

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

MURYEL DE CARVALHO GONÇALVES

**EFEITO INIBITÓRIO DURADOURO DO ÓXIDO NÍTRICO
SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA**

**FLORIANÓPOLIS
2012**

MURYEL DE CARVALHO GONÇALVES

**EFEITO INIBITÓRIO DURADOURO DO ÓXIDO NÍTRICO
SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

G635e Gonçalves, Muryel de Carvalho

Efeito inibitório duradouro do óxido nítrico sobre a agregação plaquetária [dissertação] / Muryel de Carvalho ; orientador, Jamil Assreuy. - Florianópolis, SC, 2012.
1 v.: il., graf.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Óxido Nítrico. 3. Nitroglicerina.
4. Endotoxina. I. Assreuy, Jamil. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.
III. Título.

CDU 615

RISK
more than others think is safe.

CARE
more than others think is wise.

DREAM
more than others think is practical.

EXPECT
more than others think is possible.

(Cadet Maxim)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter iluminado mais uma etapa de minha vida, me proporcionando saúde e pessoas maravilhosas que me ajudaram a conquistar os meus objetivos.

Ao Professor Marco Mastroeni (UNIVILLE), pela oportunidade de participar e aprender muito em seus projetos durante a graduação, os quais me influenciaram positivamente a seguir o rumo acadêmico. Muito obrigada pela referência profissional e pessoal.

À Professora Verônica Morandi (UERJ), pelo incentivo e pelas conversas científicas importantes que me levaram até o Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – UFSC.

Ao professor Eduardo Pereira (UNIVILLE), pela amizade e apoio nos estudos em Farmacologia, fundamentais para a realização da prova do processo seletivo do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – UFSC.

Ao Professor orientador Jamil Assreuy, pelo privilégio de ser sua orientada, por me proporcionar valiosos aprendizados referentes à pesquisa e à vida. Obrigada por me ensinar que “*ciência é a arte de se observar detalhes*” e pelo exemplo de ser apaixonado pelo que se faz, contagiando a todos.

À Professora Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini, ao Professor Dr. José Eduardo da Silva-Santos e à Dra. Edinéia Lemos de Andrade por aceitarem participar como membros da comissão examinadora de defesa desta dissertação de Mestrado.

À Renata Terra (UFRGS), pelas experiências transmitidas relacionados à parte técnica deste trabalho e ao Prof. Jorge Guimarães (UFRGS) pela oportunidade de conhecer e trabalhar em seu laboratório, muito obrigada.

Ao Professor João Batista Calixto por permitir o uso de seus equipamentos.

À Bibiana Sgorla de Almeida e Denis Dall Agnolo, pelo apoio técnico no LAMEB, no uso do TECAN.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, pelo conhecimento compartilhado que contribuíram para a minha formação.

À Regina de Sordi, pela ajuda, apoio, ensinamentos e discussões fundamentais para realização deste trabalho. Obrigada também pela amizade e por ser sempre muito franca comigo, eu realmente aprendi e aprendo muito com você.

À Ângela Cristina Bet, por me acolher nos momentos iniciais em Florianópolis, pelas conversas e pelos momentos de distração, obrigada por tudo.

Aos membros da família NOlab, Gustavo Ramos, Patrícia Benedet, Edir Rezende, Lucas Souza, Adriane Madeira, Karin Scheschowitsch, Silvia Dal Bó, Elisabete Regina Bóf, Laís dos Santos, Regina de Sordi, Daniel Fernandes, pela amizade, incentivo e carinho que vocês me proporcionaram em momentos alegres e difíceis que passamos juntos, muito obrigada por tudo.

Aos demais amigos do departamento da Farmacologia, Thiago Correa, Paulo de Oliveira, Manuel Alfaro de Prá, Mariane Roman, Karla Guarido, Amanda Leitolis, Lara Cledes, Renata Marchette, Taciane Stein, Maíra Assunção e Elisabeth Linder, obrigada pelas conversas, pelos momentos divertidos, pelos preciosos momentos de distração e amizade, jamais esquecerei vocês.

À todos os funcionários do Departamento de Farmacologia, pela ajuda prestada.

Aos amigos Grasiane Andrietti, Fernando Andreacci, Luísa e Regina Cavassin, Fernanda Reisveiller, Simone Kobe, Mathias Ehlert, Caroline Rosa, Dorivalda e Kyrton Rocha, pela amizade e compreensão da minha ausência, e que apesar da distância de alguns, jamais deixaram de me apoiar e incentivar!

Aos meus pais Arthur Gonçalves Neto e Marilda Carvalho Gonçalves, e ao meu irmão Raphael de Carvalho Gonçalves pelo apoio e compreensão incondicionais proporcionado durante estes dois anos. Obrigada pelo amor e carinho de vocês.

Às minhas amadas avós Marlene de Carvalho e Beatriz Gonçalves, e minha querida madrinha Diva Rocha e a toda a minha família. Muito obrigada pelo apoio e incentivo.

Ao Ronald Paiva Moreno Gonçalves pelo amor, companheirismo, paciência e ensinamentos proporcionados. Obrigada por tudo honey.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro, importante para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	31
1.1 Óxido nítrico	32
1.2 Doadores de NO	36
1.3 Plaquetas	38
1.4 Agregação plaquetária	41
1.5 Inibição da agregação plaquetária	47
1.6 Plaquetas, NO e sepse	50
2. OBJETIVOS	53
2.1 Objetivo geral	54
2.2 Objetivos específicos	54
3. MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1 Animais	56
3.2 Obtenção de plasma rico em plaquetas	56
3.3 Contagem de plaquetas	57
3.4 Ensaio de agregação plaquetária	58
3.4.1 Protocolos de agregação plaquetária	60
3.4.1.1 Agregação plaquetária sem substituição de plasma autólogo	60
3.4.1.2 Agregação plaquetária com substituição de plasma autólogo	60
3.5 Indutores da agregação plaquetária	60
3.5.1 Agregação plaquetária induzida ADP e colágeno	61
3.6 Inibição da enzima guanilato ciclase solúvel	61
3.7 Doadores de óxido nítrico	61
3.7.1.1 Avaliação do efeito de doadores de NO	62
3.7.2 Avaliação do efeito de doadores de NO pós- substituição de plasma autólogo	62
3.8 Agregação plaquetária na sepse experimental induzida por LPS	63
3.9 Compostos e reagentes utilizados	64
3.10 Análises dos resultados e testes estatísticos	64
4. RESULTADOS	65
4.1 Avaliação da agregação plaquetária induzida por ADP e colágeno (COL)	66
4.2. Inibição da agregação plaquetária induzida por trinitrato de glicerila (GTN)	66
4.3 Inibição da agregação plaquetária induzida por s-nitrosoglutationa (GSNO)	69
4.4 Inibição da enzima guanilato ciclase solúvel no efeito do GTN	69
4.5 Efeito dos doadores de NO com substituição por plasma autólogo	71
4.6 Avaliação da duração do efeito inibitório de longa duração do trinitrato de glicerila (GTN)	73

4.7	Agregação plaquetária na sepse experimental induzida por LPS.....	74
4.8	Hemograma de animais endotoxêmicos.....	75
5.	DISCUSSÃO	77
6.	CONCLUSÕES	85
7.	REFERÊNCIAS	89

LISTA DE ABREVIações

AA	-	Ácido araquidônico
ADP	-	Difosfato de adenosina
ATP	-	Trifosfato de adenosina
AMP	-	Monofosfato cíclico de adenosina
Ca ²⁺	-	Íons cálcio
Ca ²⁺ ATPase	-	Proteína transmembrana
GMPc	-	Monofosfato cíclico de guanosina
DAG	-	Diacilglicerol
DO	-	Densidade ótica
EDRF	-	Fator de relaxamento derivado do endotélio (do inglês: <i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>)
EPM	-	Erro padrão da média
fvW	-	Fator de Von Willebrand
GCs	-	Guanilato ciclase solúvel
GMP	-	Monofosfato cíclico de 3'-5'-guanosina
GTP	-	Trifosfato de guanosina
GTN	-	Trinitrato de glicerila
GSNO	-	S-nitrosotiol
GPIb	-	Glicoproteína Ib
GPIb-IX-V	-	Complexo glicoprotéico GPIb
IFN	-	Interferon γ
IL-1	-	Interleucina-1
IP ₃	-	Trifosfato de inositol
i.p.	-	Intraperitoneal
LPS	-	Lipopolissacarídeo bacteriano
NADPH	-	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	-	Óxido nítrico
NO-	-	Ânion nitroxil
NO+	-	Cátion nitrosênio
NO ²⁻	-	Íon Nitrito
NOS	-	Óxido nítrico sintase
O ²⁻	-	Ânion superóxido
ODQ	-	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-one
ONOO ⁻	-	Ânion peroxinitrito
PBS	-	Salina tamponada com fosfato
PG ₂	-	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	-	Prostaciclina
PIP ₂	-	Fosfatidilinositol bifosfato
PKA	-	Proteína quinase dependente de AMPc
PKG	-	Proteína quinase dependente de GMPc
PRP	-	Plasma rico em plaquetas

PLA - Fosfolipase A
PLC - Fosfolipase C
RSNO - S-nitrosilação
TPA - Ativador de plasminogênio tecidual
TxA₂ - Tromboxano A₂
VASP- Fosfoproteína estimulada por vasodilatador (do inglês, *vasodilator-stimulator phosphoprotein*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de sinalização da via NO-GCs.....	35
Figura 2. Estrutura da plaqueta.....	40
Figura 3. Receptores de adesão e ativação plaquetária.....	43
Figura 4. Cascata de ativação plaquetária.....	46
Figura 5. Mecanismos de ação do NO na plaqueta.....	50
Figura 6. Padronização da velocidade de centrifugação do sangue total para obtenção do plasma rico em plaquetas.....	57
Figura 7. Padronização do número de plaquetas a ser utilizado nos ensaios de agregação plaquetária.....	58
Figura 8. Registro típico de agregação plaquetária realizada no leitor de placas	59
Figura 9. Avaliação da agregação plaquetária induzida por ADP e colágeno.....	66
Figura 10. Efeito inibitório de trinitrato de glicerila (GTN) na agregação plaquetária induzida por ADP.....	67
Figura 11. Efeito inibitório de trinitrato de glicerila (GTN) na agregação plaquetária induzida por colágeno.....	68
Figura 12. Efeito inibitório da S-nitrosoglutationa (GSNO) na agregação plaquetária induzida por ADP (Painel A) e por colágeno (Painel B).....	69
Figura 13. . Efeito do ODQ, um inibidor da guanilato ciclase solúvel, na inibição da agregação plaquetária induzida por GTN.....	70
Figura 14. Efeito da remoção de doadores de NO sobre a inibição da agregação plaquetária.....	72
Figura 15. Curso temporal do efeito inibitório do GTN na agregação plaquetária.....	73
Figura 16. Agregação plaquetária de animais endotoxêmicos 3 h após injeção de LPS.....	74
Figura 17. Hemograma de animais endotoxêmicos.....	75

RESUMO

GONÇALVES, M. C. “Efeito duradouro do óxido nítrico sobre a agregação plaquetária”. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

A agregação plaquetária ocorre fisiologicamente para ocluir lesões em vasos ou em condições anormais como na disfunção endotelial ou na sepse. Diversos estímulos fisiológicos podem ativar as plaquetas tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Alguns destes agentes agregantes são colágeno, ADP, 5-HT, trombina, TxA_2 entre outros. O óxido nítrico, assim como a prostaglandina I_2 (prostaciclina), age como inibidor fisiológico da agregação plaquetária. O NO atua de diversas maneiras sobre a agregação plaquetária, desde a mobilização de cálcio até a inibição de receptores plaquetários. Um dos mecanismos de ação do NO na inibição da agregação plaquetária é através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel, e conseqüente formação do GMPc. O aumento de GMPc intracelular diminui as concentrações de cálcio intracelular, contribuindo para a inibição plaquetária. Neste estudo, foi avaliado se o NO apresentaria efeito inibitório na agregação plaquetária, mesmo após a sua remoção e se esta inibição seria duradoura. A agregação plaquetária foi induzida por ADP ou colágeno em plasma rico em plaquetas de ratos, e como ferramentas farmacológicas para estudar o efeito do NO, foram usados o GTN (trinitrato de glicerila) e o GSNO (S-nitrosoglutationa), ambos doadores de NO. O inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel, ODQ, foi utilizado para verificar a participação desta enzima na inibição da agregação plaquetária. O presente estudo mostrou que distintos doadores de NO causam perfis diferentes de inibição da agregação plaquetária e que este efeito agudo parece envolver ativação da guanilato ciclase. Outro achado importante e inédito foi que este efeito anti-agregante do NO é duradouro e que, talvez, possa ser explicado por S-nitrosilação de proteínas presentes em plaquetas. Por fim, um choque endotoxêmico induzido por endotoxina bacteriana (LPS) diminuiu o número de plaquetas circulantes e a agregação plaquetária.

Palavras-chave: Óxido nítrico, agregação plaquetária, trinitrato de glicerila, s-nitrosoglutationa, endotoxina.

ABSTRACT

GONÇALVES, M. C. “Long-lasting effect of nitric oxide on platelet aggregation”. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Platelet aggregation occurs physiologically to occlude vessels lesions or abnormal conditions as endothelial dysfunction or sepsis. Several physiological stimuli can activate platelets *in vivo* and *in vitro*. Some of these aggregating agents are collagen, ADP, 5-HT, thrombin, TxA_2 and others. Nitric oxide (NO) and prostaglandin I_2 (prostacyclin) work as physiological platelet aggregation inhibitors. NO acts on platelet aggregation in several manners from mobilization of calcium to platelet receptors inhibition. One NO mechanism of action in inhibiting platelet aggregation is through the soluble guanylate cyclase enzyme activation and subsequent cGMP formation. Increased cGMP reduces intracellular calcium concentrations contributing to platelet inhibition. In this study, it was evaluated whether NO would present inhibitory effect in platelet aggregation even after its removal and whether that effect would last. Platelet aggregation was induced by ADP or collagen in platelet rich plasma from rats and as pharmacological tools to study the NO effect, we used the GTN (glyceryl trinitrate) and GSNO (S-nitrosoglutathione), both NO donors. The inhibitor of soluble guanylate cyclase enzyme (ODQ) was used to verify the involvement of this enzyme in the platelet aggregation inhibition. The present study showed that NO donors cause different profiles of platelet aggregation inhibition and this effect seems to involve acute activation of guanylate cyclase. Another important finding was that this unprecedented and anti-aggregating effect of NO is sustained and perhaps can be explained by S-nitrosylation of proteins present in platelets. Finally, the endotoxemic shock induced by bacterial endotoxin (LPS) decreased the number of circulating platelets and platelet aggregation.

Keywords: Nitric oxide, platelet aggregation, glyceryl trinitrate, s-nitrosoglutathione, endotoxin.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Óxido nítrico

Há 30 anos a função do óxido nítrico (NO) na biologia evoluiu do conhecimento como radical livre gasoso e incolor comumente formado na atmosfera durante tempestades e relâmpagos, além de poluente ambiental, para uma molécula endógena envolvida na comunicação intracelular, intercelular e na transdução de sinais (EGBRINK, 2005). Esta história começou a ser elucidada em 1980 por Furchgott, Zawadzki e colaboradores, que observaram que o efeito vasorelaxante induzido por acetilcolina era dependente da ação de algum fator liberado pelo endotélio vascular. Em 1982, Cherry, Furchgott e colaboradores denominaram esta substância de fator relaxante derivado do endotélio (*Endothelium-derived Relaxing Factor* – EDRF). Muitos pesquisadores tentaram isolar o EDRF e muitas dúvidas surgiram a respeito da sua identidade química nesta época. Em 1987, Palmer, Ferridge e Moncada mostraram resultados que mostraram a identidade química entre o EDRF e o NO, confirmado posteriormente por outros (IGNARRO *et al.*, 1988).

O NO é sintetizado por um grupo de enzimas denominadas NO sintases (NOS). Sua síntese ocorre em duas fases: na primeira fase há a oxidação da L-arginina originando a N-hidroxi-L-arginina, uma molécula intermediária e estável; a segunda fase gera a L-citrulina e o NO em quantidade equimolares (para revisão ver ASSREUY & FERNANDES, 2008). Há três isoformas de NOS, as constitutivas I e III (neuronal e endotelial, respectivamente), e a induzível (II). A nomenclatura nominal originou-se decorrente da descoberta destas isoformas nos respectivos tecidos, e no caso da induzível, da sua expressão em células ativadas em resposta a estímulos patológicos. Entretanto, atualmente sabe-se que a NOS I, além da produção constitutiva do NO como neurotransmissor, também está presente em mastócitos e plaquetas. Esta isoforma é ativada por calmodulina necessitando de concentrações micromolares de cálcio (0,1 a 1 μM). A NOS II pode ser encontrada em macrófagos, neutrófilos e plaquetas, onde sua indução está relacionada a vários mecanismos fisiopatológicos, entre eles, a participação de citocinas inflamatórias como o interferon gama (IFN- γ), a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

(VANNI *et al.*, 2007). A NOS II, diferentemente das NOS I e III, requer concentração de cálcio equivalente ao nível basal intracelular (100 nM), sendo assim é classificada como independente de cálcio (ALDERTON *et al.*, 2001). A NOS III não é restrita às células endoteliais, sendo encontrada numa variedade de tecidos, tais como hipocampo cerebral, fígado, pulmão, trato gastrointestinal, órgãos reprodutores, cardiomiócitos, megacariócitos e em plaquetas (RANDRIAMBOAVONJY & FLEMING, 2005). Esta é a isoforma originalmente encontrada como a responsável pela produção do EDRF (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). Trata-se de enzima também classificada como dependente de cálcio, necessitando da ligação com a calmodulina, assim como a isoforma NOS I.

