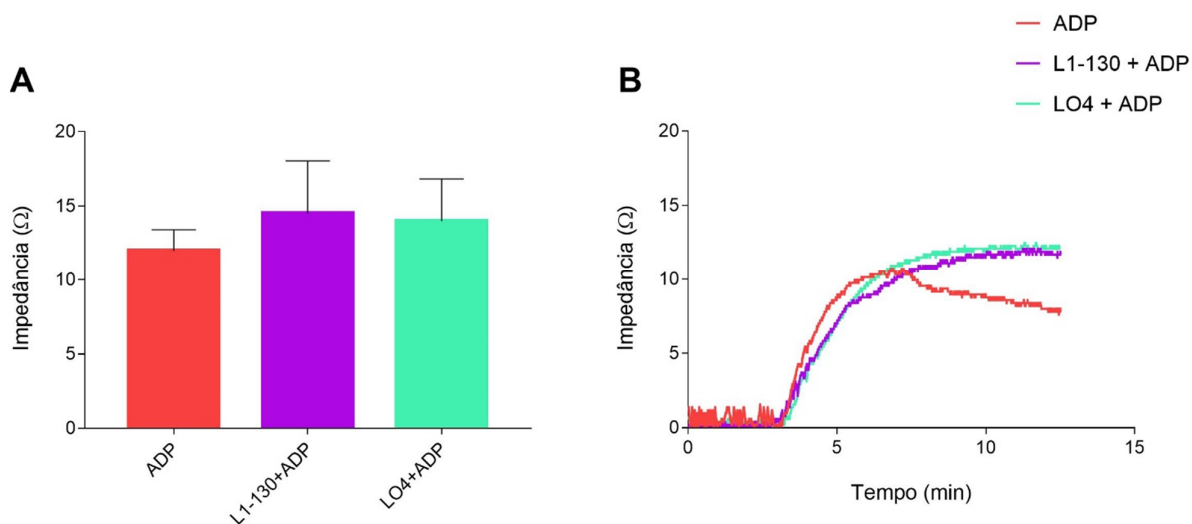


Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Novamente as estirpes patogênicas de leptospiras foram avaliadas quanto a sua capacidade de interferir na agregação plaquetária em amostras de ST ativadas por ADP, porém agora em uma proporção de uma bactéria para cada plaqueta.

Na Figura 52 é possível observar que os valores médios de agregação na presença das estirpes patogênicas foram muito semelhantes, sendo que na presença da estirpe L1-130 as plaquetas agregaram em média $14,5 \pm 3,5 \Omega$ e na presença da estirpe LO4 agregaram em média $14 \pm 2,8 \Omega$. Esses valores foram ligeiramente superiores aos valores médios obtidos pela estimulação com ADP ($12 \pm 1,4 \Omega$). Sob essas condições, também não há diferença estatística ($p = 0,661$).

Figura 52 – Comparação entre a agregação plaquetária em amostras de ST na presença das estirpes patogênicas de leptospira (proporção de uma leptospira para cada plaqueta) induzida por ADP ($25 \mu\text{M}$). **(A)** Média da intensidade de agregação plaquetária quando estimuladas por ADP na presença ou não de leptospiras. Resultados expressos como média \pm DP (número de ensaios = 2). **(B)** Curvas representativas da agregação plaquetária induzida por ADP. Nos testes realizados na presença de bactérias, estas permaneceram em contato com as plaquetas por 1min e 30s, com ausência da agregação o ADP foi adicionado promovendo assim a ativação plaquetária. Os testes foram finalizados após um tempo total de 12min.

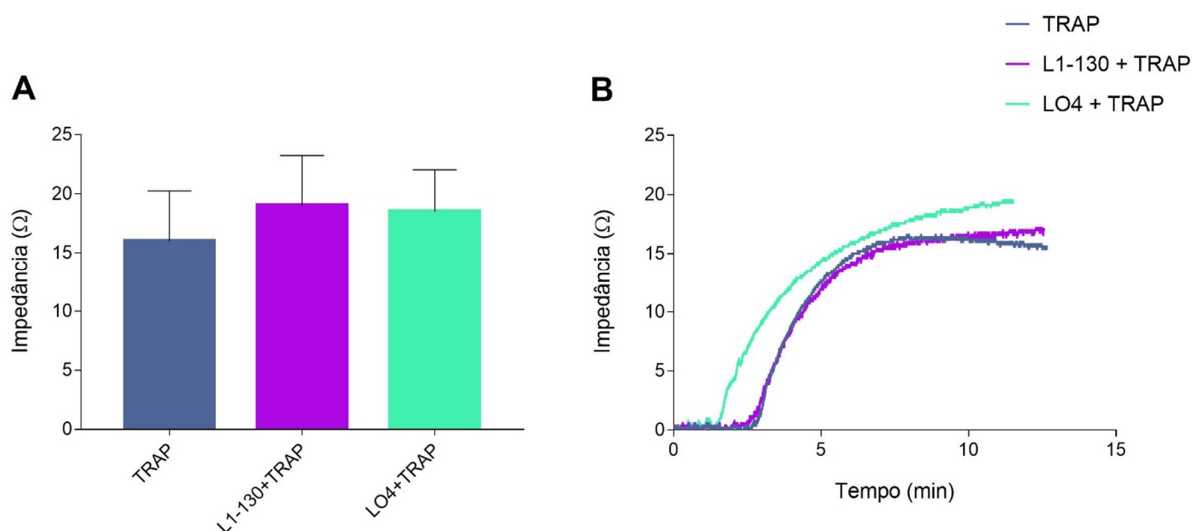


Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Ainda em amostras de ST as plaquetas foram estimuladas por um terceiro agonista, o TRAP, onde as bactérias patogênicas foram testadas em uma proporção de uma bactéria para cada plaqueta.

Na Figura 53 pode-se observar que plaquetas estimuladas com o TRAP na presença das estirpes patogênicas apresentaram um valor médio de agregação ligeiramente superior ao valor médio de agregação estimulada pelo agonista ($16 \pm 4,2 \Omega$), sendo que na presença da estirpe L1-130 a média da agregação foi semelhante à média na presença da estirpe LO4, $19 \pm 4,2 \Omega$ e $18,5 \pm 3,5 \Omega$, respectivamente. Por conseguinte, não foi constatada diferença estatística entre os grupos ($p = 0,748$).