Além das concentrações de cálcio requeridas pelas enzimas, há ainda diferenças relacionadas à atividade catalítica das NO sintases. As isoformas NOS I e NOS III (constitutivas) produzem e liberam NO em concentrações nanomolares por pouco tempo (segundos a minutos). Entretanto a NOS II produz e libera NO em concentrações micromolares durante longos períodos de tempo (ALDERTON *et al.*, 2001).

Em 1992, Stamler e colaboradores estudaram a configuração eletrônica do NO e verificaram que o mesmo apresenta variações em relação ao número de elétrons nos orbitais atômicos, os quais determinam a existência de diferentes formas redox, como o NO[•] (óxido nítrico), o NO⁺ (cátion nitrosônio) e o NO⁻ (ânion nitroxil). O NO[•] possui um elétron no orbital 2p- π , sendo que a remoção deste elétron forma o NO⁺, e a adição de um elétron neste orbital forma o NO⁻. As diferentes formas radicalares de NO são geralmente designadas como NO[•], mesmo apresentando diferentes propriedades químicas entre si. O NO possui alta reatividade e uma meia-vida curta, que pode variar de 3 a 10 segundos (VAUGHN *et al.*, 1998). O NO⁺ pode reagir com radicais -SH (tióis) de resíduos de cisteína presentes em diversas proteínas formando S-nitrosotióis (RSNO). Os RSNO atuam como reservas bioativas de NO no plasma e em tecidos (STAMLER, 1994).

O NO reage com o ânion superóxido (O₂⁻) para formar o ânion peroxinitrito (ONOO⁻). No endotélio, o O₂⁻ é gerado por uma família de enzimas transmembranas, conhecidas como NADPH oxidases que atuam em resposta a cascatas de sinalização que podem ser iniciadas por estresse mecânico ou

osmótico, agentes vasoativos e citocinas (para revisão ver STREETER *et al*, 2012). Estas espécies reativas de oxigênio estão associadas a danos teciduais (além de crescimento, migração, proliferação celular e rearranjo de citoesqueleto) e, assim como o ONOO⁻, são potentes oxidantes, responsáveis por causar modificação oxidativa em radicais sulfidrilas de moléculas protéicas e não protéicas. A produção de superóxido pode estar aumentada em quadros patológicos, como a inflamação (RADI *et al.*, 1991).

No final da década de 60, alguns estudos identificaram a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) como a principal enzima responsável pela conversão enzimática de guanosina-5'-trifosfato (GTP) em guanosina-cíclica-3',5'-monofosfato (GMPc) (HARDMAN & SUTHERLAND, 1969; ISHIKAWA *et al*, 1969). A descoberta do NO como um potente ativador da enzima GCs foi realizada por Gruetter e colaboradores (1979), os quais sugeriram que compostos que continham NO induziam a formação de GMPc via um mecanismo comum. Os efeitos do NO são predominantemente mediados através da ligação no grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (MONCADA *et al.*, 1991). Há três proteínas intracelulares receptoras para o GMPc, as fosfodiesterases (PDEs), os canais de cátions operados por GMPc e proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG), sendo as últimas as principais responsáveis pelos efeitos biológicos do GMPc (HOFMANN *et al.*, 2000). A Figura 1 ilustra as possíveis vias de sinalização nas quais o GMPc pode atuar.

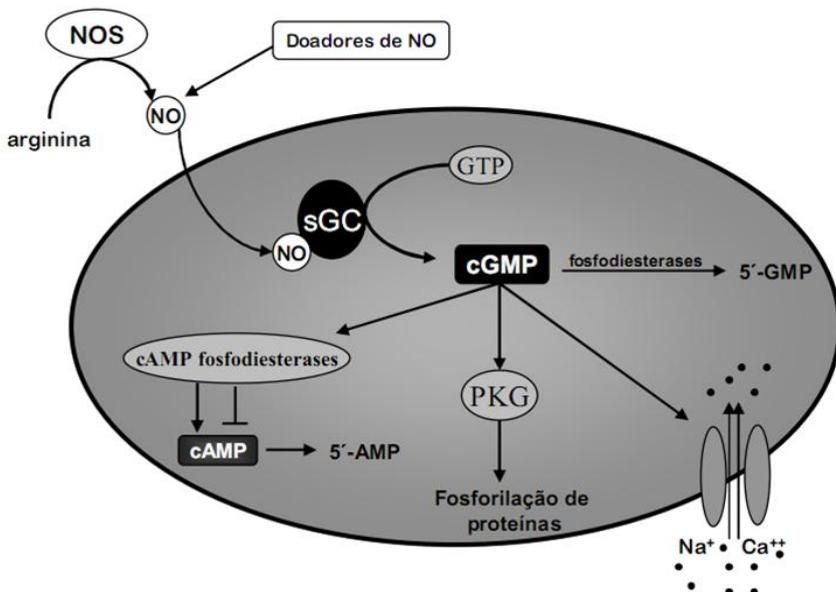


Figura 1. Mecanismos de sinalização da via NO-GCs-GMPc. O NO produzido endogenamente pelas NOS ou liberado a partir de doadores de NO, ativa as GCs levando a um aumento da síntese de GMPc. Este mensageiro intracelular, por sua vez, modula a atividade da PKG, canais iônicos e fosfodiesterases. Estes efetores estão envolvidos em vários processos do sistema cardiovascular, entre outros (Reproduzido de FERNANDES, 2006).

O aumento do GMPc intracelular foi primeiramente estudado na vasodilatação e na inibição da agregação plaquetária (MONCADA *et al.*, 1988). Atualmente, sabe-se que o NO age também na fototransdução e neurotransdução na retina, no olfato, na regulação da concentração intracelular de cálcio livre (importante fator para a agregação plaquetária), na síntese de hormônios esteróides, na regulação da contratilidade muscular cardíaca e lisa (vascular e não vascular), entre outros. Disfunções na produção ou respostas ao GMPc são relacionadas a processos patológicos como choque endotóxico, diarreia secretória e hipertensão (SCHMIDT *et al.*, 1993; LUCAS *et al.*, 2000).

Inibidores da guanilato ciclase solúvel são utilizados em estudos experimentais para avaliar a participação da via guanilato ciclase e NO. O azul de metileno e o ODQ (1H-

[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-one) são ferramentas farmacológicas utilizadas para inibir a GCs. O ODQ é altamente seletivo para esta enzima, e o azul de metileno, além de não ser seletivo, é menos potente. Ambos possuem a capacidade de abolir o aumento de GMPc intracelular, mas o azul de metileno apresenta outros efeitos em outros sistemas. Por estas razões, atualmente, o ODQ é considerado ferramenta favorita para diferenciar os efeitos do NO, dependentes e independentes de GMPc (HWANG *et al.*, 1998).

1.2 Doadores de NO

O termo doador de NO corresponde a um composto que libera NO como um mediador bioativo. São agentes farmacológicos sintéticos ou naturais e são divididos em diferentes grupos como: nitratos orgânicos (trinitrato de glicerila, GTN), nitritos orgânicos (nitrito de amilo), nitrosos inorgânicos (nitroprussiato de sódio, SNP), e os S-nitrosotióis (S-nitrosoglutathiona, GSNO) (FEELISCH, 1998; IGNARRO *et al.*, 2002).

Em meados do século XIX, foi sintetizado somente o primeiro nitrito orgânico (nitrito de amilo) por Balard (1844), porém a observação dos seus efeitos como rubor na face, dilatação da artéria carótida e aumento da frequência cardíaca ocorreu em 1856 por Guthrie. Em 1867, o médico Lauder Brunton iniciou o tratamento de *angina pectoris* com nitrito orgânico após observar que o sangramento dos seus pacientes era benéfico no alívio da dor e que a substância que reduz a pressão arterial poderia ter o mesmo efeito sobre a dor dos seus pacientes. Logo depois da descoberta do nitrito de amilo, o italiano Ascanio Sobrero em 1847, sintetizou o nitrato orgânico trinitrato de glicerila- GTN (também conhecido nitroglicerina), mas somente em 1879 iniciou-se o seu uso no tratamento de *angina pectoris* (para revisão ver MONCADA *et al.*, 1988). Ressalte-se, porém, que somente 120 anos após o início do uso dos nitratos orgânicos para o tratamento de angina é que foi elucidado o mecanismo de ação deste grupo de compostos.

Antes de o GTN exercer os seus efeitos biológicos, há a formação dos seus metabólitos dinitratos: 1,2-gliceril dinitrato (1,2-GDN) e 1,3-gliceril dinitrato (1,3-GDN), e então a ativação da

enzima guanilato ciclase solúvel pelo NO (KOJDA *et al.*, 1997). Os nitratos de modo geral, apresentam efeito de vasodilatação de início rápido, porém seu uso crônico favorece o desenvolvimento de tolerância entre diferentes nitratos orgânicos. Dentre as distintas possibilidades para o surgimento da tolerância, ressaltam-se: i) diminuição da expressão de NOS III e biodisponibilidade de co-fatores; ii) aumento da produção de O_2 e $ONOO^-$; iii) dessensibilização da enzima sGC e consequente alteração da liberação do NO pelo GTN e iv) diminuição da biotransformação (GTN) e formação de metabólitos e NO_2^- , catalisado pela nitrato redutase a aldeído desidrogenase mitocondrial, apontada como a principal enzima responsável pelo metabolismo do GTN (CHEN *et al.*, 2002). Apesar de existirem algumas teorias para explicar o desenvolvimento da tolerância aos nitratos orgânicos, não há consenso na literatura a respeito dos mecanismos envolvidos neste feito indesejável.

Os nitratos e nitritos orgânicos (nitrovasodilatadores) são pró-drogas que geram NO bioativo através de metabolismo enzimático (FEELISCH & NOACK, 1987), ao passo que os S-nitrosotióis pertencem a uma classe de doadores de NO que liberam NO^+ espontaneamente (IGNARRO *et al.*, 2002).

O doador de NO S-nitrosoglutathiona (GSNO) é um composto S-nitrosotiol fisiológico, o qual está presente no sangue e em tecidos, possui potente atividade anti-agregante plaquetária apesar da baixa taxa de liberação de NO e da modesta capacidade de estimular o acúmulo de GMPc intraplaquetário (GORDGE *et al.*, 1998). Segundo McGrowder e colaboradores (2003), o GSNO exógeno em baixas concentrações é capaz de proteger o miocárdio contra isquemia, provoca vasodilatação arterial seletiva, e possui ação antitrombótica. Os S-nitrosotióis são mais estáveis que os nitratos orgânicos, sendo que alguns apresentam meia-vida de minutos ou horas (GASTON, 1999).

Entre os compostos S-nitrosotióis estão incluídos S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP), S-nitrosoglutathiona (GSNO), S-nitrosocaptopril, S-nitrosocisteína e a S-nitrosohemoglobina. Apesar de serem relativamente estáveis por longos períodos de estocagem, em solução aquosa são instáveis e a razão da decomposição destes compostos depende, em grande parte, das características químicas da estrutura associada ao NO (SOÚLERE *et al.*, 2001). Os principais mecanismos bioquímicos formadores de S-nitrosotióis decorrem

da reação direta de NO^- , NO^+ e a geração de óxidos superiores como o N_2O_3 . Em compartimentos intra e extracelulares os S-nitrosotióis de proteínas, peptídeos e aminoácidos formam estoques bioativos de NO. Em sistemas biológicos, a reação do NO com grupamento tiol livre corresponde à formação de um mecanismo de transporte circulante de NO por longas distâncias. Deste modo, os S-nitrosotióis são considerados verdadeiros reservatórios de NO.

As principais enzimas responsáveis pela liberação de NO dos S-nitrosotióis são a γ -glutamil transpeptidase, glutathione peroxidase e a xantina oxidase, sendo a última uma geradora de O_2^- , que pode induzir a decomposição de S-nitrosotióis em condições aeróbicas (WANG *et al.*, 2000). Estes compostos são agentes terapêuticos atrativos, pois são naturalmente encontrados no plasma e em tecidos como metabólitos endógenos de NO, sugerindo que a toxicidade com o seu uso deve ser baixa (GORDGE & XIAO, 2010).

Para este estudo foram utilizados dois doadores de NO distintos, o GTN (nitrato orgânico) e o GSNO (S-nitrosotiol).

1.3 Plaquetas

O médico e pesquisador italiano Giulio Bizzozero é conhecido como o “Pai das plaquetas”, pois em 1862, descobriu um novo elemento morfológico sanguíneo que seria importante na hemorragia e na trombose. Esses elementos se tornaram conhecidos mais tarde como plaquetas, que são fragmentos celulares anucleados com diâmetro de aproximadamente 2 μm , derivados de megacariócitos provenientes da medula óssea. Em seres humanos a contagem de plaquetas varia de 100 a 400 x $10^6/\text{mL}$, porém em ratos a contagem é muito superior, podendo variar de 900 a 1600 x $10^6/\text{mL}$, e o tempo de vida varia de 8 a 12 dias em ambas as espécies. Cerca de 100 bilhões de novas plaquetas são originadas diariamente pelos megacariócitos da medula óssea em seres humanos (para revisão ver SEMPLE *et al.*, 2011).

As plaquetas começaram a ganhar reconhecimento na biologia celular a partir do momento que foi identificado que as mesmas possuem a maior densidade de receptores em sua membrana plasmática, quando comparado às demais células

sanguíneas. Elas representam a linha primária de reparo tecidual quando há lesão vascular ou endotelial (AHMAD & WALSH, 1994).

A superfície da membrana plasmática plaquetária é geralmente lisa exceto por invaginações periódicas que determinam as entradas do sistema canalicular, os quais formam um complexo de membranas que permeiam o citoplasma da plaqueta. Devido a esta rede de conexões através de canaliculos, há uma maior superfície de contato que permite alcançar proteínas e demais moléculas rapidamente e então liberá-las em situações de ativação plaquetária (ITALIANO Jr., 2008).

Plaquetas em estado inativo ou em repouso apresentam forma discóide e sua superfície se encontra com a textura lisa. Este estado da superfície plaquetária se deve a presença de um citoesqueleto bem definido e altamente especializado, o qual é composto por um anel marginal de microtúbulos espirais (dímeros e polímeros de α e β -tubulinas que podem ser encontrados vinculados aos microtúbulos em condições fisiológicas) e citoesqueleto a base de espectrina e actina. O anel marginal de microtúbulos espirais são os maiores responsáveis pelo formato discóide da plaqueta em repouso. As espectrinas são encontradas em associação com longos filamentos de actina (em eritrócitos, as espectrinas são associadas a curtos filamentos de actina) e sua função ainda não está bem elucidada. Cerca de 2 milhões de moléculas de actina são encontradas em cada plaqueta e 40% de suas subunidades se encontram polimerizadas para formar de 2000 a 5000 filamentos no estado de repouso plaquetário; o restante é estocado em um complexo com a timosina β 4 e então convertidos em filamentos de actina na formação dos pseudópodes em momento de ativação plaquetária (ITALIANO Jr. *et al.*, 1999 ; para revisão SEMPLE *et al.*, 2011). As plaquetas expressam altas concentrações de proteínas acessórias à actina, como a filamina e a actinina α . A filamina está ligada a porções dos receptores GPIb e complexo GPIb-IX-V, bem como demais moléculas. Essas conexões são importantes para manter o estado de repouso plaquetário (ITALIANO Jr., 2008).

A Figura 2 mostra os estados de repouso e ativação das plaquetas, assim como a disposição dos componentes do seu

citoesqueleto como os filamentos de actina e os microtúbulos marginais.

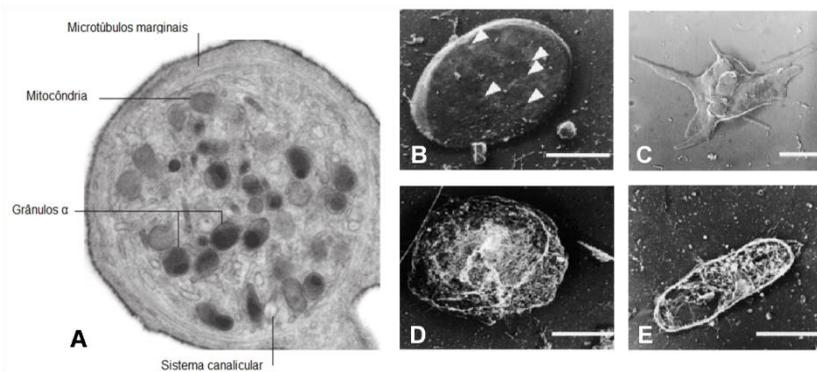


Figura 2. Estrutura da plaqueta. (A) imagem de microscopia eletrônica de transmissão mostrando a organização intracelular da plaqueta em repouso. Os microtúbulos marginais cercam o citoplasma plaquetário, mantendo o seu formato discóide. Os grânulos α constituem a maioria dos grânulos de estocagem, intercalados com grânulos densos, mitocôndrias, peroxissomos e lisossomos. O sistema canalicular é formado por invaginações da membrana plasmática e uma rede complexa de tubos membranosos que permeiam o citoplasma das plaquetas (Modificado de SEMPLE *et al.*, 2011). As imagens de microscopia eletrônica mostram: (B) superfície lisa das plaquetas em repouso, exceto pelas aberturas do sistema canalicular indicados pelas setas; (C) pseudópodes da plaqueta ativada; (D) presença do citoesqueleto composto por actina que permeia todo o citoplasma da célula; (E) presença do anel de microtúbulos marginais característico do estado de repouso da plaqueta. As barras brancas representam 1 μm (Modificado de ITALIANO Jr. *et al.*, 1999).