Figura 53 – Comparação entre a agregação plaquetária em amostras de ST na presença das estirpes patogênicas de leptospira (proporção de uma leptospira para cada plaqueta) induzida por TRAP (0,4 mM). **(A)** Média da intensidade de agregação plaquetária quando estimuladas por TRAP na presença ou não de leptospiras. Resultados expressos como média \pm DP (número de ensaios = 2). **(B)** Curvas representativas da agregação plaquetária induzida por TRAP. Nos ensaios realizados na presença de bactérias, estas permaneceram em contato com as plaquetas por 1min e 30s, com ausência da agregação o TRAP foi adicionado promovendo assim a ativação plaquetária. Os testes foram finalizados após um tempo total de 12min.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

As estirpes patogênicas também foram testadas em amostra de ST, utilizando o TRAP como agonista, em uma proporção de dez bactérias para cada plaqueta. Entretanto também não foi verificada diferença significativa entre os valores obtidos na presença das estirpes patogênicas (18Ω) e os valores médios de agregação do grupo controle ($16 \pm 4,1 \Omega$) (terceiro experimento).

Em resumo, as estirpes patogênicas de leptospira foram testadas quanto à sua capacidade de ativação plaquetária em amostras de ST em uma proporção de 10:1 (bactéria:plaqueta), porém não foi possível observar a agregação plaquetária em um tempo total de 45min. Em amostra de PRP as leptospiras também foram testadas quanto a sua capacidade de ativação plaquetária nas seguintes proporções: 1:1 (L1-130), 1:10 (L1-130) e 5:1 (L1-130, LO4 e Patoc) e novamente não foi possível observar a agregação plaquetária em um tempo total de 45min. Aparentemente as leptospiras não possuem influência direta sobre a agregação plaquetária, pelo menos nas condições aqui testadas. Ao contrário dos ensaios realizados com *S. aureus*, que se mostrou capaz de ativar as plaquetas e consequentemente provocar a agregação plaquetária, tanto em amostras de ST, quanto em amostras de PRP, em uma proporção de 5:1.

Como não foi verificada uma ação direta das leptospiras, foi testada se sua presença no ensaio alteraria a agregação provocada por um agonista conhecido. Para isso foram realizados ensaios em amostras de ST, nos quais as plaquetas foram ativadas por três diferentes agonistas: o colágeno, que foi testado nas seguintes proporções de bactéria:plaqueta: 10:1 (L1-130 e LO4), 1:1 (L1-130 e LO4), 1:5 (L1-130), 1:10 (LO4 e Patoc) e 1:20 (L1-130); o ADP, nas seguintes proporções: 10:1 (L1-130 e LO4) e 1:1 (L1-130 e LO4); e o TRAP, na proporção de 10:1 (L1-130 e LO4). Em amostras de PRP as plaquetas foram ativadas por dois agonistas: o colágeno, nas proporções: 5:1 (L1-130, LO4 e Patoc) e 1:10 (LO4 e Patoc); e o ADP, na proporção de 5:1 (L1-130, LO4 e Patoc). A presença das leptospiras nos ensaios nos quais as plaquetas foram ativadas por um dos agonistas testados, também parece não alterar a agregação, pois não houve diferença significativa entre os grupos.

Embora a agregação plaquetária estimulada por leptospiras não tenha sido observada neste estudo, dados da literatura já mostraram que as plaquetas quando interagem com as bactérias podem responder de maneiras diferentes. Se as bactérias se ligam fortemente as plaquetas, essa interação pode ser estimulatória, resultando em ativação plaquetária, secreção dos grânulos e subsequente agregação plaquetária. Por isso, a adesão de plaquetas a bactérias é uma indicação da força da interação, enquanto que a agregação é uma indicação da qualidade da interação. A agregação plaquetária quando provocada pela interação com bactérias é uma resposta tudo ou nada, diferentemente da agregação plaquetária provocada

por um agonista hematológico. Além disso, existe uma concentração ideal de bactérias para que ocorra a agregação plaquetária, abaixo dessa concentração a agregação pode não ocorrer e acima dessa concentração ocorre uma agregação máxima, não havendo resposta intermediária. Ao contrário de outros agonistas hematológicos, existe um intervalo de tempo distinto antes de ocorrer a agregação. O aumento da concentração de células bacterianas pode encurtar a fase *lag* até certo ponto, mas nunca a elimina. Desta forma, algumas bactérias podem apresentar uma fase *lag* muito curta (90 - 120s), enquanto outras podem apresentar uma fase *lag* mais longa (20 min) (KERRIGAN; COX, 2010).

Algumas cepas de *S. aureus* são capazes de aderir às plaquetas, levando a uma ativação e conseqüentemente, à agregação plaquetária. Essa propriedade de adesão de *S. aureus* às plaquetas, pode contribuir para a colonização do epitélio endovascular ou de válvulas cardíacas lesadas, promovendo uma endocardite infecciosa ou infecções endovasculares, resultando na formação de um trombo, quando isso ocorre de maneira localizada. Caso essa interação ocorra de maneira difusa na corrente sanguínea, pode resultar em um consumo exacerbado de plaquetas, levando à trombocitopenia (GAFTER-GVILI et al., 2011).

A diminuição do número de plaquetas é frequentemente documentada nos casos de leptospirose grave. No entanto, os mecanismos responsáveis pela trombocitopenia nesta doença ainda não estão bem estabelecidos bem como sua relação com a coagulação intravascular disseminada (DIC), um dos cursos comuns de trombocitopenia. A DIC é caracterizada pela ativação intravascular sistêmica do sistema de coagulação. Essa ativação da coagulação tem como consequência o esgotamento das plaquetas e dos fatores de coagulação, levando a formação de trombos intravasculares e sangramentos (YANG et al., 2006).

Macedo e colaboradores (1973) após descreverem um estudo de caso, sugerem que a trombocitopenia na leptospirose está relacionada com a DIC, e que essa condição seria decorrente da presença de fatores pró-coagulantes na circulação, proveniente da hemólise excessiva. Higgins e colaboradores (1976) realizaram estudos com cobaias, que apresentaram sinais clínicos associados à DIC, eles atribuem as alterações dos parâmetros de coagulação, como por exemplo, elevados tempo de trombina, protrombina e tromboplastina parcial, assim como a redução do número de plaquetas, à presença da DIC. Outro estudo realizado com cobaias por Da Silva e colaboradores (1995), também observou diminuição do

número de plaquetas, níveis reduzidos de fibrinogênio, aumento no tempo de protrombina e tromboplastina parcial, associados a um quadro clínico compatível com a obstrução da microcirculação, levando os autores a sugerir a hipótese de que a DIC é provavelmente a responsável pelos fenômenos hemorrágicos presentes na leptospirose.