Apesar de ser considerado por muitos autores como um simples fragmento celular por não apresentar núcleo, as plaquetas apresentam metabolismo próprio devido à presença de organelas como grânulos α , grânulos densos, mitocôndrias, lisossomos e peroxissomos. Possuem ainda uma estrutura muito importante chamada de sistema tubular denso, formado a partir do retículo endoplasmático liso das plaquetas de megacariócitos imaturos (COLLER *et al.*, 2010). As organelas mais abundantes

nas plaquetas são os grânulos α , com 40-80 unidades por plaqueta, os quais derivam seu conteúdo protéico pela combinação de endocitose e biosíntese. O conteúdo dos grânulos α inclui fatores de coagulação, quimioquinas, proteínas de adesão, fatores mitogênicos e reguladores de angiogênese. Estudos recentes mostram ainda a existência de duas classes de grânulos α , uma que contém fibrinogênio, e a outra, o fator de von Willebrand. Os mesmos estudos ressaltam a possibilidade das plaquetas também possuírem a capacidade de estocar moléculas anti e pró-inflamatórias em subpopulações de grânulos distintos e só liberarem seus conteúdos conforme o dano vascular (para revisão ver SEMPLE *et al.*, 2011).

Os grânulos densos são encontrados em menor número (2-10 por plaqueta), contém adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), cálcio, magnésio, serotonina, adrenalina, noradrenalina e pirofosfato, entre outras substâncias. O local de síntese de prostaglandinas e tromboxano e de sequestro de cálcio é no sistema tubular denso. É a liberação primária de cálcio do sistema tubular denso que engatilha a contração plaquetária e conseqüentemente a ativação interna das plaquetas (COLLER *et al.* 2010).

1.4 Agregação plaquetária

Em condições normais cerca de um trilhão de plaquetas (em seres humanos) fluem continuamente em 1000 m² de área vascular, sem aderir ou agregar. Entretanto, assim que há o rompimento da integridade do vaso sanguíneo ou aumento do estresse de cisalhamento (*shear stress*) provocado por uma placa de ateroma, por exemplo, ocorre uma rápida e complexa interação entre as plaquetas circulantes, células endoteliais e estruturas subendoteliais (LEVI, 2005; YIP *et al.*, 2005). Para as plaquetas exercerem seu papel na hemostasia primária, ou seja, formação do tampão plaquetário, é necessária a integridade de três componentes da função plaquetária: adesão, ativação e agregação (propagação). Diversos estímulos fisiológicos podem ativar as plaquetas tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Alguns agentes agregantes são proteínas particuladas, como o colágeno, outros são enzimas proteolíticas como a trombina e ainda compostos de baixo peso molecular como ADP, 5-HT, adrenalina e TxA₂. Cada um destes agentes possui receptores específicos na superfície

da membrana plasmática plaquetária (ZUCKER & NACHMIAS, 1985; SEMPLE *et al.*, 2011).

Após ruptura da parede do vaso, o colágeno, presente na porção subendotelial vascular, é exposto à corrente sanguínea. O fator de von Willebrand (fvW) que está circulante no plasma pode então ligar-se ao colágeno exposto do endotélio. O fvW pode atuar como mediador da ligação entre o colágeno e a membrana plaquetária, agindo no receptor glicoproteína Ib (GPIb). O fvW é uma proteína grande (secretada pelas células endoteliais) e parece ser, hemostaticamente, mais ativa na adesão e agregação do que moléculas menores, pois devido ao seu tamanho, possui vários sítios de ligação que podem interagir com a parede do vaso, matriz subendotelial e receptores plaquetários. Todavia, a interação da ligação do fvW, estruturas subendoteliais e glicoproteínas plaquetárias (GP) é dependente de estresse de cisalhamento, pois a alteração do fluxo sanguíneo promove um alongamento do polímero fvW, expondo assim os seus sítios de ligação aos quais as plaquetas e endotélio possam aderir (SIEDLECKI *et al.*, 1996). O fvW pode também se associar a selectina-P no endotélio ativado, fornecendo suporte a adesão plaquetária via receptor GPIb. A diferença na adesão plaquetária quando há menor estresse de cisalhamento comparado a um maior estresse é que no primeiro caso, o início do processo de adesão é dado pela exposição da matriz extracelular, permitindo que o colágeno possa ativar os receptores plaquetários, GPIb-IX-V e GP VI. Essas interações levam a um rápido aumento de Ca^{2+} citosólico, rearranjo no citoesqueleto, ativação do receptor $\alpha IIb\beta 3$ que se liga ao fvW ou ao fibrinogênio (encontrado no plasma sanguíneo e matriz extracelular), promovendo assim a agregação plaquetária. No segundo caso, o fvW se liga ao complexo complexo GPIb-IX-V e subsequente formação do trombo dependente de $\alpha IIb\beta 3$. (LEVI, 2005; YIP *et al.*, 2005). A Figura 3 resume as possibilidades de adesão plaquetária, assim como os seus receptores envolvidos.

Uma vez iniciada a adesão plaquetária, as plaquetas sofrem ação dos agonistas plaquetários, incluindo o próprio colágeno, a trombina e a adrenalina. Esses agonistas se ligam aos receptores de membrana das plaquetas e ativam cascatas bioquímicas no citosol (YIP *et al.*, 2005).

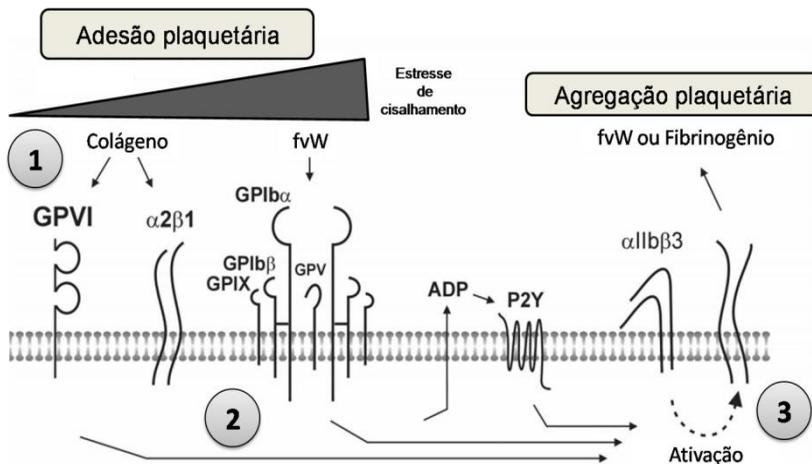


Figura 3. Receptores de adesão e ativação plaquetária. (1) A ligação do fvW com o complexo GP Ib-IX-V em alto estresse de cisalhamento, ou a ligação do colágeno com a GP VI em baixo estresse de cisalhamento, transmitem sinais intracelulares (2) que levam ao aumento de Ca^{2+} , mudanças no citoesqueleto, secreção de agonistas como ADP e ativação da integrina $\alpha IIb\beta 3$ que se liga ao fvW e ao fibrinogênio, (3) que promovem a agregação plaquetária (Modificado de YIP *et al.*, 2005).

Os agonistas de receptores plaquetários utilizados neste estudo foram: ADP e colágeno. O ADP atua nos seguintes receptores: $P2X_1$, $P2Y_1$ e $P2Y_{12}$. O receptor $P2X_1$ é um canal de cátions dependente de ATP que permite o influxo de cálcio para o interior da plaqueta (BRASS & STALKER, 2008), mas somente sua ativação não é suficiente para promover uma agregação plaquetária completa, entretanto o mesmo induz a alteração morfológica da plaqueta (*shape change*) e participa da agregação plaquetária induzida por estresse de cisalhamento e por colágeno. Já os demais receptores $P2Y_1$ e $P2Y_{12}$, são receptores acoplados a proteínas $G_{\alpha q}$ e $G_{\alpha i2}$, respectivamente. O receptor $P2Y_1$ promove a mobilização de cálcio intracelular que resulta em rearranjo do citoesqueleto, porém induz agregação plaquetária fraca e transitória em resposta ao ADP. Todavia, a ativação deste receptor é crucial para o início da agregação plaquetária (induzida por ADP), de modo que a inibição

farmacológica ou deleção gênica deste receptor impossibilita iniciar a agregação plaquetária e alterar sua morfologia (HECHLER & GACHET, 2011). Além das plaquetas, este receptor está presente em células endoteliais, participando da migração celular das mesmas e em leucócitos, apresentando função na atividade fagocítica de macrófagos (SHEN & DiCORLETO, 2008; MARQUES-DA-SILVA *et al*, 2011). O receptor P2Y₁ (acoplado a proteína G_{aq}) exerce seu efeito principalmente pela ativação da enzima de membrana fosfolipase C-β (PLC β, *phospholipase C-β*) que atua sobre o fosfolípido de inositol (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato – PIP₂), gerando dois produtos: inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ ativa os receptores do sistema tubular denso, permitindo a liberação de cálcio para o citosol, aumentando assim a concentração de cálcio intracelular. Este aumento de cálcio é responsável por maior liberação do conteúdo dos grânulos plaquetários e por se ligar a calmodulina e assim rearranjar o citoesqueleto da plaqueta para a formação dos pseudópodes. O DAG ativa a proteína quinase C (PKC) que, subseqüentemente, promove liberação do conteúdo dos grânulos, além de ativar os receptores αIIbβ3, que em conjunto com o fibrinogênio promove a agregação plaquetária (VANNI *et al.*, 2007; BRASS & STALKER, 2008).

O receptor P2Y₁₂ também não é restrito às plaquetas, pode estar presente no cérebro, células da glia e possivelmente em células musculares lisas, participando da contração vascular. Este receptor é responsável por completar a agregação plaquetária induzida por ADP (iniciada pela ativação de P2Y₁) e também por outros agentes tais como: receptores de serotonina acoplados a proteína G_q, tromboxano acoplado a proteína G_q e G_{12/13} e receptores PAR-1 (receptor de trombina) ou quando as plaquetas são ativadas por colágeno através da via GPVI/PLCγ2. Deste modo, o receptor P2Y₁₂ participa na amplificação dos sinais intracelulares que ocorrem durante a agregação plaquetária. O receptor P2Y₁₂ está relacionado ainda com a inibição da atividade da adenilato ciclase (AC) através da ativação da proteína G_{ai2}, a qual é componente importante para via de sinalização para a ativação da integrina αIIbβ3, mas a inibição da AC não é suficiente para efetuar a agregação plaquetária e por esta razão, outras vias de sinalização são necessárias para a ativação da GP αIIbβ3 e subseqüente

agregação plaquetária. Uma importante via intracelular que regula a ativação desta integrina dependente de G_i que é realizada pela fosfoinositol-3-quinase (*phosphoinositide 3-kinase*, PI3K). A isoforma p110 γ da PI3K regula a ativação da integrina GP α IIb β 3 envolvendo a GTPase Rap1 e proteína quinase B (PKB)/Akt (LOVA *et al.*, 2003; BRASS & STALKER, 2008). O PI3K fosforila o PIP₂ para formar PIP₃ e como isto contribui para a ativação da GP α IIb β 3 e estabilização da agregação plaquetária ainda não está esclarecido (BRASS, 2010). Outra maneira pela qual o receptor P2Y₁₂ poderia contribuir para a modulação da agregação plaquetária seria através da proteína G_{ai2} envolver a inibição da proteína quinase dependente de AMPc (PKA), fosforilando a fosfoproteína estimulada por vasodilatador (vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP), proteína intracelular reguladora de actina, que modula negativamente a ativação da integrina α IIb β 3 (HECHLER & GACHET, 2011).

O colágeno atua via receptores GPVI e α 2 β 1, ativando a enzima fosfolipase C γ (PLC γ) por intermédio de uma proteína G_q, a qual hidrolisa o difosfato de fosfatidilinositol (PIP₂), que por sua vez forma o diacilglicerol (DAG) e o trifosfato de inositol (IP₃), promovendo a mobilização de cálcio intracelular via IP₃, assim como ativação da PKC e conseqüente liberação de agentes pró-agregantes dos grânulos plaquetários e ativação dos receptores α IIb β 3 (YIP *et al.*, 2005).

Ressalta-se, porém, que em situações fisiológicas o mais comum é o processo de agregação plaquetária ocorrer a partir da exposição ao colágeno, porém em situações patológicas a agregação se dá, principalmente, a partir da ativação da trombina e fvW, ambos encontrados circulantes no plasma na ocasião patológica (BRASS & STALKER, 2008).

As plaquetas são responsáveis por iniciar a hemostasia primária que culmina na formação de um tampão plaquetário instável. Assim que este tampão é formado, pequenas quantidades de trombina (fator II) são produzidas por células endoteliais e monócitos que expressam fator tecidual e interagem com as plaquetas e o complexo FVIII/fvW. A trombina desencadeia ativação máxima das plaquetas, auxiliando a exposição de receptores e sítios de ligação para cofatores da coagulação, assim como a ativação de alguns como os Fatores V e VIII na superfície plaquetária ativada. Conseqüentemente, a

trombina forma a fibrina através do fibrinogênio, resultando assim na formação de fibrina estável e conseqüente hemostasia secundária (HOFFMAN, 2003; BECKER, 2005). A Figura 4 seguir, representa de forma generalizada as possíveis cascatas bioquímicas responsáveis pela agregação plaquetária.

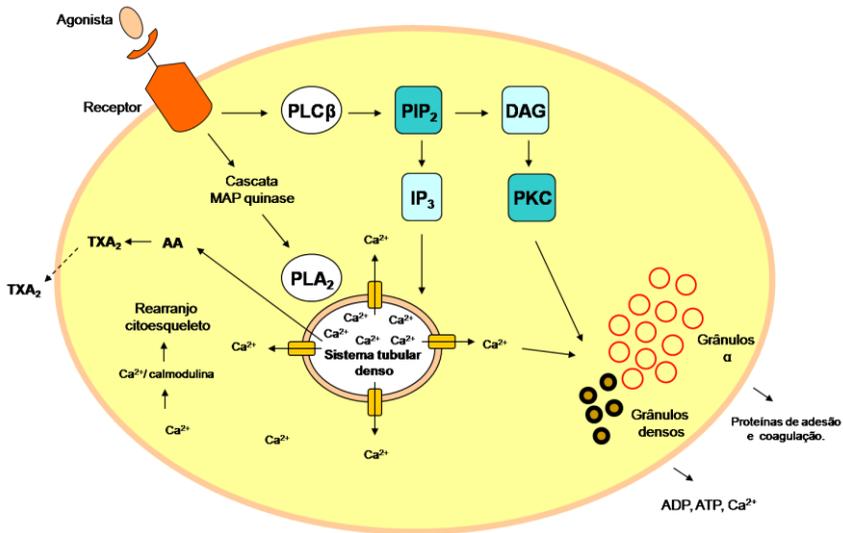


Figura 4. Cascata de ativação plaquetária. Os mecanismos de ativação plaquetária ocorrem primeiramente através da cascata de segundos mensageiros. Uma vez o agonista ligado ao seu receptor, a PLC hidrolisa o PIP₂, formando os segundos mensageiros IP₃ e DAG. O IP₃ se liga ao receptor na membrana do sistema tubular denso que armazena Ca²⁺, de modo a iniciar o efluxo de Ca²⁺ do sistema tubular denso para o citosol. O Ca²⁺ por si só atua como um segundo mensageiro, interagindo com a calmodulina e promovendo rearranjo do citoesqueleto da plaqueta. Quando o IP₃ se liga no sistema tubular denso e ocorre liberação de Ca²⁺, a PLA₂ libera AA da membrana no citosol e oxida-a a TxA₂ que então é liberado da plaqueta. O aumento da concentração citoplasmática de Ca²⁺ determina a liberação do conteúdo dos grânulos α e densos através do sistema canalicular aberto, os quais ativam plaquetas vizinhas. O DAG ativa a PKC que contribui para a liberação do conteúdo dos grânulos. O IP₃ e o DAG podem ativar plaquetas independentemente ou sinergicamente (Modificado de JIN *et al.*, 2005).

1.5 Inibição da agregação plaquetária

Como as plaquetas possuem a habilidade de serem rapidamente ativadas, são necessários mecanismos reguladores para evitar a agregação indiscriminada. A prostaciclina (PGI_2) e o NO são dois destes reguladores, ambos liberados pelo endotélio vascular (GOODMAN & GILMAN, 2006).

A PGI_2 e o TxA_2 são metabólitos do ácido araquidônico derivados das enzimas COX-1 e COX-2, conhecidos protagonistas na homeostasia plaquetária. O TxA_2 atua como potente agonista, ao passo que a PGI_2 age como um inibidor da agregação plaquetária. Já a outro metabólito do AA como a prostaglandina E_2 (PGE_2) pode variar a ação de acordo com a sua concentração, a qual, em baixas concentrações a PGE_2 aumenta a agregação plaquetária, porém em altas concentrações, a agregação é inibida (FABRE *et al.*, 2001). Além de inibir a agregação plaquetária, a PGI_2 é capaz de desagregar os aglomerados já formados no endotélio (YANG *et al.*, 2002).

Além da PGI_2 e PGE_2 (em altas concentrações), existem outras substâncias que inibem a agregação como o NO, adenosina monofosfato (AMP) e o ativador de plasminogênio tecidual (TPA), entre outros. A concentração de PGI_2 presente no plasma não é suficiente para afetar a função plaquetária, porém quando em associação com o NO, o efeito anti-agregante plaquetário provocado por estes dois compostos é sinérgico (RADOMSKI & MONCADA, 1991). Assim que ocorre a ocupação da PGI_2 no seu respectivo receptor IP (acoplado a proteína G_s), há estimulação da adenilato ciclase, a qual catalisa a formação de AMPc, que por sua vez, ativa a proteína quinase dependente de AMPc (PKA). O AMPc ativa a proteína quinase A (PKA) que fosforila proteínas alvo como: i) a porção $\text{G}\alpha_{13}$ que acopla no receptor do TxA_2 ; ii) o receptor $\text{GPIIb}\beta$ interferindo na ligação do fvW com o seu receptor e iii) o receptor IP_3 que retém a mobilização de Ca^{2+} intracelular induzida por agonista (metabolismo de PLC e PLA_2 são também diminuídas) (GOODMAN & GILMAN, 2006; COLLIER *et al.*, 2010). Sendo assim, a PGI_2 é capaz de interferir em várias etapas da ativação da cascata metabólica do ácido araquidônico, exercendo de modo geral, um controle na agregação plaquetária (MONCADA *et al.*, 1990).

O NO ativa a enzima guanilato ciclase solúvel que converte a molécula GTP em GMPc que, entre outros efeitos, inibe a AMPc fosfodiesterase (MAURICE & HASLAM, 1990) permitindo assim menor degradação de AMPc no citosol e favorecendo ainda mais a inibição plaquetária.

O NO atua de diversas maneiras sobre a inibição da agregação plaquetária, agindo desde a mobilização de cálcio até a inibição de receptores plaquetários. O aumento da concentração de GMPc pelo NO promove redução da concentração de cálcio intracelular através da inibição do receptor que permite a liberação de cálcio do sistema tubular denso, do aumento da taxa de extrusão de cálcio para o meio extracelular e da diminuição da entrada de cálcio na plaqueta. A proteína transmembrana Ca^{2+} -ATPase, presente na membrana do sistema tubular denso, é responsável por captar o cálcio do citosol e estocar no sistema tubular denso. A atividade do Ca^{2+} -ATPase presente na membrana do sistema tubular denso é aumentada pelo NO, deste modo, aumentando a captação de Ca^{2+} para este sistema e diminuindo a concentração de Ca^{2+} intracelular necessária para a realização da agregação plaquetária (JIN *et al.*, 2005).

O GMPc mediado pela GCs também ativa a proteína quinase G (PKG), a qual é responsável pela fosforilação do receptor do TxA_2 . Esta fosforilação impede a ativação do receptor TxA_2 acoplado a proteína G_q , não permitindo a ligação do receptor ao sítio de ligação GTP da sua subunidade α . A consequência deste processo é a inibição da ativação da via efetora, ou seja, da enzima fosfolipase C que impede a mobilização de Ca^{2+} , e decorrente não ativação celular (agregação plaquetária) (WANG *et al.*, 1998).

Além do receptor de TxA_2 , outras proteínas na superfície da plaqueta são afetadas pelo NO, como o receptor de fibrinogênio e a selectina-P. O fibrinogênio se liga a proteína integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ na membrana da plaqueta. Esta é mais uma maneira da plaqueta ser ativada e o NO também influencia nesta via de ativação plaquetária. O NO é responsável pelo aumento da constante de dissociação (Kd) deste receptor $\alpha\text{IIb}\beta_3$ com o seu ligante fibrinogênio, além de diminuir o número destas integrinas na membrana (MENDELSON *et al.*, 1990). A selectina-P exerce importante função pró-inflamatória participando da interação entre neutrófilos, endotélio vascular e plaquetas. Esta molécula

de adesão é armazenada nos grânulos α das plaquetas e assim que as plaquetas são ativadas, tal molécula é translocada dos grânulos α para a superfície celular (McEVER *et al.*, 1998). Estudos mostraram que o aumento da síntese de NO diminui a expressão de selectina-P e a administração de doadores de NO inibem a sua expressão (GRIESS *et al.*, 1998) .

O aumento das concentrações tanto de AMPc quanto de GMPc, permitem que a PKA e PKG possam fosforilar a proteína de adesão VASP (*vasodilator-stimulator phosphoprotein*), inibindo diretamente a mobilização de Ca^{2+} e liberação do conteúdo granular. A VASP fosforilada modula os filamentos de actina e reorganiza a estrutura da membrana filamentosa que forma a interface entre o citoesqueleto plaquetário e a matriz extracelular, além de inativar o receptor do fibrinogênio (RAIESDANA & LOSCALZO, 2008).

Em resumo, o NO interfere na agregação plaquetária através da mobilização de cálcio, liberação de conteúdo dos grânulos α e densos, conformação do citoesqueleto, receptores plaquetários e expressão de molécula de adesão. A Figura 5 ilustra os principais meios em que o NO pode interferir na agregação plaquetária

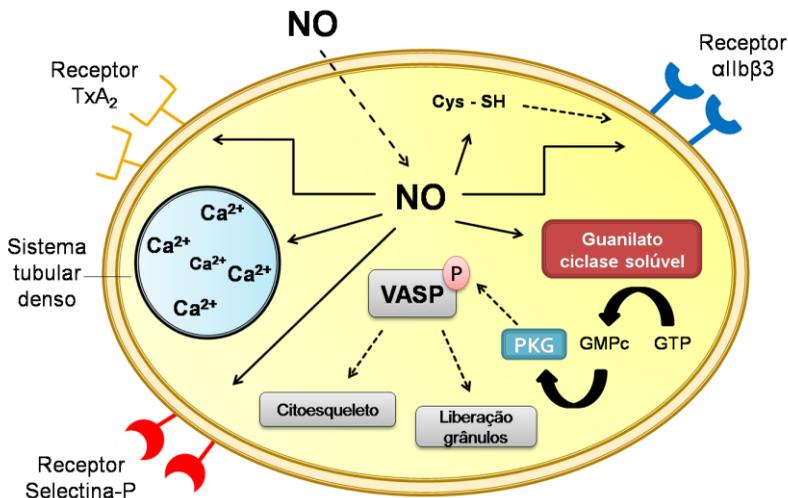


Figura 5. Mecanismos de ação do NO na plaqueta. O NO pode atuar via ativação clássica da GCs; ativação do canal Cálcio-ATPase; fosforilação do receptor TxA_2 e aumento da K_d do receptor $\alpha 1\text{b}\beta 3$; formar grupos tióis que possam nitrosilar proteínas; diminuir a expressão do receptor de selectina-P, entre outros.

1.6 Plaquetas, NO e sepse

A principal função das plaquetas é cessar algum sangramento através da formação de um tampão plaquetário no endotélio lesado. Entretanto, as plaquetas possuem um papel crucial na formação de trombos patológicos que estão associados ao desenvolvimento de acidentes vasculares cerebrais, infartos agudos do miocárdio e da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO). Além disso, as plaquetas estão envolvidas em vários processos patológicos e fisiológicos como inflamação, defesa antimicrobiana, regulação imunológica, crescimento tumoral e metástases (IKEDA *et al.*, 2008).

Além da adesão plaquetária ao endotélio decorrente da exposição subendotelial de colágeno e pelo estresse de cisalhamento, plaquetas podem sofrer ativação e se aderirem ao endotélio ativado devido a um estado inflamatório sistêmico (síndrome de resposta inflamatória sistêmica). Esta adesão é coordenada em um processo que envolve ligação, rolamento e

adesão firme desta plaqueta à parede vascular. Esse processo envolve a interação de selectinas e integrinas entre plaqueta e endotélio, sendo que o contato inicial entre o endotélio intacto e ativado acontece através das selectinas (expressa em plaquetas e na célula endotelial). A selectina-P (CD62P) é expressa na superfície das células endoteliais em resposta a um estímulo inflamatório através da translocação da membrana dos corpos Weibel-Palade (estoque das selectinas-P nas células endoteliais) para a membrana plasmática, e pode se ligar ao complexo GPIb e/ou receptor para selectina-P (P-selectin glucoprotein ligand-1 - PSGL-1) presentes nas plaquetas (RAIESDANA & LOSCALZO, 2008).

As plaquetas participam do processo inflamatório, aumentando a expressão da proteína de adesão selectina-P, a qual pode se ligar aos monócitos e linfócitos. A expressão de selectina-P pode estar associada também com o aumento da expressão de fator tecidual em monócitos. Assim, o aumento da expressão da selectina-P em conjunto com o aumento da expressão do fator tecidual favorece a agregação plaquetária e coagulação sanguínea durante a inflamação. A liberação de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento pode ser outra alternativa para a ativação da inflamação e coagulação (LEVI, 2005).

Disfunções na agregação e coagulação são comuns em síndromes inflamatórias sistêmicas e infecções, onde é comum a presença de eventos pró e antitrombóticos. Estudos em seres humanos revelaram, através de autopsias de pacientes sépticos, sítios de necrose tecidual hemorrágica, assim como microtrombos em pequenos vasos, médias e grandes veias e artérias em vários órgãos, provavelmente resultado da necrose isquêmica (LEVI, 2008). Além de a função plaquetária ser afetada durante a sepse, o seu número também pode estar relacionado com a mortalidade da doença. Pacientes com trombocitopenia permanecem durante períodos maiores nas unidades de terapia intensiva e apresentam maior mortalidade. A causa da baixa contagem de plaquetas pode ser devido a hemorragias ou coagulação intravascular disseminada durante a sepse (VINCENT *et al.*, 2002).

Estímulos inflamatórios como citocinas e lipopolissacarídeo (LPS – componente presente na parede celular das bactérias gram-negativas) induzem a expressão da NOS II em várias

células e tecidos. O aumento da atividade desta enzima contribui para os efeitos de vasodilatação profunda presente no choque séptico que é provocada pelo excesso de NO circulante (MONCADA & HIGGS, 2006). O uso de modelos experimentais com injeção de LPS demonstra aumento da concentração de NO circulante devido ao aumento da expressão da NOS II e diminuição do número de plaquetas e leucócitos (VICTOR *et al.*, 2005). As plaquetas expressam receptores Toll-like (TLR) que se ligam ao LPS. Em seguida, as plaquetas podem produzir trombocidinas que são fatais para as bactérias ou pode promover agregados em torno delas para então serem eliminadas por fagócitos (ZHANG *et al.*, 2009).

Os dados na literatura referentes à agregação plaquetária através da injeção de LPS são divergentes. Lopes-Pires e colaboradores (2011) apresentaram resultados demonstrando inibição da agregação plaquetária com o tratamento com LPS, enquanto outros autores demonstraram estimulação da agregação plaquetária com a injeção de LPS em ratos (ZHANG *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho objetiva estudar a agregação plaquetária com diferentes doadores de óxido nítrico.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil da agregação plaquetária com os agonista ADP e colágeno;
- Avaliar o efeito inibitório dos doadores de NO (GTN e GSNO) sobre a agregação plaquetária;
- Verificar a participação da enzima guanilato ciclase solúvel sobre a agregação plaquetária inibida com doadores de NO;
- Avaliar o tempo de efeito do óxido nítrico na inibição da agregação plaquetária;
- Estudar o efeito do tratamento com LPS sobre a agregação plaquetária.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas com 3 a 3,5 meses de idade e peso entre 200 e 220 g ou ratos Wistar machos com 3 meses de idade e peso entre 300 e 320 g (ensaios com LPS), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12/12 h; luzes ligadas às 7 h) controlados automaticamente, bem como tiveram livre acesso à alimentação e água durante todo o curso do experimento. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFSC) sob o protocolo PP00595.

3.2 Obtenção de plasma rico em plaquetas

Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 mg/Kg e 20 mg/Kg i.p., respectivamente). Uma vez estabelecido o plano anestésico desejado, os animais foram submetidos a laparotomia seguido de frenotomia, para a realização da coleta de sangue via punção cardíaca (ventrículo direito). Foram coletados 5 mL de sangue de cada animal, utilizando-se seringas plásticas contendo citrato de sódio 3,1% como anticoagulante, na proporção 9:1 (sangue:anticoagulante). Após a coleta, o sangue citratado foi transferido para tubos plásticos e centrifugado durante 15 minutos (temperatura ambiente) para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). A velocidade da centrifugação do sangue total foi padronizada de modo a obter o maior número de plaquetas no PRP. A Figura 6 apresenta as velocidades testadas, sendo que a velocidade escolhida em todos os ensaios foi de 100 x g.

Cerca de 1,5 mL de PRP foram cuidadosamente coletados com o auxílio de uma pipeta Pasteur plástica e transferido para tubos plásticos de 2 mL (BORN & CROSS, 1963) para evitar a ativação plaquetária. Como diluente do PRP, utilizou-se plasma pobre em plaquetas autólogo (PPP), obtido através da centrifugação de sangue total a 900 x g durante 10 minutos. O plasma pobre em plaquetas foi empregado como diluente do PRP para ajustar o volume final do PRP a ser usado

nos ensaios (BEDNAR *et al.*, 1995; WALKOWIAK *et al.*, 1997; TOMASIAK *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006).

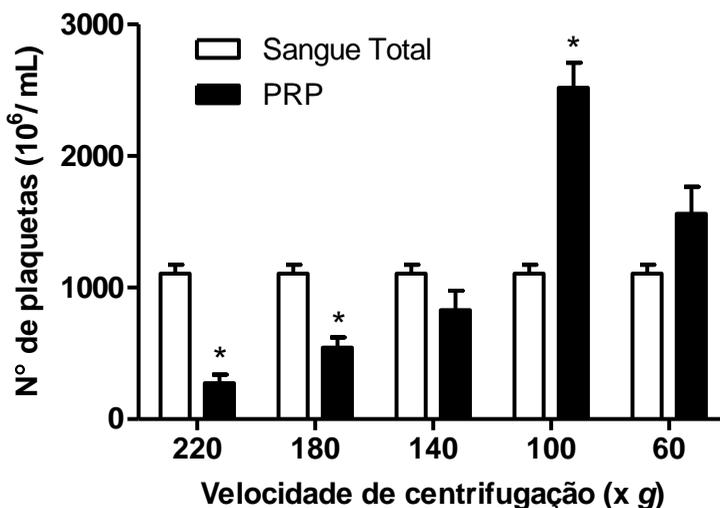


Figura 6. Padronização da velocidade de centrifugação do sangue total para obtenção do plasma rico em plaquetas. O sangue foi aliquoteado em diferentes tubos, os quais foram centrifugados em diferentes velocidades. A contagem de plaquetas do sangue total, assim como do PRP, foi realizado no contador hematológico automático. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, $n=4$. * $p < 0,05$ em relação ao sangue total (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

3.3 Contagem de plaquetas

A contagem de plaquetas foi realizada em contador hematológico Horiba Abx Micros 60, Shandong, China. O contador hematológico foi previamente calibrado para a diferenciação celular (incluindo plaquetas) dos ratos utilizados neste estudo. Para tal calibração, a contagem manual de plaquetas (método de Brecher) foi realizada na câmara de Neubauer (BRECHER & CRONKITE, 1950). Para a realização dos ensaios de agregação plaquetária, foi necessário estabelecer o número de plaquetas a ser utilizado (em cada poço) nos

ensaios, uma vez que os protocolos experimentais presentes na literatura variam muito em relação ao número de plaquetas utilizados. Sendo assim, uma curva com diferentes volumes de plaquetas foi efetuada a fim de responder qual quantidade seria a mais adequada em nossos experimentos. O número de plaquetas escolhido para os ensaios foi de 200×10^6 plaquetas por poço (Figura 7).

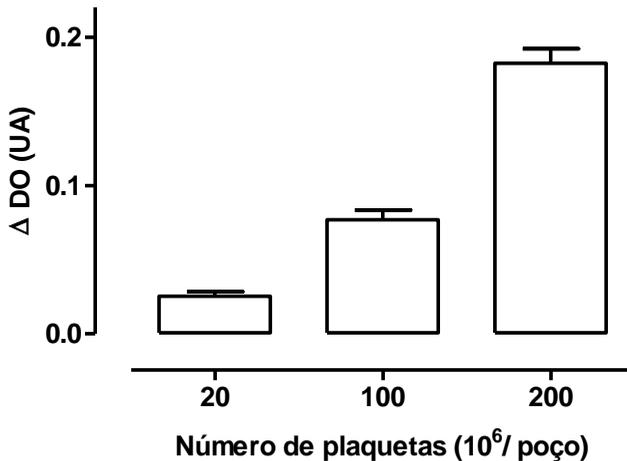


Figura 7. Padronização do número de plaquetas a ser utilizado nos ensaios de agregação plaquetária. Após obtenção do PRP, uma determinada quantidade de plaquetas foi adicionada ao poço, o volume completado com plasma autólogo e a agregação induzida com ADP $5 \mu\text{M}$ e comprimento de onda de 650 nm (DO – densidade ótica; UA - unidades arbitrárias), $n=4$.

3.4 Ensaio de agregação plaquetária

Os ensaios de agregação plaquetária foram realizados em um leitor de placas Infinite M200 (Tecan, Suíça) em placas de 96 poços. O comprimento de onda adotado nos ensaios de agregação plaquetária foi 650 nm . O tempo de agitação da placa foi padronizado em 10 segundos antes do início do ensaio com amplitude de 2 mm (174 rpm) e 3 segundos antes de cada leitura com amplitude de 1 mm (114 rpm) (FRATANTONI *et al.*, 1990; KRAUSE *et al.*, 2001), sempre a uma temperatura de 37°C .