Em contrapartida, Laing e colaboradores (1990) atribuem a diminuição do nível de plaquetas a uma condição que eles identificam como púrpura trombocitopênica trombótica, onde eles descrevem que a depleção aguda de plaquetas está associada à microangiopatia e pequenas alterações dos fatores de coagulação. Turgut e colaboradores (2002), após realizarem estudo com pacientes que apresentavam leptospirose, não atribuem a trombocitopenia à DIC. Eles sugerem que a trombocitopenia na leptospirose pode resultar de vários fatores, como por exemplo, a ingestão das plaquetas pelos macrófagos, a ativação direta das plaquetas por mediadores endógenos da inflamação ou produtos microbianos. Yang e colaboradores (2006) após realizarem um estudo com modelo animal, sugerem que a agregação plaquetária e a fagocitose pelas células de Kupffer podem ser as potenciais causas da trombocitopenia na leptospirose grave e que essa não estaria relacionada com a DIC.

Por esse motivo a interação das leptospirosas com as plaquetas não pode ser totalmente descartada. Outras técnicas para detecção da interação entre bactérias e plaquetas devem ser aplicadas antes de se eliminar completamente a hipótese da interação das leptospirosas com as plaquetas.

5.3 ELISA

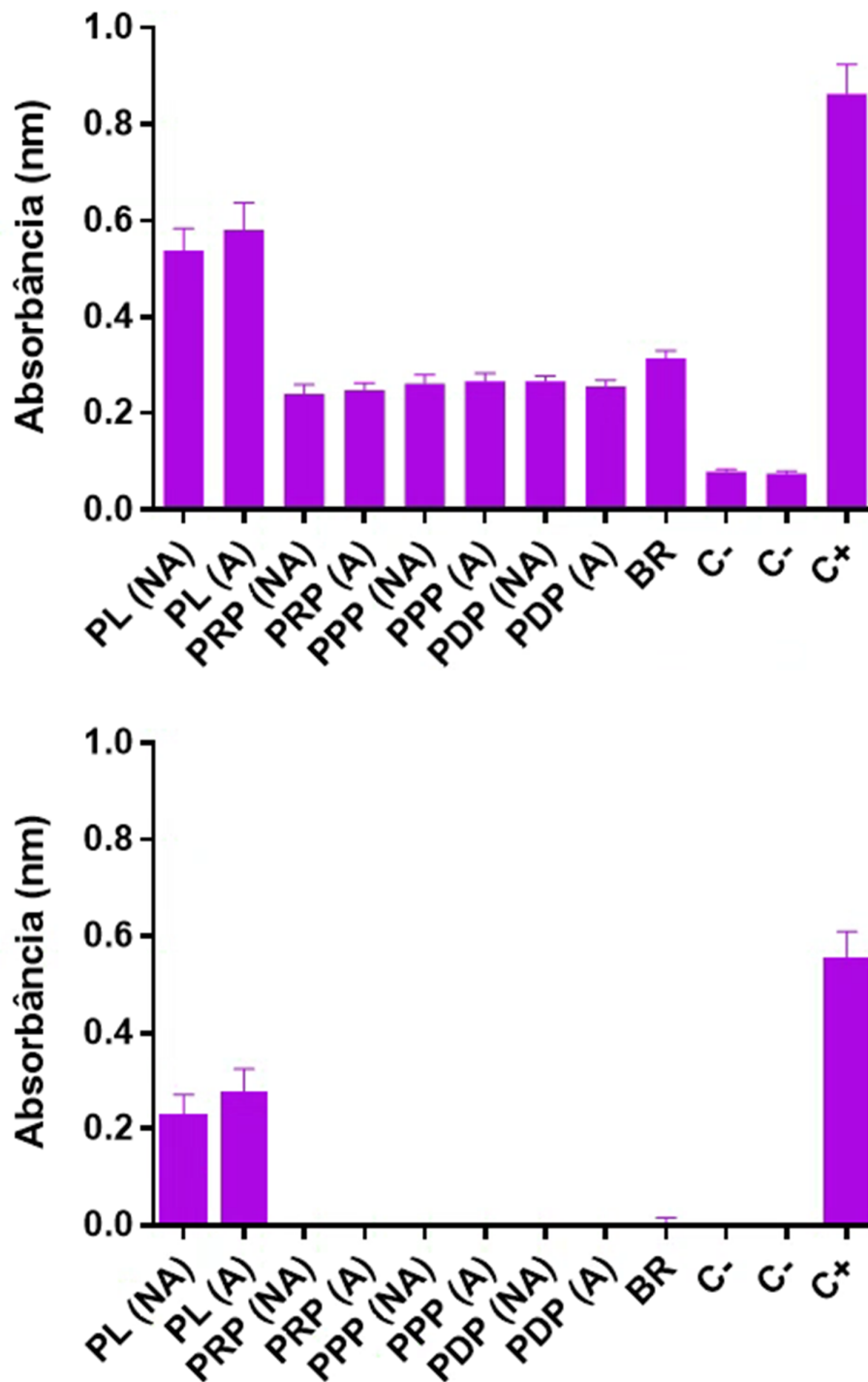
Os ensaios de ELISA foram realizados para averiguar se as leptospirosas se ligam às plaquetas ativadas ou não ativadas com ADP. Para isso as seguintes frações foram utilizadas: PL não ativada (G1), PL ativada (G2), PRP não ativada (G3), PRP ativada (G4), PPP não ativada (G5), PPP ativada (G6), PDP não ativada (G7) e PDP ativada (G8). A ativação dessas frações foi realizada com ADP e as amostras foram incubadas por 30min a 37 °C, com rotação de 200 rpm. Essas frações plaquetárias foram fixadas na placa de ELISA, seguida pela incubação com um lisado total da estirpe L1-130. O anticorpo primário utilizado foi produzido em coelho contra o lisado total de L1-130 (GOTTI, 2015) e a detecção foi feita por um

anticorpo secundário ligado à peroxidase, contra o anticorpo primário de coelho. Para o branco da reação (G9) uma mistura de igual volume das frações plaquetárias (G1-G8) foi fixada na placa de ELISA. No lugar do lisado de L1-130 foi utilizado o PBS e os anticorpos utilizados foram os mesmos descritos anteriormente. Foram empregados como controles negativos, um anticorpo primário pré-imune (G10 e G11), nos quais uma mistura de igual volume das frações plaquetárias foram fixados a placa de ELISA e no lugar dos antígenos foram utilizados PBS (G10) ou o lisado de L1-130 (G11), seguido pela incubação com o anticorpo primário pré-imune e anticorpo secundário anti-coelho ligado à peroxidase. Já como controle positivo do ensaio (G12), o lisado de L1-130 foi fixado na placa e incubado com o anticorpo primário contra L1-130 de coelho e detectado com o anticorpo secundário anti-coelho ligado a peroxidase.

Os lisados totais das diferentes frações plasmáticas (PRP, PPP e PDP) apresentaram valores semelhantes de $OD_{492\text{ nm}}$ no ELISA, independentemente se as frações haviam ou não sido ativadas pelo agonista (Figura 54A - G3-G8). Já a fração de PL apresentou valores mais elevados, quando comparada com as outras frações plasmáticas, sendo os valores obtidos com as PL ativadas maior do que os valores obtidos com as PL não ativadas pelo agonista (G1 e G2), porém sem significância estatística ($p = 0,928$). O branco apresentou valores maiores que aqueles obtidos pelas frações plasmáticas de PRP, PPP e PDP, porém menores que aqueles obtidos com PL. De acordo com o esperado, os controles negativos apresentaram os menores valores e o controle positivo o maior valor obtido neste ensaio. O lisado total da leptospira patogênica L1-130 interage com o lisado da fração plaquetária de PL, pois após descontar a absorbância obtida com o branco (G9), somente o grupo controle (G12) e os grupos da fração de PL apresentam valores significativos ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos com o ELISA mostraram que o lisado total da estirpe patogênica, L1-130, não se liga as diferentes frações de plaquetas humanas (PRP, PPP e PDP), ativadas ou não por ADP. Somente a fração de plaquetas lavadas apresentou uma baixa interação, estatisticamente significativa, com o lisado total de leptospira.

Figura 54 – ELISA realizado com os seguintes grupos: PL (NA) , PL (A), PRP (NA), PRP (A), PPP (NA), PPP (A), PDP (NA) e PDP (A); branco; controles negativos; controle positivo **(A)** Resultados sem descontar o branco. **(B)** Resultados após descontar o valor do branco. Média dos valores obtidos em triplicata \pm DP. Significância estatística quando comparados com os grupos controles: * $p < 0,05$.



Legenda: plaquetas lavadas (PL); plasma rico em plaquetas (PRP); plasma pobre em plaquetas (PPP); plasma depletado em plaquetas (PDP); não ativadas (NA); ativadas (A); branco (BR); controle negativo (C-); controle positivo (C+).

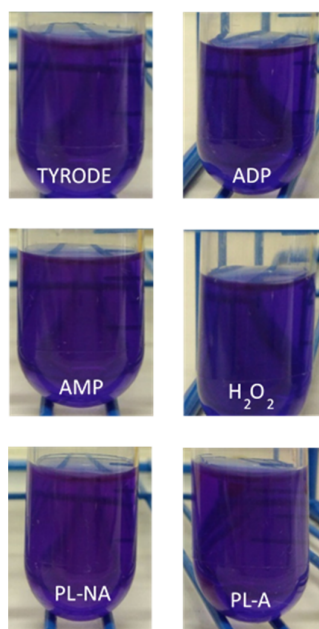
Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

5.4 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ATIVIDADE MICROBICIDA

O objetivo do ensaio de atividade microbica foi verificar se as plaquetas seriam capazes de inibir o crescimento das leptospiras.

O ensaio de atividade microbica foi realizado sob condições estéreis, em fluxo laminar, para evitar a contaminação por outro microrganismo. Como pode-se constatar na Figura 55, não houve contaminação durante o procedimento, pois após adição e incubação com resazurina dos tubos do grupo de controle da esterilidade a coloração azulada ainda pode ser observada, indicando que não houve crescimento celular no meio. Com isso também é possível inferir que os componentes utilizados nos ensaios de atividade microbica (tampão tyrode com Ca, o agonista ADP, o antibiótico ampicilina, a água oxigenada e a fração de PL) não reagiram de forma isolada com a resazurina.

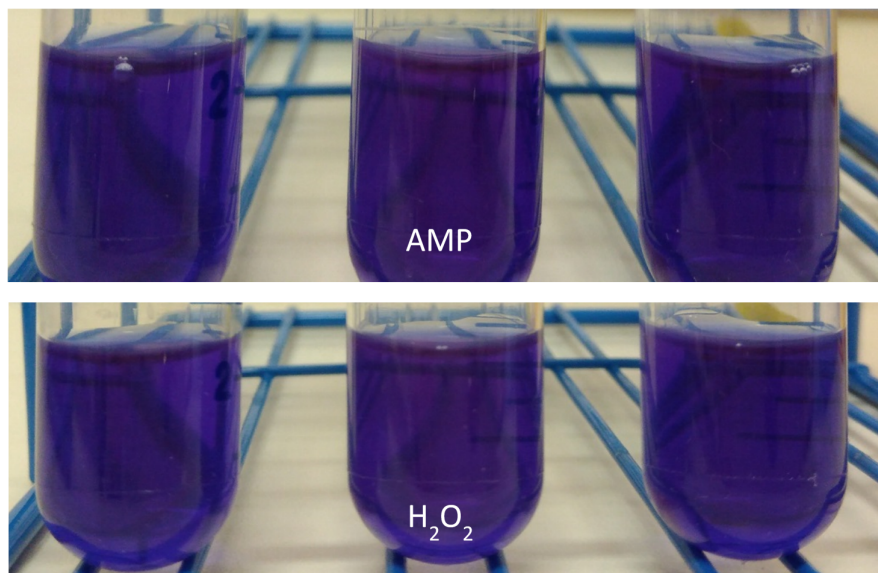
Figura 55 – Ensaio de esterilidade dos componentes utilizados nos ensaios de atividade microbica. Todos os tubos apresentam um volume final de 2.600 μL , sendo que destes, 2.000 μL são de meio de cultura EMJH. A quantidade de tampão Tyrode com Ca varia de acordo com o reagente a ser testado, totalizando um volume de 400 μL . Os reagentes a serem testados foram: (Tyrode) 400 μL de tampão Tyrode com Ca; (ADP) 150 μL de ADP; (AMP) 10 μL de ampicilina; (H_2O_2) 20 μL de água oxigenada; (PL-NA) 200 μL de PL não ativada; (PL-A) 200 μL de PL ativadas com ADP. Os tubos foram incubados por 3 dias a 28 $^\circ\text{C}$ antes da adição de 200 μL de resazurina 0,04% e foram novamente incubados por mais 3 dias a 28 $^\circ\text{C}$. No sexto dia de incubação os tubos foram avaliados quanto à mudança de cor, sendo que a cor azul escura indica ausência de crescimento celular.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Seguindo com o ensaio de controle de morte das leptospiros, duas substâncias sabidamente eficazes na eliminação das leptospiros foram utilizadas: a ampicilina que é utilizada como tratamento da leptospirose e a água oxigenada (H_2O_2). Nota-se na Figura 56, que essas substâncias foram capazes de eliminar as leptospiros presentes nos tubos, pois se os tubos ainda apresentassem bactérias a resazurina teria sido reduzida à resorufina, alterando a cor do meio para pink. Que é o caso da Figura 57, em que as leptospiros foram incubadas em meio EMJH, para o controle de crescimento bacteriano. Nota-se o crescimento pela mudança da cor do meio, de azul para pink.