O resultado inicial da leitura (densidade ótica) da agregação plaquetária pelo método de ensaio com leitor de placas representa plaquetas que estão em suspensão, ou seja, plaquetas não ativadas. Quando há a ativação plaquetária o valor da densidade ótica diminui, pois, as plaquetas estão agregando-se e permitindo deste modo a passagem de maior quantidade de luz incidente. Portanto, a diferença entre os valores da densidade ótica na condição basal e a menor registrada representa quantitativamente a intensidade da agregação plaquetária. A unidade adotada, por conseguinte foi de delta DO (Δ DO), representando (densidade ótica inicial - densidade ótica final). A Figura 8 mostra um registro típico de agregação plaquetária induzida por ADP ou colágeno usando este protocolo.

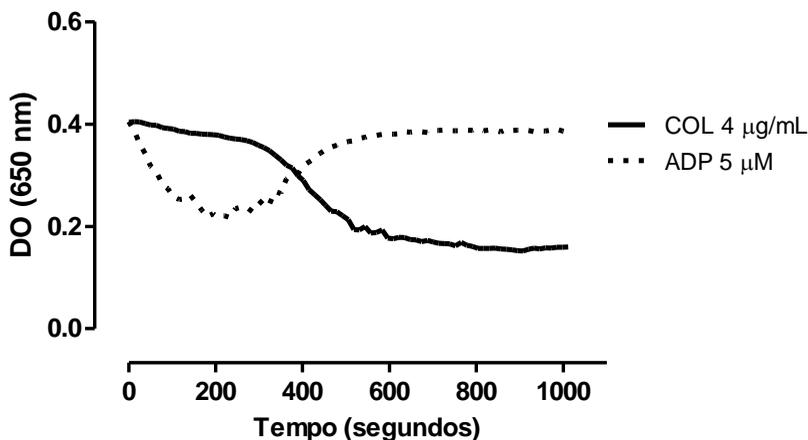


Figura 8. Registro típico de agregação plaquetária realizada no leitor de placas. O PRP foi obtido (200×10^6 plaquetas/ poço) e a agregação plaquetária induzida por ADP 5 μ M e COL 4 μ g/mL durante 1000 segundos (aproximadamente 15 minutos). O comprimento de onda utilizado foi de 650 nm.

Após o término da cinética de agregação plaquetária, os arquivos com dados brutos foram coletados do software Magellan versão 6.4 do leitor de placas Infinite M200 e convertidos em formato apropriado (arquivos Excel) para serem tabulados e analisados no programa GraphPad Prism 5.

3.4.1 Protocolos de agregação plaquetária

3.4.1.1 Agregação plaquetária sem substituição de plasma autólogo]

De modo geral, os ensaios de agregação plaquetária sem substituição de plasma autólogo obedeceram pelo menos um dos passos descritos abaixo. As amostras foram incubadas a 37°C em todos os ensaios:

Passo 1: As plaquetas foram incubadas com inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel durante o período de 15 ou 30 minutos;

Passo 2: As plaquetas foram incubadas com doador de NO (GTN ou GSNO) durante 15 ou 60 minutos;

Passo 3: A agregação plaquetária foi induzida com ADP ou COL.

3.4.1.2 Agregação plaquetária com substituição de plasma autólogo

Neste protocolo, os ensaios de agregação plaquetária obedeceram os seguintes passos:

Passo 1: As plaquetas foram incubadas com doador de NO (GTN ou GSNO) durante 60 minutos;

Passo 2: As plaquetas foram centrifugadas (10 min., 900 x g) para obtenção do *pellet*;

Passo 3: O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi resuspenso em plasma autólogo livre de células;

Passo 4: A agregação plaquetária foi induzida por ADP ou COL, imediatamente ou até 3 horas após incubação, sendo que as plaquetas permaneceram a 37°C até o momento da agregação.

3.5 Indutores da agregação plaquetária

Os ensaios de agregação plaquetária foram realizados com os agonistas difosfato de adenosina (ADP) e colágeno (COL). A solução estoque de ADP (30 mM) foi diluída em tampão fosfato (PBS em mM: NaCl 137, KCl 2,7, KH₂PO₄ 1,5 e NaH₂PO₄

10,8 ajustada para pH 7,4), alíquotada e armazenada a -20° C. As alíquotas da solução estoque foram diluídas no momento do experimento. Para os ensaios de agregação plaquetária com colágeno tipo I, o material (2 mg/mL) foi macerado em ácido acético 10 mM seguido de centrifugação (3 min, 500 x g). O sobrenadante foi armazenado em geladeira.

3.5.1 Agregação plaquetária induzida ADP e colágeno

Os ensaios de concentração-resposta de agregação plaquetária seguiram a seguinte ordem: os agonistas (ADP ou COL) foram pipetados na placa de 96 poços, e em seguida, o PRP (200×10^6 plaquetas por poço) diluído em PPP, foi adicionado com pipeta automática multicanal para um volume final de 150 μ L. A partir dos resultados obtidos na curva concentração-resposta de ADP (1, 2,5, 5, 10 e 20 μ M), foi escolhida a concentração de 5 μ M para os demais ensaios. A partir dos resultados obtidos na curva concentração-resposta de COL (1, 2, 4, 8 e 12 μ g/ mL), foi escolhida a concentração de 4 μ g/ mL para os demais ensaios.

3.6 Inibição da enzima guanilato ciclase solúvel

Com o objetivo de inibir a enzima guanilato ciclase solúvel nas plaquetas foi utilizado o inibidor seletivo ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxaline-1]). O protocolo adotado para este ensaio foi descrito no item 3.4.1, no qual seguiu todos os passos. O doador de NO utilizado neste ensaio foi o GTN 1 mM e o indutor de agregação plaquetária foi o ADP 5 μ M.

3.7 Doadores de óxido nítrico

Os doadores de NO utilizados neste trabalho foram trinitrato de glicerila e nitroso glutationa. Ambas as soluções foram em PBS.

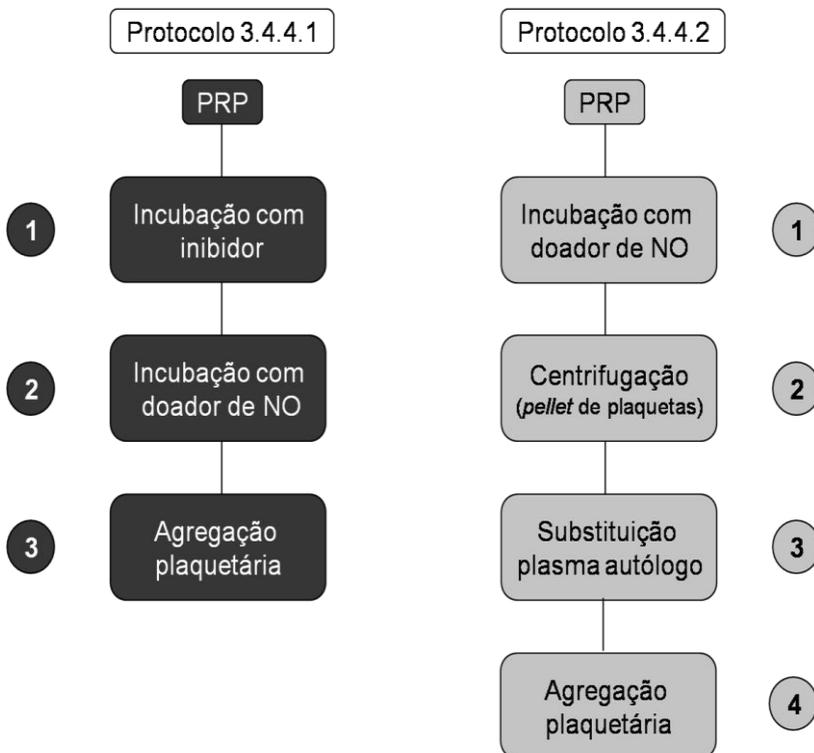
3.7.1.1 Avaliação do efeito de doadores de NO

As plaquetas foram incubadas com GTN ou GSNO a 37°C durante 15 ou 60 minutos e após a incubação, a agregação plaquetária foi induzida com ADP 5 μ M ou COL 4 μ g/ mL de acordo com o protocolo 3.4.4.1 (passos 2 e 3). Foram utilizadas as seguintes concentrações de doadores de NO: 30, 100, 300 e 1000 μ M.

3.7.2 Avaliação do efeito de doadores de NO pós-substituição de plasma autólogo

Para verificar se havia efeito dos doadores de NO na agregação plaquetária após substituição de plasma autólogo (doador de NO ausente do plasma), as plaquetas passaram por todos os passos do protocolo 3.4.4.2. Primeiramente, foi realizado o ensaio com e sem substituição do plasma autólogo para verificar se haveria diferença entre eles na agregação. Depois deste ensaio, outro experimento foi desenhado para averiguar se o efeito do NO persistia por tempo prolongado. Inicialmente o plasma rico em plaquetas foi incubado com o doador de NO por um período 60 minutos, seguido da substituição do plasma. Os ensaios de agregação foram induzidos por ADP 5 μ M.e ocorreram 0, 1 e 2 horas após a substituição plasmática.

O fluxograma a seguir ilustra os protocolos citados acima (3.4.1.1 e 3.4.1.2).



3.8 Agregação plaquetária na sepse experimental induzida por LPS

Com base nas alterações da agregação plaquetária promovida pelo NO (proveniente dos doadores de NO) e pela possível conexão da participação da enzima guanilato ciclase solúvel no efeito antiagregante plaquetário do NO, decidiu-se verificar como estaria a agregação plaquetária durante a sepse experimental induzida por LPS. Uma vez que a injeção de LPS interfere na ativação e expressão desta enzima (FERNANDES, 2006) além de aumentar os níveis de GMPc (WALTER & GAMBARYAM, 2009). O choque endotoxêmico foi induzido através da injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) de

membrana de *Escherichia coli* dissolvido em PBS, na dose de 10 mg/kg. Os animais controle foram tratados apenas com PBS (1,0 ml/kg; i.p.)

3.9 Compostos e reagentes utilizados

As seguintes substâncias foram utilizadas neste estudo: ADP, colágeno, ODQ, LPS (Sigma Chemical Company, Missouri, USA); cetamina e xilazina (Syntec, São Paulo, Brasil). O GTN foi gentilmente doada pela indústria farmacêutica Cristália (São Paulo, Brasil). O restante dos sais e compostos foi adquirido de companhias com aprovada certificação de qualidade. Os sais e reagentes utilizados nos ensaios e tratamento de animais foram dissolvidos em água destilada, com exceção do ODQ (diluído em DMSO) e do colágeno (diluído em ácido acético).

3.10 Análises dos resultados e testes estatísticos

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). A análise estatística foi realizada pela análise de variância de uma via ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls ou duas vias seguida por pos-hoc de Bonferroni. Em alguns grupos foi aplicado o teste *t* de Student para amostras comparações entre duas amostras. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

A análise dos testes estatísticos foram realizados com o programa GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da agregação plaquetária induzida por ADP e colágeno (COL)

A Figura 9 mostra o perfil das curvas concentração-resposta de ADP e colágeno. Com base nestas curvas, optamos por usar as concentrações de 5 μM de ADP e 4 $\mu\text{g/mL}$ de colágeno para os demais experimentos. A razão da escolha destas doses foi o fato de serem quase ou maximais e possuírem Δ DO equivalentes.

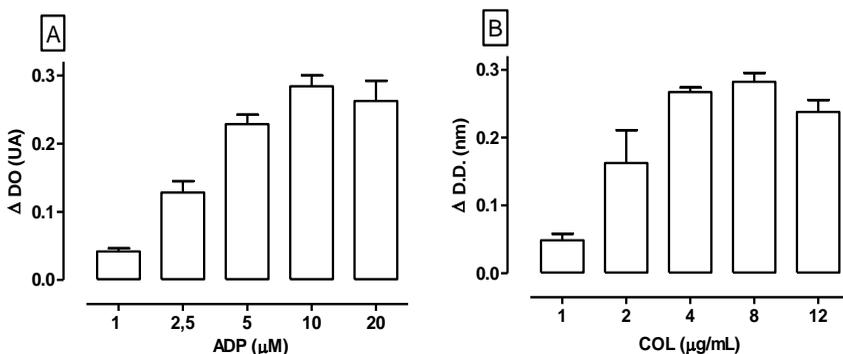


Figura 9. Avaliação da agregação plaquetária induzida por ADP e colágeno. Os agonistas (A - ADP ou B - colágeno; COL) foram adicionados na placa, e em seguida, o PRP (200×10^9 plaquetas por poço) foi adicionado. O volume final da reação foi de 150 μL . Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, $n=6$.

4.2. Inibição da agregação plaquetária induzida por trinitrato de glicerila (GTN)

A Figura 10 mostra os resultados das curvas concentração-resposta de GTN incubado por 15 (Painel A) ou 60 minutos (Painel B) com o doador de NO sobre o efeito agregante do ADP. O doador de NO mostrou um importante efeito inibitório na agregação plaquetária em todas as concentrações acima de 300 μM . Já o fator tempo não pareceu ser um determinante importante para o efeito do GTN.

A Figura 11 mostra as curvas concentração-resposta com colágeno. Essencialmente o mesmo padrão foi verificado, como também a independência do tempo de incubação.

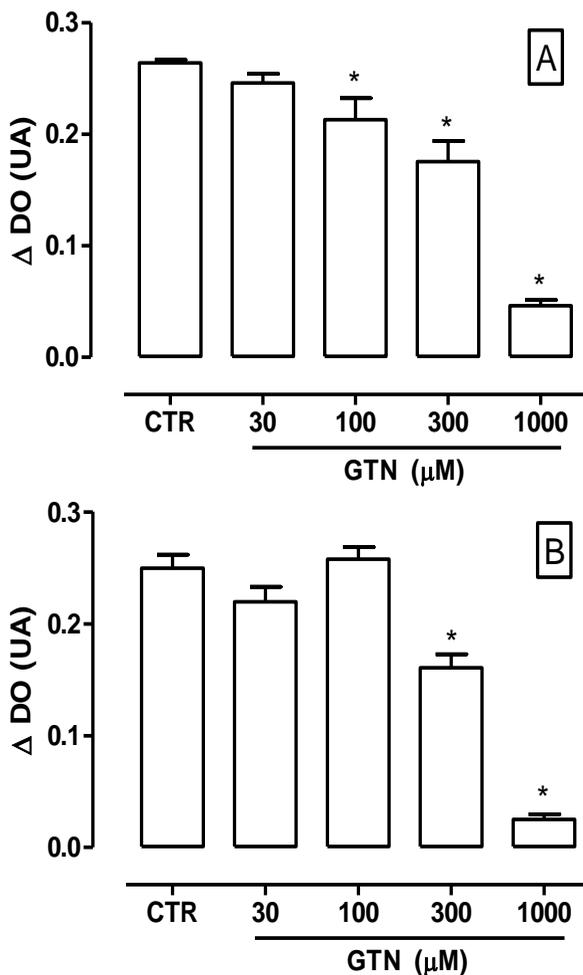


Figura 10. Efeito inibitório de trinitrato de glicerila (GTN) na agregação plaquetária induzida por ADP. O PRP foi incubado com GTN (30, 100, 300 e 1000 μM) a 37°C durante 15 minutos (Painel A) e 60 minutos (Painel B). O número de plaquetas foi de 200×10^6 . O agente agregante utilizado foi ADP (5 μM) e o protocolo de incubação é o mesmo que citado no item 3.4.1 (sem substituição de plasma autólogo). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média,

n= 4. * p < 0,05, em relação ao controle (CTR) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls).

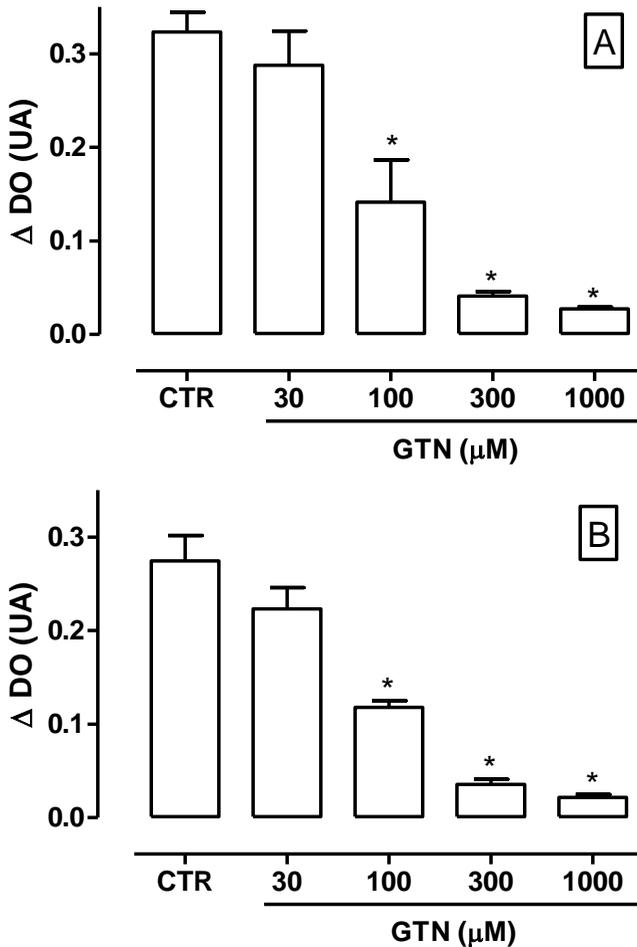


Figura 11. Efeito inibitório de trinitrato de glicerila (GTN) na agregação plaquetária induzida por colágeno. O PRP foi incubado com GTN (30, 100, 300 e 1000 μM) a 37°C durante 15 minutos (Painel A) e 60 minutos (Painel B). O número de plaquetas foi de 200×10^6 . O agente agregante utilizado foi colágeno (4 $\mu g/mL$) e o protocolo de incubação é o mesmo que citado no item 3.4.1 (sem substituição de plasma autólogo). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, n= 4. * p < 0,05, em relação ao controle (CTR) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls).

4.3 Inibição da agregação plaquetária induzida por s-nitrosoglutationa (GSNO)

A Figura 12 mostra o resultado dos experimentos para avaliação do efeito do doador de NO, o nitrosotiol GSNO. Todas as concentrações de GSNO se mostraram efetivas já com 15 minutos de incubação. Como pode ser visto, não há uma clara dependência da dose para o efeito anti-agregante do GSNO para nenhum dos indutores de agregação plaquetária. Não foi feito o experimento com incubação por 60 minutos com GSNO.

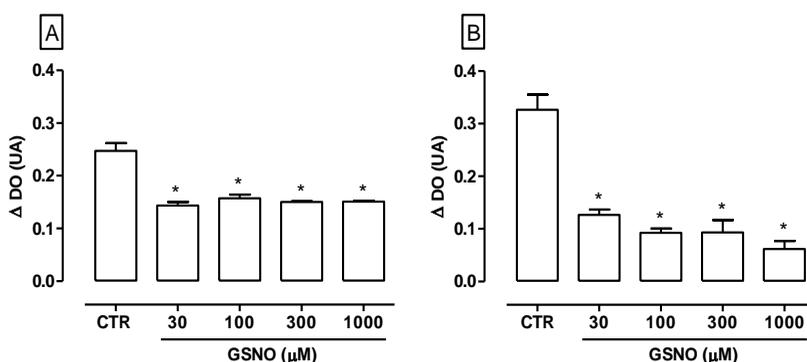


Figura 12. Efeito inibitório da S-nitrosoglutationa (GSNO) na agregação plaquetária induzida por ADP (Painel A) e por colágeno (Painel B). O PRP foi incubado com GSNO nas concentrações indicadas a 37°C durante 15 minutos. O número de plaquetas foi de 200×10^6 . O agente agregante utilizado foi ADP (5 µM) e colágeno (4 µg/mL). O protocolo de incubação é o mesmo que citado no item 3.4.1 (sem substituição de plasma autólogo). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, $n = 4$. * $p < 0,05$, em relação ao controle (CTR) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls).

4.4 Inibição da enzima guanilato ciclase solúvel no efeito do GTN

Para avaliar se o efeito antiagregante plaquetário do GTN seria dependente da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), utilizou-se o ODQ, um inibidor seletivo desta enzima. A Figura 13 ilustra o efeito do ODQ em períodos distintos de incubação (15 e 30

minutos), evidenciando que o efeito do ODQ é tempo-dependente pois com 30 minutos de incubação foi possível observar a reversão da agregação plaquetária provocada pelo GTN (300 μM).

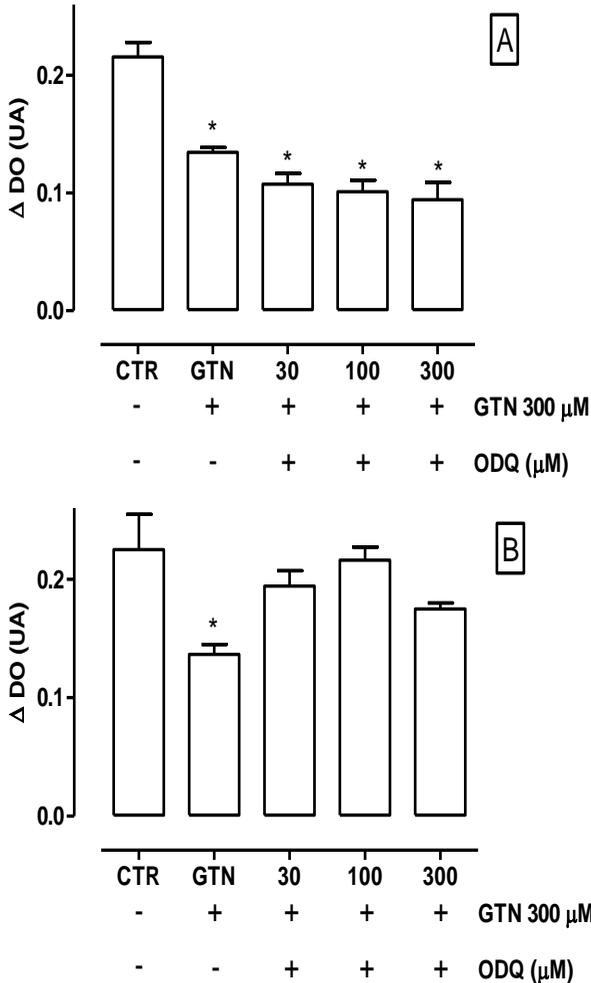


Figura 13. . Efeito do ODQ, um inibidor da guanilato ciclase solúvel, na inibição da agregação plaquetária induzida por GTN. O PRP foi incubado com ODQ (30, 100, 300) a 37°C durante 15 minutos (painel A) e 30 minutos (painel B). Em seguida, foi adicionado GTN 300 μM e a incubação prosseguiu por mais 15 minutos. O agente agregante

utilizado foi ADP (5 μ M). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, n= 4. * p < 0,05, em relação ao controle (CTR) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls).

4.5 Efeito dos doadores de NO com substituição por plasma autólogo

Até agora os experimentos foram feitos adicionando-se os doadores de NO e, após os determinados tempos de incubação, os indutores de agregação. Em outras palavras, os doadores de NO estavam presentes durante todo o período e durante o processo de indução da agregação.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que o efeito do NO sobre a funcionalidade vascular *in vitro* persiste mesmo com a retirada do NO do sistema (TERLUK *et al.*, 2000). Os experimentos mostrados na Figura 14 indicam que o efeito inibitório dos dois doadores de NO persiste mesmo após a sua remoção e substituição do plasma por plasma fresco autólogo. Estes experimentos mostraram que a incubação com doadores de NO induz uma inibição da agregação plaquetária que persiste mesmo após a remoção do doador de NO.

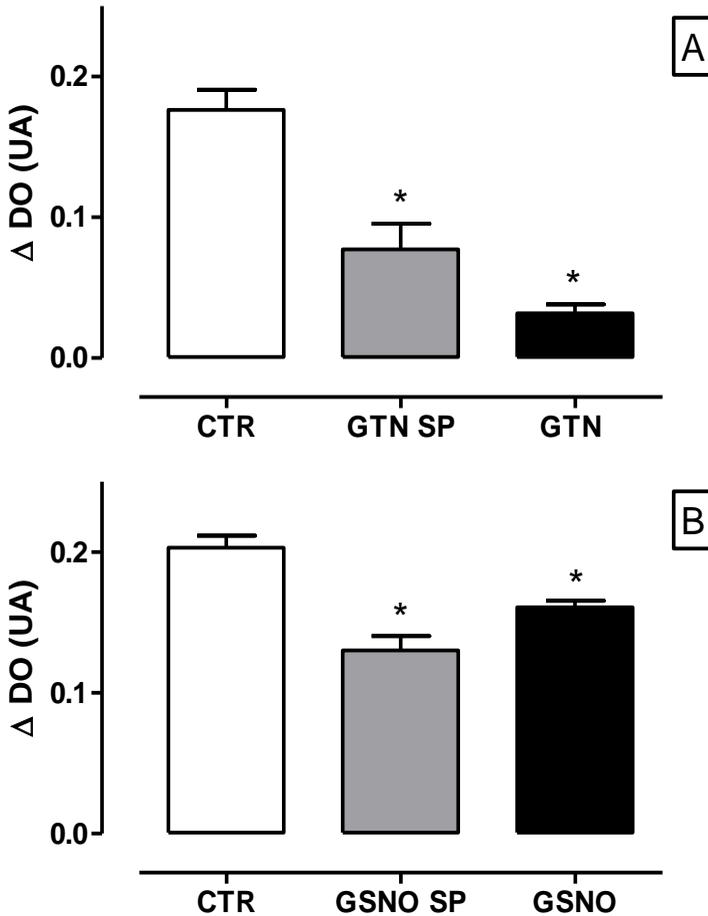


Figura 14. Efeito da remoção de doadores de NO sobre a inibição da agregação plaquetária. As amostras de PRP foram incubadas com os doadores de NO (1 mM) a 37°C durante 60 minutos (A – GTN; B - GSNO). Parte destas amostras foi centrifugada por 10 minutos a 900 x g, sendo o *pellet* de plaquetas ressuspensado em plasma fresco autólogo (grupos SP). O grupo controle (CTR) foi incubado com PBS e seu plasma também foi substituído com plasma autólogo. Para promover a agregação plaquetária, foi utilizado o agente agregante ADP (5 μ M). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, n= 4. * $p < 0,05$, em relação ao controle (CTR) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls).

4.6 Avaliação da duração do efeito inibitório de longa duração do trinitrato de glicerila (GTN)

Na sequência do experimento descrito no item anterior, foi interessante avaliar se o efeito inibitório do GTN persistia após sua remoção física. A Figura 15 mostra que o efeito de inibição da agregação persistiu por várias horas após sua remoção.

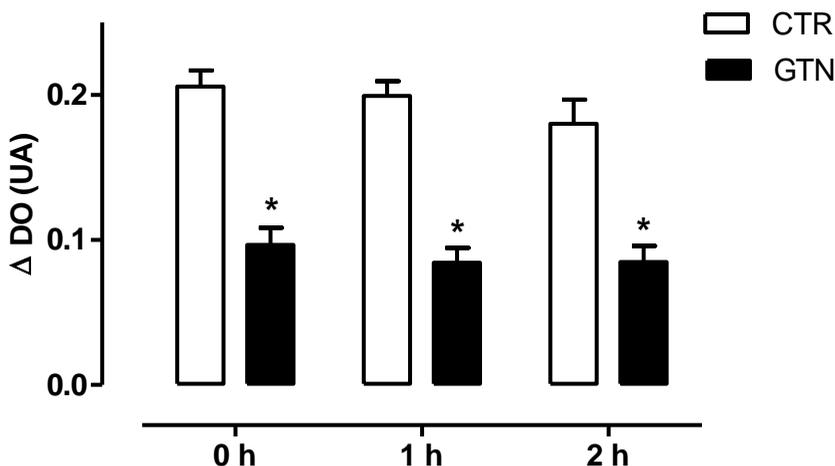


Figura 15. Curso temporal do efeito inibitório do GTN na agregação plaquetária. As amostras de PRP foram incubadas com GTN (1 mM) a 37°C durante 60 minutos. Parte das amostras foram centrifugadas a 900 x g, sendo o *pellet* de plaquetas ressuspenso em plasma fresco autólogo. A agregação plaquetária foi realizada 1, 2 e 3 horas após a incubação. O grupo controle (CTR) foi incubado com PBS e seu plasma também foi substituído com plasma autólogo. A agregação plaquetária foi promovida pelo agente agregante ADP (5 μM). As amostras permaneceram a 37°C até o momento do ensaio. Os resultados representam a média ± erro padrão da média, n= 5. * p < 0,05, em relação ao controle (CTR) (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

4.7 Agregação plaquetária na sepse experimental induzida por LPS

Para avaliar se uma endotoxemia afetaria a agregação plaquetária, decidiu-se realizar o ensaio de agregação em ratos injetados com LPS (10 mg/Kg; i.p.). Observou-se diminuição da agregação plaquetária em todas as concentrações de ADP utilizados no ensaio 3 horas depois da injeção de LPS.

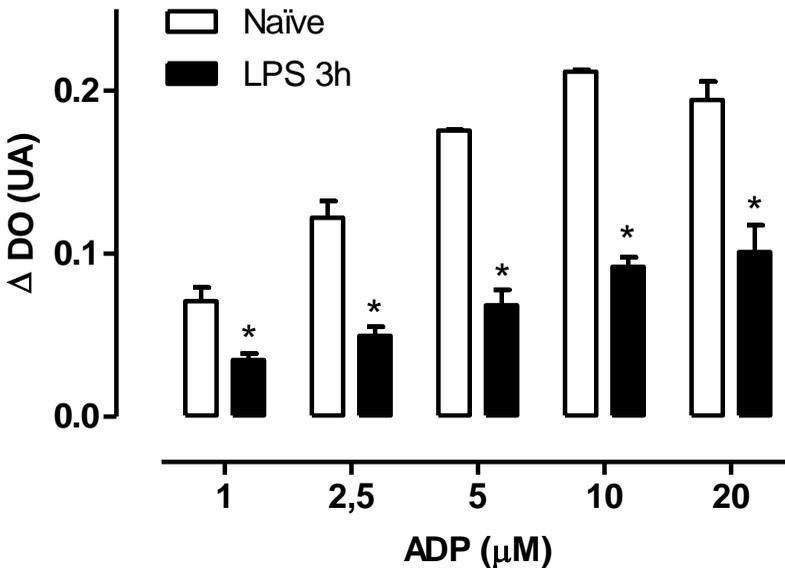


Figura 16. Agregação plaquetária de animais endotoxêmicos 3 h após injeção de LPS. Foram administrados 10 mg/Kg de LPS (i.p.) em ratos machos e após 3 horas, os mesmos foram anestesiados (cetamina/xilazina) e o sangue coletado por punção cardíaca. O protocolo de agregação plaquetário realizado foi o mesmo descrito na Figura 4. No grupo controle (naïve) foi administrado PBS (1 mL i.p.). A agregação plaquetária foi promovida pelo agente agregante ADP (5 μM). Os resultados representam a média ± erro padrão da média, n= 3. * p < 0,05, em relação ao controle (CTR) (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

4.8 Hemograma de animais endotoxêmicos

No hemograma, os resultados das contagens de eritrócitos, hemoglobina, volume corpuscular médio e hematócrito (dados não mostrados) não apresentaram diferença estatística entre os grupos: veículo e LPS. Entretanto, houve diferenças substanciais nas contagens de plaquetas, linfócitos, monócitos (diminuição de 50, 60 e 75%, respectivamente) e de granulócitos (aumento de 60%) (Figura 17) no grupo tratado (LPS 3 h).

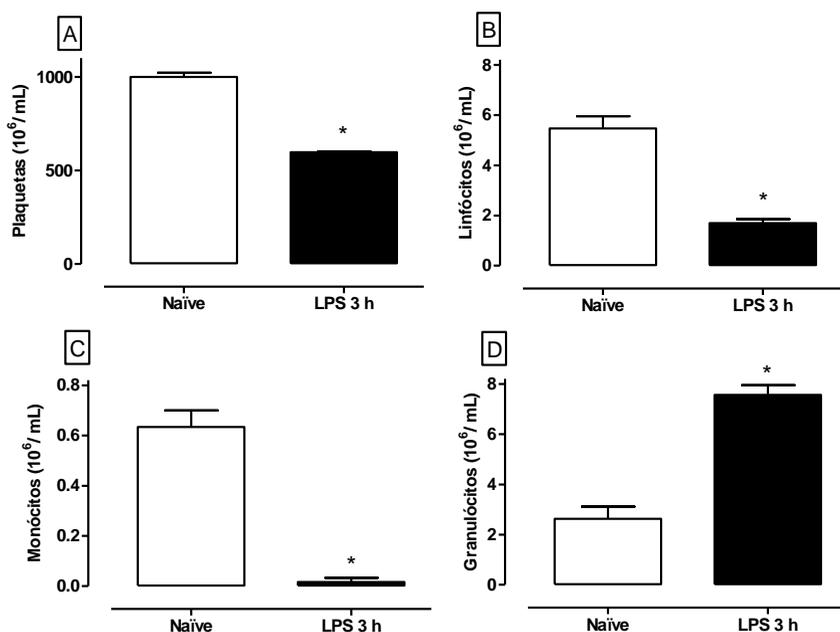


Figura 17. Hemograma de animais endotoxêmicos. A contagem de células foi realizada por método automatizado. Os valores de referência para ratos que receberam veículo são: plaquetas ($600 - 1100 \times 10^6$ /mL), linfócitos ($3,5 - 9 \times 10^6$ /mL), monócitos ($0,1 - 0,7 \times 10^6$ /mL) e granulócitos ($1 - 3,5 \times 10^6$ /mL). Animais naïve foram injetados com PBS somente. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, $n=3$. * $p < 0,05$, em relação ao controle (naïve) (teste t de Student).

5. DISCUSSÃO

A metodologia adotada neste estudo para a realização da agregação plaquetária foi padronizada no leitor de placas Infinite M200 (TECAN), o qual viabilizou ensaiar várias amostras de animais simultaneamente e com a liberdade de utilizar concentrações e fármacos diferentes na placa. Os ensaios de agregação realizados em agregômetros convencionais necessitam de maior volume de amostra e menos amostras são analisadas por vez. A desvantagem em utilizar o leitor de placas é que a mudança morfológica inicial das plaquetas (*shape change* – observado nos segundos iniciais da agregação plaquetária) é perdida, já que a primeira leitura é realizada cerca de 30 segundos após o início da resposta da agregação (FRATANTONI & POINDEXTER, 1990). Todavia, o nosso estudo não objetivou avaliar o início da agregação plaquetária em si, mas a agregação como um todo. Sendo assim, o tempo para o registro não prejudicou a análise dos dados.