Figura 56 – Ensaio de controle experimental de morte das leptospiros. Todos os tubos apresentam um volume final de 2.600 μ L, sendo que destes, 2.000 μ L são de meio de cultura EMJH e 200 μ L são da cultura de L1-130 ($\sim 10^7$ células/mL). A quantidade de tampão Tyrode com Ca varia de acordo com o reagente a ser testado, totalizando um volume de 200 μ L. Os reagentes a serem testados foram: (AMP) 10 μ L de ampicilina e (H_2O_2) 20 μ L de água oxigenada. Os tubos foram incubados por 3 dias a 28 °C antes da adição de 200 μ L de resazurina 0,04% e foram novamente incubados por mais 3 dias a 28 °C. No sexto dia de incubação os tubos foram avaliados quanto a mudança de cor, sendo que a cor azul escura indica ausência de crescimento celular.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

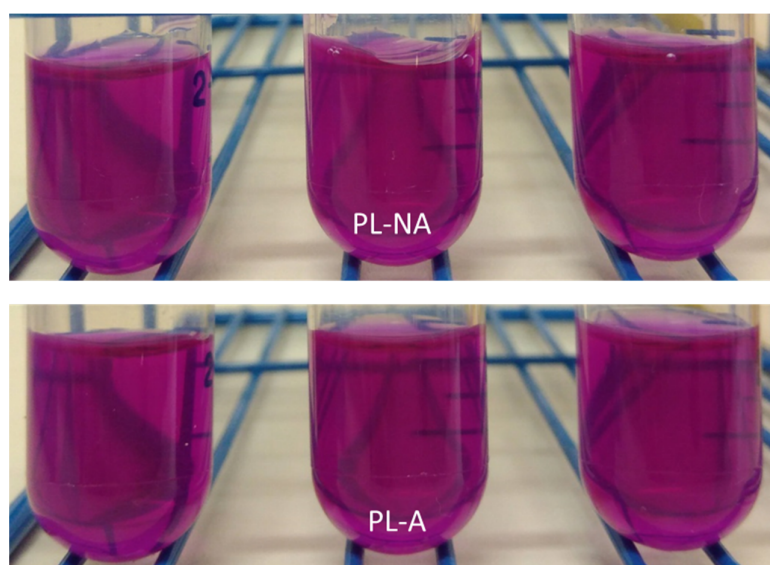
Figura 57 – Ensaio de controle experimental de crescimento das leptospiros. Todos os tubos apresentam um volume final de 2.400 μL , sendo que destes, 2.000 μL são de meio de cultura EMJH acrescido de 200 μL da cultura de L1-130 ($\sim 10^7$ células/mL). Os tubos foram incubados por 3 dias a 28 °C antes da adição de 200 μL de resazurina 0,04% e foram novamente incubados por mais 3 dias a 28 °C. No sexto dia de incubação os tubos foram avaliados quanto a mudança de cor, sendo que a cor pink indica crescimento celular.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

Para o ensaio de atividade microbicida as frações de PL, ativadas ou não por ADP, foram incubadas com as leptospiros. Nota-se na Figura 58, que as plaquetas ou os produtos liberados de seus grânulos não apresentaram ação microbicida sobre as leptospiros, pois essas conseguiram sobreviver e se multiplicar, de forma a modificar a cor do meio após a adição de resazurina (de azul para pink).

Figura 58 – Ensaio experimental da atividade microbicida em amostras de PL contra a estirpe patogênica L1-130. Todos os tubos apresentam um volume final de 2.600 μL , sendo que destes, 2.000 μL são de meio de cultura EMJH, acrescido de 200 μL da cultura de L1-130 ($\sim 10^7$ células/mL) e 200 μL de PL não ativadas (PL-NA) ou de 200 μL de PL ativadas por ADP (PL-A). Os tubos foram incubados por 3 dias a 28 °C antes da adição de 200 μL de resazurina 0,04% e foram novamente incubados por mais 3 dias a 28 °C. No sexto dia de incubação os tubos foram avaliados quanto a mudança de cor, sendo que a cor pink indica crescimento celular.



Fonte: Gonçalves, A. P. (2019).

6 CONCLUSÕES

- ↻ Através da metodologia da impedância em agregômetro, foi possível observar que as estirpes de leptospiros L1-130 e LO4 não foram capazes de promover a agregação plaquetária em amostras de sangue total, em um tempo máximo de 45 minutos de contato celular;
- ↻ Os resultados obtidos com a metodologia da turbidimetria em agregômetro, mostraram que as estirpes patogênicas de leptospiros L1-130 e LO4 e a estirpe saprófita Patoc, não foram capazes de promover a agregação plaquetária em amostras de plasma rico em plaquetas, em um tempo máximo de 45 minutos de contato celular;
- ↻ A agregação plaquetária estimulada por um agonista (colágeno, ADP ou TRAP) na presença das estirpes L1-130, LO4 e Patoc, em amostras de sangue total, plasma rico em plaquetas ou plaquetas lavadas não apresentou diferença significativa entre os grupos avaliados;
- ↻ Os resultados obtidos com o ELISA mostraram que as diferentes frações plaquetárias humanas (PRP, PPP e PDP), ativadas ou não por ADP, não se ligam às leptospiros. Somente a fração de plaquetas lavadas apresentou uma baixa interação, estatisticamente significativa, com as leptospiros;
- ↻ O ensaio de atividade microbicida, tendo como indicador de sobrevivência a resazurina, demonstrou que as plaquetas obtidas com a amostra de plaquetas lavadas não causam a morte da estirpe L1-130.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B. Vaccines against leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 251–272, 2015.
- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 287–296, 2010.
- ALI, R. A. et al. Platelets Mediate Host Defense against *Staphylococcus aureus* through Direct Bactericidal Activity and by Enhancing Macrophage Activities. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 1, p. 344–351, 1 jan. 2017.
- ANTCZAK, A. J. et al. Internalization of IgG-coated targets results in activation and secretion of soluble CD40 ligand and RANTES by human platelets. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 2, p. 210–216, 2011.
- ARMAN, M. et al. Amplification of bacteria-induced platelet activation is triggered by FcγRIIA, integrin αIIbβ3, and platelet factor 4. **Blood**, v. 123, n. 20, p. 3166–3174, 2014.
- ASSINGER, A. Platelets and infection – an emerging role of platelets in viral infection. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 649, 2014.
- ATZINGEN, M. V. et al. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiology**, v. 8, 2008.
- AVRAM, S. et al. Abnormalities of platelet aggregation in chronic myeloproliferative disorders. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 5, n. 1, p. 79–87, 2001
- BANDARA, M. et al. Globalization of leptospirosis through travel and migration. **Globalization and Health**, v. 10, n. 1, p. 61, 12 dez. 2014.
- BARBOSA, A. S. et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6356–6364, 2006.
- BARBOSA, A. S. et al. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 3, p. 1137–1143, 2009.
- BARBOSA, A. S. et al. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 7, p. 3207–3216, 2010.
- BAYER, A. S. et al. *Staphylococcus aureus* Induces Platelet Aggregation via a Fibrinogen-Dependent Mechanism Which Is Independent of Principal Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Fibrinogen-Binding Domains. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 9, p. 3634–3641, Sep, 1995.
- BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 575–771, 2003.
- BORN, G. V. R. Aggregation of Blood Platelets by Adenosine Diphosphate and its Reversal. **Nature**, v. 194, n. 4832, p. 927–929, 9 jun, 1962.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Saúde. **Casos confirmados e óbitos de leptospirose**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.
- CARDINAL, D. C.; FLOWER, R. J. The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behavior in blood. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 3, n. 2, p. 135–158, fev, 1980.

- CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M. et al. Leptospiral Immunoglobulin-like Proteins Interact With Human Complement Regulators Factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 6, p. 995–1004, 2012.
- CHENG, J.; QIN, J.; XIE, G. [Epidemiological observation on effect of Leptospiral outer membrane vaccine]. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v. 22, n. 2, p. 108–110, abr, 2001.
- CHOY, H. A. et al. Physiological Osmotic Induction of *Leptospira interrogans* Adhesion: LigA and LigB Bind Extracellular Matrix Proteins and Fibrinogen. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2441–2450, 2007.
- CINCO, M.; BANFI, E. Activation of complement by leptospires and its bactericidal activity. **Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene**, v. 254, n. 2, p. 261–265, 1983.
- CINCO, M. et al. *Leptospira interrogans* binds to the CR3 receptor on mammalian cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 33, n. 6, p. 299–305, 2002.
- CINCO, M. New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences. **New Microbiologica**, v. 33, p. 283–292, 2010.
- CLAWSON, C. C. Platelet interaction with bacteria. III. Ultrastructure. **The American journal of pathology**, v. 70, n. 3, p. 449–71, 1973.
- CLAWSON, C. C.; WHITE, J. G. Platelet interaction with bacteria. II. Fate of the bacteria. **The American journal of pathology**, v. 65, n. 2, p. 381–397, 1971a.
- CLAWSON, C. C.; WHITE, J. G. Platelet interaction with bacteria. I. Reaction phases and effects of inhibitors. **The American journal of pathology**, v. 65, n. 2, p. 367–380, 1971b.
- COLMAN, R. W. Receptors that activate platelets. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 197, n. 3, p. 242–248, 1991.
- COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 0–1, 2015.
- COX, D.; KERRIGAN, S. W.; WATSON, S. P. Platelets and the innate immune system: Mechanisms of bacterial-induced platelet activation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 9, n. 6, p. 1097–1107, 2011.
- DA SILVA, J. J. et al. The hemorrhagic syndrome of leptospirosis: an experimental study in guinea pigs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, n. 3, p. 169–177, 1995.
- DOLHNIKOFF, M. et al. Leptospiral pneumonias. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, 2007.
- EDWARDS, C. N.; NICHOLSON, G. D.; EVERARD, C. O. R. Thrombocytopenia in leptospirosis. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, v. 4, p. 827–829, 1982.
- ELLIS, W. A. Animal Leptospirosis. In: ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**. Berlin: Springer, 2015. p. 99–137.
- FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. 2ª Ed. Austrália: Medical Science, p. 272, 1999.
- FERNANDES, L. G. et al. *Leptospira* spp.: Novel insights into host–pathogen interactions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 176, p. 50–57, 2016.

- FRAGA, T. R.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion From the Complement System. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, n. 5, p. 408–419, 2011.
- FRAGA, T. R.; ISAAC, L.; BARBOSA, A. S. Complement Evasion by Pathogenic *Leptospira*. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 623, 2016.
- GAFTER-GVILI, A. et al. Thrombocytopenia in *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Risk Factors and Prognostic Importance. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 5, p. 389–396, maio 2011.
- GARCIA-NAVARRO, C. E. K.; PACHALY, J. R. **Manual de Hematologia Veterinária**, 1994.
- GENOVEZ, M. E. et al. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos examinados no instituto Biológico de São Paulo, no período de 1985 a 1992. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 30, n. 2, p. 107-112, 1993.
- GODOI, J. T. A. M. et al. Leptospirose. **DIP: Doenças Infecciosas e Parasitárias**. In: Hinrichsen, S. L. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 254–263.
- GOTTI, T. B. **Desenvolvimento de um teste dipstick para o diagnóstico da leptospirose animal**. 2015. 148. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- HAAKE, D. A. et al. Leptospirosis, Water Sports, and Chemoprophylaxis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 9, p. e40–e43, 2002.
- HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 65–97, 2015.
- HAMZEH-COGNASSE, H. et al. Platelets and infections - Complex interactions with bacteria. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1-18, fev, 2015.
- HIGGINS, R.; COUSINEAU, G. The pathogenesis of Leptospirosis I. Hemorrhages in experimental leptospirosis in guinea pigs. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 41, n. 2, p. 174–81, abr. 1976.
- JENNE, C. N.; KUBES, P. Platelets in inflammation and infection. **Platelets**, v. 26, n. 4, p. 286–92, 2015.
- JENNE, C. N.; URRUTIA, R.; KUBES, P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 35, n. 3, p. 254–261, 2013.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica** - 12ª Ed., Editora Guanabara Koogan, 2013.
- KERRIGAN, S. W. et al. A role for glycoprotein Ib in *Streptococcus sanguis*-induced platelet aggregation. **Blood**, v. 100, n. 2, p. 509–516, 2002.
- KERRIGAN, S. W. et al. Role of *Streptococcus gordonii* Surface Proteins SspA/SspB and Hsa in Platelet Function. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 12, p. 5740–5747, 2007.
- KERRIGAN, S. W.; COX, D. Platelet-bacterial interactions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 67:513–23, 2010.
- KITCHEN S., MCCRAW A., ECHENAGUCIA M. **Diagnosis of Hemophilia and Other Bleeding Disorders**. A laboratory manual Second Edition Published by the World Federation of Hemophilia (WFH), 39: 124 - 2010.