Os agonistas mais comumente utilizados em trabalhos que envolvem agregação plaquetária são ADP, trombina, ácido araquidônico, TxA_2 e colágeno. No presente trabalho foram usados como agonistas plaquetários, o ADP e o colágeno. A concentração do agonista ADP utilizada na maior parte dos estudos varia de 0,1 a 20 μM e a concentração do colágeno apresenta variação de 1 a 20 $\mu\text{g/mL}$, independentemente das amostras serem PRP ou plaquetas lavadas (WEISS & ROGER, 1972; ZUCKER & NACHMIAS, 1985; YAGUCHI *et al.*, 2004; IRWIN *et al.*, 2009). Diante destas informações, foi realizada a curva concentração-resposta dos agonista ADP (1-20 μM) e colágeno (1-12 $\mu\text{g/mL}$). Com base nos resultados, as concentrações de 5 μM de ADP e de 4 $\mu\text{g/mL}$ foram escolhidas porque apresentaram efeito submáximo e valores Δ DO equivalentes.

A agregação plaquetária fisiológica geralmente ocorre após exposição do colágeno subendotelial às plaquetas circulantes. Existem quatro tipos de receptores para o colágeno, dois que se ligam diretamente a esta proteína ($\alpha_2\beta_1$ e GPII) e outros dois que se ligam ao colágeno por meio do fator de Von Willebrand ($\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ e GPIb). Assim que ocorre a adesão das plaquetas ao endotélio danificado através de proteínas de adesão e do próprio colágeno, a ativação plaquetária se inicia, promovendo liberação de vários mediadores dos grânulos, entre eles o ADP (quimiotático para atrair as plaquetas). As plaquetas de seres humanos e de ratos

expressam três receptores de ADP: P2Y₁, P2Y₁₂ e P2X₁. Os dois primeiros são receptores purinérgicos acoplados a proteína G, sendo o receptor P2Y₁ acoplado a G_q e P2Y₁₂ acoplado a G_{i2} e o terceiro é um canal de cálcio dependente de ATP (BRASS & STALKER, 2008). Deste modo, a escolha dos agonistas foi feita por envolver dois mecanismos de ação completamente distintos na plaqueta.

A Figura 9 mostra o perfil das curvas de agregação destes dois agonistas plaquetários, ADP e colágeno. O ADP em baixas concentrações promove agregação plaquetária reversível (conhecida como agregação incompleta ou fase primária), porém em altas concentrações a agregação é irreversível (agregação completa). A ligação do fibrinogênio (presente no plasma) com o receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ na plaqueta e a interação entre as plaquetas, ocorrem durante a fase inicial dos eventos de transdução de sinal da ativação plaquetária, contribuindo para um *feedback* positivo que mantém a secreção de moléculas pró-agregantes, promovendo a agregação irreversível (SHANTISILA *et al.*, 2008; COLLER *et al.*, 2010). A concentração de ADP utilizada neste estudo promoveu agregação plaquetária reversível. A agregação promovida pelo colágeno apresenta uma fase de atraso antes de a agregação iniciar-se, pela necessidade de formação de TxA₂ e secreção do conteúdo granular, permitindo que esta agregação se torne mais forte e irreversível.

Em virtude da meia-vida muito curta do NO, frequentemente são empregadas substâncias que liberam NO quando em solução, mas que são estáveis quando armazenados como pós ou como soluções estabilizadas. Estas substâncias são conhecidas como doadores de NO. Assim, neste trabalho foram usados doadores de NO, um nitrato orgânico (GTN; trinitrato de glicerila) e um S-nitrosotiol (GSNO: S-nitrosoglutationa). Eles foram escolhidos por apresentarem estruturas químicas diferentes e mecanismos distintos de liberação de NO.

O composto GTN é um potente vasodilatador dos leitos vasculares periféricos e coronarianos, sendo utilizado há mais de 100 anos no tratamento de doenças coronarianas. Além do efeito vasodilatador, o GTN apresenta efeitos inibitórios na adesão e agregação plaquetária (HERBERT *et al.*, 1997). Os efeitos no relaxamento vascular e inibição da agregação plaquetária são promovidos pelo nitrosotiol ou NO são mediados pelo aumento

de GMPc provocados pela ativação da enzima GCs (IGNARRO *et al.*, 1988; YAO *et al.*, 1992). Parte do efeito inibitório do NO ocorre devido ao aumento do GMPc, porém outros efeitos podem ser promovidos independentes da formação de GMPc. Neste contexto, o NO pode modular a atividade e o número de receptores plaquetários, como os receptores de fibrinogênio e selectina-P (JIN, 2005).

A inibição da agregação plaquetária promovida pelo GTN mostrou-se ser concentração-dependente, sendo que a concentração máxima de 1000 μM inibiu totalmente a agregação plaquetária e a concentração intermediária de 300 μM inibiu cerca de 40% a agregação promovida pelo agonista ADP. O tempo de incubação do GTN com as plaquetas parece não interferir no seu efeito, já que a incubação por 60 minutos causou inibição semelhante ao tempo de incubação por 15 minutos. Na literatura, as concentrações de doadores de NO utilizadas variam bastante, assim como os seus respectivos tempos de incubação. O tempo de incubação do GTN em alguns estudos varia de 5 a 60 minutos, assim como as concentrações utilizadas que podem oscilar de 1 a 1000 μM (KODJA *et al.*, 1998; BIANCA *et al.*, 2011). Em nosso estudo a fonte de plaquetas foi PRP e a concentrações usadas foram 30-1000 μM . Em alguns trabalhos os ensaios de agregação são realizados com menores concentrações de doadores de NO, principalmente quando são plaquetas lavadas (KODJA *et al.*, 1998; SOGO *et al.*, 2000; BIANCA *et al.*, 2011). Quando é usado PRP há necessidade de maiores concentrações de doadores, porque o NO se liga a proteínas plasmáticas e, em particular, hemoproteínas, o que pode contribuir com a redução da potência do NO em inibir a agregação plaquetária (RADOMSKI *et al.*, 1987).

As curvas concentração-resposta de GTN quando a agregação plaquetária foi induzida por colágeno foram similares nos dois tempos de incubação (15 e 60 minutos). Todavia, houve maior inibição plaquetária com o agonista colágeno quando comparado com o ADP, para o qual a concentração de 100 μM de GTN inibiu aproximadamente 50% da agregação em ambos os tempos de incubação. O NO liberado pelo GTN pode ter inibido grande parte dos receptores de colágeno presentes na superfície plaquetária, assim como a diminuição do número destas integrinas (BRASS & STALKER, 2008). Esta inibição possivelmente prejudicou a transdução de sinais da ativação

plaquetária, diminuindo consideravelmente a manutenção da secreção do conteúdo granular, característico da agregação plaquetária irreversível promovida pelo agonista colágeno.

O efeito inibitório do GSNO na agregação plaquetária não foi concentração-dependente. O GSNO induziu um efeito inibitório da ordem de 50% na agregação plaquetária causada por ADP. Porém, quando o agente agregante foi colágeno, a inibição foi ainda maior. Alguns estudos, como o de Gordge e colaboradores (1998) mostram resultados em que o GSNO possui potente atividade anti-agregante, apesar da baixa taxa de liberação de NO observada e da modesta capacidade de acúmulo de GMPc intracelular. Estes mesmos autores sugeriram então que boa parte do efeito inibitório do GSNO não pode ser explicado, portanto, somente pela geração de GMPc.

Muitos trabalhos mostram que o efeito anti-agregante ocorre devido à ativação da enzima guanilato ciclase solúvel e conseqüente aumento de GMPc intracelular (MORO *et al.*, 1996; LI *et al.*, 2003; CHOU *et al.*, 2008; IRWIN *et al.*, 2009). Outros trabalhos, contudo, ressaltam a importância de efeitos inibitórios independentes da formação de GMPc (GORDGE *et al.*, 1998; SOGO *et al.*, 2000; MARCONDES *et al.*, 2006; PRIORA *et al.*, 2011). Sendo assim, para avaliar se a agregação plaquetária dependeria ou não da ativação da enzima GCs e conseqüente formação de GMPc, usamos o composto ODQ, um inibidor seletivo desta enzima.

Moro e colaboradores (1996) avaliaram as ações plaquetárias do ODQ. Todavia, este inibidor foi utilizado em baixas concentrações, pois as amostras por eles estudadas foram plaquetas lavadas. Foi observado que a diminuição da agregação plaquetária promovido pelo doador de NO chamado SNAP (S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina) foi inibida pelo ODQ. Vale chamar a atenção que neste estudo o efeito inibitório do ODQ foi dependente do tempo de incubação com as plaquetas lavadas com ODQ.

A partir destes achados, decidiu-se realizar o ensaio de agregação plaquetária com amostras de PRP para verificar a possível inibição da enzima GCs com o ODQ e utilizando o GTN como doador de NO. Os tempos de incubação com o inibidor foram 15 e 30 minutos. Nossos dados corroboram os de Moro e colaboradores (1996), pois com 30 minutos de incubação o efeito inibitório foi maior. A curva concentração-resposta do ODQ

(incubação de 30 minutos) mostrou que a concentração de 100 μM foi ideal para inibir a enzima GCs e deste modo, impedir que o NO liberado pelo GTN, pudesse desempenhar sua função anti-agregante.

Dados do nosso laboratório demonstraram que o NO apresenta efeito de longa duração em vasos sanguíneos. Preparações de anel aorta de ratos sem endotélio expostos a um doador de NO (SNAP) mostraram uma hiporreatividade à fenilefrina que perdurou por mais de 2 horas, mesmo após a remoção do doador de NO do sistema, caracterizando, portanto, um efeito de longa duração mesmo sem a presença física do NO (TERLUK *et al.*, 2000). Por esta razão, nos perguntamos se o mesmo poderia ocorrer com as plaquetas. Para realizar tal experimento, seria necessário incubar as plaquetas com doador de NO e em seguida remover este NO do meio, para então avaliar a agregação plaquetária. Assim, as plaquetas foram incubadas com o doador de NO e a seguir foram centrifugadas em alta velocidade, que permitiu a obtenção do *pellet* plaquetário. O plasma sobrenadante (o qual continha o doador de NO) foi descartado e novo plasma autólogo foi adicionado para a devida ressuspensão destas plaquetas. O exame da Figura 14 mostra que o GTN (1 mM) foi melhor inibidor da agregação plaquetária do que o GSNO (1 mM) nas condições com e sem substituição de plasma autólogo. Mesmo nas amostras no qual o doador de NO foi removido, ainda houve uma inibição de mais de 50% mostrando que, em plaquetas, o efeito do NO também perdura mesmo após sua remoção. Esta observação é inédita e mostra que o efeito prolongado do NO, mesmo após sua remoção, permanece de modo semelhante ao que ocorre em vasos sanguíneos.

Os resultados do trabalho de Terluk e colaboradores (2000) mostraram que a hiporreatividade vascular induzida por NO foi dependente da ativação da enzima guanilato ciclase e também de canais de potássio. Nossos resultados mostram que o inibidor da guanilato ciclase, o ODQ, reverteu o efeito inibitório do doador de NO, porém não investigamos se canais de potássio de plaquetas poderiam contribuir para o efeito do NO. Um estudo recente mostrou que os canais de potássio voltagem-dependente tipo 1.3 (Kv1.3) são exclusivos de plaquetas e megacariócitos, além de serem importantes na regulação de cálcio e influenciarem no número de plaquetas circulantes (McCLOSEY

et al., 2010). Esta é uma possibilidade atraente e será investigada em futuros experimentos.

A inibição da agregação plaquetária promovida pelo doador de NO (GTN) foi de aproximadamente 50% mesmo 2 horas após sua remoção com a substituição do plasma. Esta observação também é inédita e uma procura exaustiva na literatura mostrou apenas um trabalho em que este efeito parece ter sido evidenciado e mesmo assim de forma indireta. O uso de adesivo de liberação contínua de GTN (0,8 mg/h, trocados a cada 24 h) diminuiu a pressão arterial média em porcos em 24 horas, porém em 48 horas a pressão arterial média retornava aos valores basais (HERBERT *et al.*, 1997). Este dado indica um fenômeno bem conhecido causado pelos nitratos orgânicos, a tolerância hemodinâmica. Os autores examinaram, dentre outros vários parâmetros, a função plaquetária destes animais e verificaram que a agregação plaquetária permanecia inibida 48 horas após o tratamento com o adesivo de GTN. Os autores nada mencionam sobre este efeito, mas, nossos resultados sugerem que a tolerância hemodinâmica não é acompanhada por tolerância aos efeitos anti-agregantes do NO, o que pode ser relevante no tratamento de angina instável com nitratos orgânicos.

Dados do nosso grupo de pesquisa mostram que NO liberado por SNAP reage com grupamentos sulfidrilas de proteínas presentes na membrana de células musculares lisas, possibilitando que haja um armazenamento deste NO na forma de nitrosotióis, o qual pode ser posteriormente liberado. Estes experimentos sugerem que a hiporreatividade e o vasorelaxamento observados são eventos relacionados a S-nitrosilação de resíduos de cisteína e a mobilização de NO (TERLUK, 2005).

Walsh e colaboradores (2007) observaram que modificações promovidos por doador de NO (GSNO) em receptores purificados $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ocorrem através de interações diretas com resíduos de cisteínas e que esta S-nitrosilação pode inativar esta integrina, a qual é a mais abundante na superfície da plaqueta e responsável pela ligação do fibrinogênio e fator de von Willebrand. Embora ainda falte a demonstração cabal desta sugestão, pode ser que o efeito inibitório duradouro do NO sobre a agregação plaquetária possa ser explicado pela S-nitrosilação de resíduos de cisteína em proteínas plaquetárias.

Há produção exacerbada de NO em situações patológicas como síndrome inflamatória sistêmica e sepse. Estudos referentes à função plaquetária durante a sepse possuem resultados conflitantes, com resultados mostrando tanto hiper como hipoagregação plaquetária. O modelo experimental de choque endotoxêmico com injeção de lipossacarídeo (LPS) é utilizado para avaliar a produção de NO promovida pela NOS II, assim como a função plaquetária. Sheu e colaboradores (1998) mostraram que LPS levou à formação de NO/GMPc através da ativação da enzima NOS II em plaquetas humanas com consequentemente inibição da agregação plaquetária. Em outro estudo, a hipoagregação foi observada nas primeiras 2 horas após o tratamento do LPS e este efeito permaneceu até 48 horas após o tratamento (MARCONDES *et al.*, 2011).

Nossos resultados relacionados à agregação plaquetária no choque endotoxêmico em ratos corroboram com estes trabalhos, pois houve mais de 50% de diminuição da agregação plaquetária após 3 horas do tratamento com LPS. Além da diminuição da agregação, o número de plaquetas também diminuiu com queda de 40% quando comparado ao grupo controle. Na clínica já foi demonstrado que pacientes com trombocitopenia permanecem por mais tempos em unidades de terapia intensiva, além de ser indício de aumento de mortalidade (VINCENT *et al.*, 2002).

Como um resumo, o presente estudo mostrou que distintos doadores de NO causam perfis de inibição da agregação plaquetária diferentes e que este efeito agudo parece envolver ativação da guanilato ciclase. Outro achado importante foi que este efeito anti-agregante do NO é duradouro e que, talvez, possa ser explicado por S-nitrosilação de proteínas presentes em plaquetas. Por fim, o LPS diminuiu a os números de plaquetas circulantes e a agregação plaquetária.

6. CONCLUSÕES

- O perfil da agregação plaquetária do ADP e do colágeno mostraram-se distintos em plaquetas de ratos Wistar;
- O doador de NO GTN apresentou efeito inibitório na agregação plaquetária a partir da concentração [100 μ M] diante de ambos agonistas plaquetários utilizados, ADP e colágeno;
- O doador de NO GSNO apresentou perfil de inibição da agregação plaquetária diferente do GTN, inibindo cerca de 50% em todas as concentrações utilizadas [30, 100, 300 e 1000 μ M];
- A inibição da agregação plaquetária via NO parece ser mediada pela enzima guanilato ciclase solúvel, pois o tratamento com o inibidor seletivo ODQ foi capaz de prevenir a inibição promovida pelo doador de NO GTN;
- A remoção do doador de NO e subsequente substituição do plasma autólogo permitiu verificar que o efeito do NO permanece mesmo após a retirada do agente inibitório;
- O efeito inibitório do NO (cerca de 50 %) se mostrou duradouro, permanecendo até duas horas após a remoção do doador de NO;
- O tratamento com LPS (10 mg/Kg) em ratos, diminui a agregação plaquetária (mais de 50%) em todas as concentrações de ADP utilizadas (1-20 μ M);
- Os animais tratados com LPS (3 h) apresentaram perfil hematológico de inflamação aguda.

7. REFERÊNCIAS

AHMAD, S. S.; WALSH, P. N. Platelet membrane-mediated coagulation protease complex assembly. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v.4, n.6, P. 271-278, 1994.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Nitric Oxide**, v. 615, p. 593-615, 2001

BECKER, R. C. Cell-Based Models of Coagulation: A Paradigm in Evolution. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 20, n. 1, p. 65-68, 2005.

BEDNAR, B.; CONDRA, C.; GOULD, R.J.; CONNOLLY, T.M. Platelet aggregation monitored in 96 well microplate reader is useful for evaluation of platelet agonists and antagonists. **Thrombosis Research**, v.77, n.5, p. 543-463, 1995.

BIANCA, R. D. V.; MITIDIERI, E.; MIRONE, V.; FUSCO, F.; IMBIMBO, C.; CIRINO, G.; SORRENTINO, R. Na ex vivo standardized assay to measure human platelet cGMP. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 64, n. 2, p. 164-167, 2011.

BORN, G. V. R.; CROSS, M. J. The aggregation of blood platelets. **Journal of Physiology**, v.168, p. 178-195, 1963.

BRECHER, G.; CRONKITE, E. P.; Morphology and enumeration of human blood platelets. **Journal of Applied Physiology**.v.3, p.365-377, 1950.

BRASS, L. F.; STALKER, T. J. Mechanism of platelet activation. **Platelets in hematologic and cardiovascular disorders**. Cambridge University Press, p. 37 – 52, 2008.

CHEN, Z.; ZHANG, J.; STAMLER, J. S. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. **PNAS**, v. 99, n. 12, p. 8306-8311, 2002.

CHERRY, P. D.; FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V.; JOTHIANANDAN, D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 79, n. 6, p. 2106-2110, 1982.

CHOU, T. C.; LIN, Y. F.; WU, W. C.; CHU, K. M. Enhanced nitric oxide and cyclic GMP formation plays a role in the anti-platelet activity of simvastatin. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 6, p. 1281-1287, 2008.

COLLER, B. S.; ITALIANO Jr, J. E.; SMYTH, S. S.; WHITEHEART, S. Platelet morphology, biochemistry and function. **Williams Hematology**. Ed. 8. The McGraw-Hills Companies, Inc. 2010.

EGBRINK, M. G. A.; GESTEL, M. A.; BROEDER, M. A. W.; TANGELDER, G. J.; HEEMSKERK, J. M. W.; RENEMAN, R. S.; SLAAF, D. W. Regulation of microvascular thromboembolism *in vivo*. **Microcirculation**, v.12, p. 287-300, 2005.

FABRE, J. E.; NGUYEN, M.; ATHIRAKUL, K.; COGGINS, K.; McNEISH, J. D.; AUSTIN, L. K.; PARISE, L. K.; FITZGERALD, G. A.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Activation of the murine EP3 receptor for PGE₂ inhibits cAMP production and promotes aggregation. **The Journal of Clinical Investigation**, v.107, n.5, p. 603-610, 2001.

FEELISCH, M.; NOACK, E. A. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. **European Journal of Pharmacology**, v. 139, p.19-30, 1987.

FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology**, v. 35, p. 113-122, 1998.

FERNANDES, d. **Dinâmica da guanilato ciclase solúvel na sepse: Uma janela de oportunidade**. (Tese de Doutorado em Farmacologia. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina). Florianópolis, 132 p. 2006.

FERNANDES, D.; ASSREUY, J. Óxido nítrico e sepse. **Sepse: da bancada à beira do leito**. Rio de Janeiro: Revinter, p.93-106, 2008.

FRATANTONI, J. C.; POINDEXTER, B. J. Measuring platelet aggregation with microplate reader – A new approach to platelet aggregation studies. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 94, n. 5, p. 613-617, 1990.

FREEDMAN, J. E.; SAUTER, R.; BATINELLI, E. M.; AULT, K.; KNOWLES, C.; HUANG, P. L.; LOSCALZO, J. Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOS III gene. **Circulation Research**, v.84, p. 1416-1421, 1999.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 372-376, 1980.

GASTON, B. Nitric oxide and thiol groups. **Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics**, v. 1411, n. 2, p. 323-333, 1999.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da Terapêutica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hills, 2006. 1821p. cap. 31, p. 735-756. cap. 35. p. 837-868.

GORDGE, M. P.; HOTHERSALL, J. S.; NORONHA-DUTRA, A. A. Evidence for a cyclic-independent mechanism in the anti-platelet action of S-nitrosoglutathione. **British Journal of Pharmacology**. v. 124, p. 141-148, 1998.

GORDGE, M. P.; XIAO, F. S-nitrosothiols as selective antithrombotic agents - possible mechanisms. **British journal of pharmacology**, v. 159, n. 8, p. 1572-80, 2010.

GRIES, A.; BODE, C.; PETER, K.; HERR, A.; BÖHRER, H.; MOTSCH, J.; MARTIN, E. Inhaled nitric oxide inhibits human platelet aggregation, P-selectin expression, and fibrinogen binding in vitro and in vivo. **Circulation**, v. 97, n. 15, p. 1481-1487, 1998.

GRESELE, P.; PAGE, C.; FUSTER, V.; VERMYLEN, J. Platelets in thrombotics and non-thrombotics disorders. **Cambridge University Press**, 2002.

GRUETTER, C. A.; BARRY, B. K.; McNAMARA, D. B.; GRUETTER, D. Y.; KADOWITZ, P. J. IGNAROO, L. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. **Journal of cyclic nucleotide research**, v. 5, p. 211-224, 1979.

HARDMAN, J. G.; SUTHERLAND, E. W. Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 23, p. 6363-6370, 1969.

HECHLER, B.; GACHET, C. P2 receptors and platelet function. **Purinergic Signalling**, v. 7, p. 293-303, 2011.

HERBERT, D.; XIANG, J.; LAM, J. Y. T. Persistent inhibition of platelets during continuous nitroglycerin therapy despite hemodynamic tolerance. **Circulation**, v. 3, p. 1308-1313, 1997.

HOFMANN, F.; AMMENDOLA, A.; SCHOSLOSSMANN, J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 1671-1676, 2000.

HOFFMAN, M. A. Remodeling the blood coagulation cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 16, n. 1, p. 17-20, 2003.

HWANG, T. L.; WU, C. C.; TENG, C. M. Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, p. 1158-1163, 1998.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; CHAUDHURI, G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and

superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. **The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics**, v. 244, n. 1, p. 181-189, 1988.

IGNARRO, L. J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **Journal of Physiology and pharmacology: na official journal of the Polish Physiological Society**, v. 53, n. 4, p. 503-514, 2002.

IKEDA, Y.; MATSUBARA, Y.; KAMATA, T. Platelet immunology: structure function, and polymorphisms of membrane glycoproteins. **Platelets in hematologic and cardiovascular disorders**. Cambridge University Press, p. 21-36, 2008.

IRWIN, C.; ROBERTS, W.; NASEEM, K. Nitric oxide inhibits platelet adhesion to collagen through cGMP-dependent and independent mechanisms: The potential role for S-nitrosylation. **Platelets**, v. 20, p. 478-486, 2009.

ISHIKAWA, E.; ISHIKAWA, S.; DAVIS, J. W.; SUTHERLAND, E. W. Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 224, n. 33, p. 6371-6376, 1969.

ITALIANO Jr., J. E.; LECINE, P.; SHIVDASANI, R. A.; HARTWIG, J.H. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. **The Journal of Cell Biology**. v. 147, n. 6, p. 1299-1312, 1999.

ITALIANO Jr., J. E. The structure and production of blood platelets. **Platelets in hematologic and cardiovascular disorders**. Cambridge University Press, p.1-20, 2008.

JIN, R. C.; VOETSCH, B.; LOSCALZO, J. Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function. **Microcirculation**, v. 12, p. 247-258, 2005.

JIN, R. C.; LOSCALZO, J. Vascular nitric oxide: formation and function. **Journal of Blood Medicine**, v. 1, p. 147-162, 2010.

KOJDA, G.; PATZNER, M.; HACKER, A.; NOACK, E. Nitric oxide inhibits vascular bioactivation of glyceryl trinitrate: a novel mechanism to explain preferential venodilation of organic nitrates. **Molecular pharmacology**, v. 53, n. 3, p. 547-54, 1997.

KRAUSE, S.; SCHOLZ, T.; TEMMLER, U.; LÖSCHE, W. Monitoring the effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists with a microtiter plate method for detection of platelet aggregation. **Platelets**, v. 12, p. 423-430, 2001.

KUKOVETZ, W. R.; HOLZMANN, S.; ROMANIN, C. Cyclic GMP and tolerance to nitrates. **Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium**, p.49-54, 1988.

KUMAR, A.; SUSHAMA, A.; MANRAL, S.; SINHA, R.; JOSHI, R.; SINGH, U.; ROHIL, V.; PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S. RAJ, H. G. Calreticulin transacetylase mediated activation of human platelet nitric oxide synthase by acetyl group Donors compounds. **Nitric Oxide**, v. 26, p. 9-19, 2011.

LEVI, M. Platelets. **Critical Care Medicine**, v. 33, p. 523-525, 2005.

LEVI, M. The coagulant response in sepsis. **Clinical Chest Medicine**, v. 28, p. 627-642, 2008.

LI, Z.; XI, X.; GU, M.; FEIL, R.; YE, R. D.; EIGENTHALER, M.; HOFMANN, F.; DU, X. A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. **Cell**, v. 112, p. 77-86, 2003.

LOPES-PIRES, M. E.; CASARIN, A. L.; CUNHA, F. G. P. METZE, I. L.; ANTUNES, E.; MARCONDES, S. Lipolysaccharide treatment reduces rat platelet aggregation independently of intracellular reactive-oxygen species generation. **Platelets**, v. 53, n. 2, (doi: 10.3109/09537104.2011.603065), 2011.

LUCAS, K. A.; PITARI, G. M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S.; Chepenik, K. P.; Waldman, S. A. Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 375-413, 2000.

MARQUES-DA-SILVA, C.; BURNSTOCK, G.; OJCIUS, D. M.; COUTINHO-SILVA, R. Purinergic receptor agonists modulate phagocytosis and clearance of apoptotic cells in macrophages. **Immunobiology**, v. 216, n. 1-2, p. 1–11, 2011.

MAURICE, D. H.; HASLAM, R. J. Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP. **Molecular Pharmacology**, v.37, n. 5, p. 671-81, 1990.

McCLOSKEY, C.; JONES, S.; AMISTEN, S.; SNOWDEN, R. T.; KACZMAREK, L. K.; ERLINGE, D.; GOODALL, A. H.; FORSYTHE, I. D.; MAHAUT-SMITH, M. P. Kv1.3 is the exclusive voltage-gated K⁺ channel of platelets and megakaryocytes: roles in membrane potential, Ca²⁺ signaling and platelet count. **The Journal of Physiology**, v. 588, n. 9, p. 1399-406, 2010.

McEVER, R. P.; CUMMINGS R. D. Role of PSGL-1 bindings to selectins in leucocyte recruitment. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 97-103, 1998.

MENDELSONS, E.; NEILL, O.; ROXBURY, W. Inhibition of fibrinogen binding by to human platelets by S-Nitroso-N-acetylcysteine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 31, p. 19028-19034, 1990.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. **Hypertension**, v. 12, n. 4, p. 365-372, 1988.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Relationship between protacuclin and nitric oxide in the thrombotic process. **Thrombosis Research**, v. 3, n. 13, 1990.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A.; HODSON, H. F.; KNOWLES, R. G.; LOPEZ-JARAMILO, T.; PALMER, R. M. J.; RADOMSKI, M. W.; REES, D. D.; SCHULZ, R. The L-arginine: nitric oxide

pathway. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 13, n. 3, p.1-9, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The Discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 193-201, 2006.

MORO, M. A.; RUSSELL, R. J.; CELLEK, S.; LIZASOAIN, I.; YUNCHAO, S.; DARLEY-USMAR, V. M.; RADOMKI, M. W.; MONCADA, S. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: Confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 4, p. 1480-1485, 1996.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987.

PRIORA, R.; MARGARITIS, A.; FROSALI, S.; COPPO, L.; SUMMA, D.; GIUSEPPE, D.; ALDINUCCI, C.; PESSINA, G.; STEFANO, A.; SIMPLICIO, P. *In vitro* inhibitor of human and rat platelet by NO donors, nitrosoglutathione, sodium nitroprusside and SIN-1, through activation of cGMP-independent pathways. **Pharmacological Research**, v. 64, n. 3, p. 289-297, 2011.

RADI, R.; BECKMAN, J. S.; BUSH, K. M.; FREEMAN, B. A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 7, p. 4244-4250, 1991.

RAIESDANA, A.; LOSCALZO, J. Vessel wall-derived substances affecting platelets. **Platelets in hematologic and cardiovascular disorders**. Cambridge University Press, p. 92 – 105, 2008.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. **British Journal of Pharmacology**, v. 92, p. 181-187, 1987.

RADOMSKI, M. W.; MONCADA, S. Role of nitric oxide in endothelial cell – platelet interactions. **Proceedings of Symposium on Antithrombotics**.1991.

REES, D. D.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Nitric oxide and the microcirculation. PAPER 211- JAMIL REFERENCE. **Biomedical Division**, v. 47, p. 427-437, 1990.

SCHMIDT, H. H.; LOHMANN, S. M.; WALTER, U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1178, p. 153-175, 1993.

SEMPLE, J. W.; FREEDMAN. J. Platelets and innate immunity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.67, p. 499-511, 2010.

SEMPLE, J. W.; ITALIANO Jr., J. E.; FREEDMAN, J. Platelets and the immune continuum. **Platelets**, v. 11, p. 264-274, 2011.

SHANTSILA, E.; WATSON, T.; LIP, G. Y. H. Laboratory investigation of platelets. **Platelets in hematologic and cardiovascular disorders**. Cambridge University Press, p. 124 – 46, 2008.

SHEN, J.; DiCORLETO, P. E. ADP stimulates human endothelial cell migration via P2Y1 nucleotide receptor-mediated mitogen activated protein kinase pathways. **Circulation Research**, v. 102, n. 4, p. 448–456, 2008.

SIEDLECKI, C. A.; LESTINI, B. J.; KOTTKE-MARCHANT, K. K.; EPELL, S. J.; WILSON, D. L.; MARCHANT, R. E. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. **Blood**, v. 88, p. 2939-2950, 1996.

STAMLER, J. S.; SINGEL, D. J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1898-902, 1992.

STAMLER, J. S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, v. 78, p. 931-936, 1994.

SOGO, N.; MAGID, K. S.; SHAW, C. A.; WEBB, D. J.; MEGSON, I. L. Inhibition of human platelet aggregation by nitric oxide donor drugs: relative contribution of Cgmp-independent mechanism. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 279, n. 2, p. 412-419, 2000.

SOÚLERE, L.; STURN, J. C.; NÚÑEZ-VERGANA, L. F.; HOFFMANN, P.; PÉRIE, J. Synthesis, electrochemical, and spectroscopic studies of novel S-nitrosothiols. **Tetrahedron**, v. 57, p. 7173-7180, 2001.

TERLUK, M. R.; SILVA-SANTOS, J. E.; ASSREUY, J. Involvement of soluble guanylate cyclase and calcium-activated potassium channels in the long-lasting hyporesponsiveness to phenylephrine induced by nitric oxide in rat aorta. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 361, p. 477-483, 2000.

TERLUK, M.R. **Respostas vasculares mediadas pelo óxido nítrico: Efeitos de agentes oxidantes na hiporreatividade à fenilefrina e no relaxamento induzido por tióis.**(Tese de Doutorado em Farmacologia. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina). Florianópolis, 142 p. 2005.

TOMASIAK, M.; STELMAACH, H.; RUSAK, T.; WYSOCKA, J. Nitric oxide and platelet energy metabolism. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, n. 3, p.789-803, 2004.

VANNI, D. S.; HORSTMANN, B.; BENJO, A. M.; DAHER, J. P. L.; KANAAN, S.; SLEIMAN, M. Nitric oxide: inhibition of platelets and participation in thrombus formation. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 3, p. 181-189, 2007.

VAUGHN, M. W.; KUO, L.; LIAO, J. C. Estimation of nitric oxide production and reaction rates in tissue by use of a mathematical model. **The American Journal of Physiology**, v. 274, n. 6, p. 2163-2176, 1998.

VICTOR, V. M.; ROCHA, M.; ESPLUQUES, J. V.; De La FUENTE, M. Role of free radicals in sepsis: antioxidant therapy. **Current pharmaceutical design**, v. 11, n. 24, p. 3141-58, 2005.

VINCENT, J. L.; YAGUSHI, A.; PRADIER, O. Platelet function in sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 5, p. 313-317, 2002.

WALKOWIAK, B.; KESY, A.; MICHALEC, L. Microplate reader – a convenient tool in studies of blood coagulation. **Thrombosis Research**, v. 87, n.1, p. 95-103, 1997.

WALSH, G. M.; LEANE, D.; MORAN, N.; KEYES, T. E.; FORSTER, R. J.; KENNY, D.; O'NEILL, S. S-nitrosylation of platelet $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ as revealed by Raman Spectroscopy. **Biochemistry**, v. 46, p. 6429-6436, 2007.

WALTER, U.; GAMBARYAN, S. GMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications. **Handbook of Experimental Pharmacology** 191, p. 533-548 2009.

WANG, G. R.; HALUSHKA, P. V.; LINCOLN, T. M.; MENDELSON, M. E. Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 95, n. 9, p. 4888-4893, 1998.

WEISS, H. J.; ROGERS, J. Thrombocytopathia due to abnormalities in platelet release reaction- studies on six unrelated patients. **Blood**, v. 32, p. 187-196, 1972.

YAGUCHI, A.; LOBO, F. L. M.; VINCENT, J. L.; PRADIER, O. Platelet function in sepsis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 2, p. 2096-2102, 2004.

YANG, J.; JIANG, H.; MORTENEN, R.; AUSTIN, S.; MANNING, D. R.; WOULFE, D.; BRASS, L. F. Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation

of adenylyl cyclase and other effectors. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 48, p. 46035-46042, 2002.

YAO, S. K.; OBER, J. C.; KRISHNASWAMI, A.; FERGUSON, J. J. ANDERSON, H. V.; GOLINO, P.; BUJA, L. M.; WILLERSON, J. T. Endogenous nitric oxide protects against platelet aggregation and cyclic flow variations in stenosed and endothelium-injured arteries. **