- KLINGER, M. H.; JELKMANN, W. Role of blood platelets in infection and inflammation. **Journal of Interferon Cytokine Research**, v. 22, n. 1079–9907, p. 913–922, 2002.
- KOUPENOVA, M. et al. Platelet-TLR7 mediates host survival and platelet count during viral infection in the absence of platelet-dependent thrombosis. **Blood**, v. 124, n. 5, p. 791–802, 2014.
- LAING, R. W.; TEH, C.; TOH, C. H. Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) complicating leptospirosis: a previously undescribed association. **Journal of Clinical Pathology**, v. 43, n. 11, p. 961–2, nov. 1990.
- LANDESBURG, R. et al. Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 4, p. 529–535, abr. 2005.
- LAURICHESSE, H. et al. Safety and immunogenicity of subcutaneous or intramuscular administration of a monovalent inactivated vaccine against *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae in healthy volunteers. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 4, p. 395–403, abr. 2007.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001.
- LEVETT, P. N. Systematics of Leptospiraceae. In: ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**. Berlin: Springer, 2015. p. 11–20.
- LEVIN, J. The Evolution of Mammalian Platelets. **Platelets**. 2^a. In: MICHELSON, A. D. Ed. Burlington: Academic Press, 2007. p. 3–22.
- LOMAR, A. V. **Estudo das alterações da hemostasia na leptospirose**. 1989. 107p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.
- LOURBAKOS, A. et al. Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: A new trait in microbial pathogenicity. **Blood**, v. 97, n. 12, p. 3790–3797, 2001.
- MACEDO, V. et al. Coagulação Intravascular Disseminada Na Leptospirose. **Revista de Patologia Tropical**, v. 3, n. 2, p. 363–365, 1973.
- MARTINEZ, R. et al. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba [Spanish] Eficacia y seguridad de una vacuna contra la leptospirosis humana en Cuba. **Revista Panamericana de Salud Publica - Pan American Journal of Public Health**, v. 15, n. 4, p. 249–255, abr. 2004.
- MASUZAWA, T.; SUZUKI, R.; YANAGIHARA, Y. Comparison of Protective Effects with Tetra-Valent Glycolipid Antigens and Whole Cell-Inactivated Vaccine in Experimental Infection of *Leptospira*. **Microbiology and Immunology**, v. 35, n. 3, p. 199–208, 1 mar. 2013.
- MERIEN, F. et al. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*. **Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Letters**, v. 185, n. 1, p. 17–22, 2000.
- MONARIS, D. **Avaliação do potencial imunogênico e vacinal das flagelinas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni**. 2015. 98 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

- MORGAN, J. et al. Outbreak of Leptospirosis among Triathlon Participants and Community Residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 12, p. 1593–1599, 2002.
- MURRAY, C. K.; HOSPENTHAL, D. R. Broth Microdilution Susceptibility Testing for *Leptospira* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1548–1552, 2004.
- MUSTARD, J. F.; KINLOUGH-RATHBONE, R. L.; PACKHAM, M. A. Isolation of human platelets from plasma by centrifugation and washing. **Methods in Enzymology**, v. 169, n. 1975, p. 3–11, 1989.
- NICODEMO, A. C.; DEL NEGRO, G.; AMATO NETO, V. Thrombocytopenia and leptospirosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, n. 4, p. 252–259, 1990.
- PANICCIA, R. et al. Platelet function tests: a comparative review. **Vascular Health and Risk Management**, v. 11, p. 133, 2015.
- PETERSEN, H. J. et al. Human platelets recognize a novel surface protein, PadA, on *Streptococcus gordonii* through a unique interaction involving fibrinogen receptor GPIIb/IIIa. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 1, p. 413–422, 2010.
- RAND, M. L.; LEUNG, R.; PACKHAM, M. A. Platelet function assays. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 28, n. 3, p. 307–317, 2003.
- REED, G. L. Platelet Secretion. **Platelets**. 2^a Ed. In: MICHELSON, A. D. Burlington: Academic Press, 2007. p. 309–318.
- SANO-MARTINS, I. S. et al. Platelet aggregation in patients bitten by the brazilian snake *Bothrops jararaca*. **Thrombosis Research**, v. 87, n. 2, p. 183–195, 1997.
- SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. **Revista de Microbiologia**. 1(9):97-109, 1970.
- SCARCELLI, E. et al. Detecção de agentes bacterianos pelas técnicas de isolamento e identificação e PCR – Multiplex em fetos bovinos abortados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 28(1): 23-27, 2004.
- SEMPLE, J. W.; ITALIANO, J. E.; FREEDMAN, J. Platelets and the immune continuum. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, 264-274, 2011.
- SEREBRUANYA, V. L. et al. Whole blood impedance aggregometry for the assessment of platelet function in patients with congestive heart failure (EPCOT trial). **European Journal of Heart Failure**, v. 4, n. 4, p. 461–467, 2002.
- SILVEIRA, M. M. et al. DNA vaccines against leptospirosis: A literature review. **Vaccine**, v. 35, n. 42, p. 5559–5567, 2017.
- SPETH, C. et al. *Aspergillus fumigatus* activates thrombocytes by secretion of soluble compounds. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 5, p. 823–833, 2013a.
- SPETH, C. et al. Platelets as immune cells in infectious diseases. **Future Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1431-1451, 2013b.
- TEW, J. G.; ROBERTS, R. R.; DONALDSON, D. M. Release of beta-lysin from platelets by thrombin and by a factor produced in heparinized blood. **Infection and immunity**, v. 9, n. 1, p. 179–86, 1 jan. 1974.

- TURGUT, M. et al. Thrombocytopenia complicating the clinical course of leptospiral infection. **Journal of International Medical Research**, v. 30, n. 5, p. 535–540, 2002.
- VANASSCHE, T. et al. Fibrin formation by staphylothrombin facilitates *staphylococcus aureus*-induced platelet aggregation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 107, n. 6, p. 1107–1121, 2012.
- VERMA, A. et al. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 5, p. 2659–2666, 2006.
- VINCENT, A. T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, 2019.
- VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 14, n. 5, p. 527–538, 2001.
- WALLER, A. K. et al. *Staphylococcus aureus* Lipoteichoic Acid Inhibits Platelet Activation and Thrombus Formation via the Paf Receptor. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 12, p. 2046–2057, 15 dez. 2013.
- WHITE, J. G. Platelet morphology and function. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Rundles RW. **Hematology**. McGraw-Hill, New York, p 1023–1039, 1972.
- WHITE, J. G. Platelet Structure. In: MICHELSON, A. D. **Platelets**. 2^a Ed. Burlington: Academic Press, 2007. p. 45–73.
- YANG, H. L. et al. Thrombocytopenia in the experimental leptospirosis of guinea pig is not related to disseminated intravascular coagulation. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, p. 1–9, 2006.
- YANG, L.-C. et al. Antimicrobial Activity of Platelet-Rich Plasma and Other Plasma Preparations Against Periodontal Pathogens. **Journal of Periodontology**, v. 86, n. 2, p. 310–318, 1 fev. 2015.
- YEAMAN, M. R. Platelets in defense against bacterial pathogens. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 67:525–44, 2010.
- ZHOU, L.; SCHMAIER, A. H. Platelet Aggregation Testing in Platelet-Rich Plasma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 123, n. 2, p. 172–183, 2005.
- ZUERNER, R. L. Host response to *Leptospira* infection. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 223–250, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabela 1 – Hemogramas obtidos dos voluntários. Todos os voluntários eram do sexo feminino, com idades entre 24 e 50 anos.

Parâmetros Analisados	Valores Médios				
	Voluntário 1	Voluntário 2	Voluntário 3	Voluntário 4	Voluntário 5
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	262	364	312	237	182
VPM (fL)	7,3	6,9	8,8	8,4	8,3
PDW (%)	16,1	15,8	16,3	16,4	16,5
PCT (%)	0,192	0,252	0,273	0,199	0,151
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	7,0	9,8	6,2	9,4	7,1
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	1,5	1,7	1,2	1,2	0,7
Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,2	0,5	0,4	0,5	0,3
Granulócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	5,4	7,7	4,6	7,7	6,1
Linfócitos (%)	24,1	16,8	18,5	12,6	10,4
Monócitos (%)	3,3	10,2	6,4	5,3	3,9
Granulócitos (%)	72,6	78,3	75,1	82,1	85,7
Eosinófilos (%)	1,2	1,3	0	0	0
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	4,61	5,29	4,63	5,67	4,64
Hemoglobina (g/dL)	12,6	13,6	12,7	14,2	13,1
Hematócrito (%)	41,5	46,3	41,1	49,4	42,8
VCM (fL)	89,9	87,7	89,0	87,3	92,4
HCM (pg)	27,3	25,7	27,3	25	28,2
CHCM (g/dL)	30,3	29,4	30,8	28,7	30,6
RDW (%)	13,4	12,5	12,8	14,3	11,7

Legenda: Plaquetas (PLT); Volume plaquetário médio (VPM); Amplitude de distribuição das plaquetas (PDW); Plaquetócrito (PCT); Volume corpuscular médio (VCM); Hemoglobina corpuscular média (HCM); Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM); Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW).

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “**Estudo da Interação entre Plaquetas e Leptospiras**”, que tem por finalidade entender porque ocorre uma diminuição do número de plaquetas e hemorragias nos pacientes com leptospirose. Este estudo pode contribuir no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento desta doença. Você está sendo convidado (a) a doar uma pequena amostra de sangue (20 mL), que será coletada uma única vez em uma data que será agendada. A coleta será realizada no Laboratório de Fisiopatologia e será empregado o mesmo procedimento que se realiza normalmente para coletar amostras de sangue em laboratórios de análises clínicas: o local será limpo com álcool, depois será utilizada uma fita para pressionar seu braço e a seguir utilizaremos uma seringa e agulhas descartáveis para colher uma amostra de sangue de sua veia do braço. Após a coleta, você deverá pressionar o local com algodão por algum tempo para não haver o aparecimento de uma mancha roxa. Devido ao pequeno volume de sangue obtido, essa coleta não irá afetar a sua saúde física e mental, porém se a compressão não for feita de maneira correta após a coleta, há risco de aparecimento de hematoma (mancha roxa) e dor no local da coleta de sangue. Em caso de ocorrer algum problema durante a coleta ou você passar mal, você receberá a assistência do corpo clínico do Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan, para avaliação médica e realização de exames posteriores.

A sua amostra de sangue será utilizada para a coleta das plaquetas. Caso seja observada alguma alteração, seu (s) exame(s) será(ão) realizado(s) novamente. Uma vez disponível o resultado do exame, você será informado (a) e receberá uma cópia impressa. Se for confirmada alguma alteração, você será encaminhado ao Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan. Uma vez que esses testes medem a coagulação sanguínea, se for descoberto algum problema, você também poderá saber se tem algum problema na coagulação e assim diminuir as chances de sangramento em qualquer cirurgia que lhe seja necessário realizar.

Você receberá informações sobre a pesquisa em qualquer momento que desejar. Você é livre para se recusar a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é totalmente voluntária e sua recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade, perda de benefícios ou prejuízos para você.

Trataremos a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os seus dados pessoais aqui informados não serão utilizados na pesquisa, não sendo possível a sua identificação, exceto aos responsáveis do estudo. Os resultados dos testes de laboratório serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome e o material que indique a sua participação nesta pesquisa não serão liberados sem a sua permissão. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan e outra será fornecida a você.

A participação no estudo não acarretará custos para você, porém nenhuma compensação financeira adicional pela sua participação no estudo estará disponível. Se você tiver gastos de transporte, alimentação ou de outro tipo para chegar ou permanecer no local de coleta, informe ao coordenador para que você seja ressarcido. Você poderá ser indenizado por eventual dano que venha a sofrer com a participação na pesquisa, porém não há nenhum seguro vinculado a esta pesquisa.

Você tem liberdade de perguntar, em qualquer momento, ao coordenador e pesquisador responsável (Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz do Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, telefone (11) 99278-2829, sobre o andamento dos testes realizados com as amostras de sangue coletadas. E caso você tenha dúvidas, você poderá entrar em contato diretamente com o coordenador do projeto, no endereço e telefone fornecidos abaixo, ou com o CEP/SMS-SP (Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde do Município de São Paulo), para denúncias éticas. Esse comitê funciona na Rua General Jardim, 36, 8º andar, São Paulo-SP; telefones (11) 3397-2000 ou 3397-2464.

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE

Eu, _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e rever minha decisão de participar, se assim o desejar. A responsável e coordenadora da pesquisa, a Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz, certificou-me de que todos os dados desta pesquisa são confidenciais. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dúvidas poderei chamar a Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz no telefone (11) 2627-9728 ou (11) 99278-2829 ou o CEP/SMS-SP (Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde do Município de São Paulo), na Rua General Jardim, 36, 8º andar, São Paulo-SP; telefones (11) 3397-2000 ou 3397-2464. São Paulo, SP.

Declaro que concordo em participar desse estudo, tendo eu compreendido completamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação. Estou consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios inerentes à minha participação neste projeto. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e atesto que me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Participante: _____

Assinatura: _____

Data: _____

Responsável: Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz

Assinatura: _____

Data: _____

Testemunha: Aline Patrícia Gonçalves

Assinatura: _____

Data: _____

Contato pelo responsável pela pesquisa

Coordenador do projeto: Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz

Pesquisador Científico VI - Instituto Butantan

Av. Vital Brasil 1500, São Paulo-SP, 05503-900

Tel. (11) 2627-9728 ou (11) 992-782829

Email: patricia.aniz@butantan.gov.br

Endereço do(a) participante-voluntário(a):

Domicílio: (rua, praça, conjunto):

Complemento/Nº/Bloco:

Bairro/CEP/Cidade/Telefone:

Ponto de referência:

Contato de urgência:

Sr(a):

Domicílio (rua, praça, conjunto):

Complemento/Nº/Bloco:

Bairro/CEP/Cidade/Telefone: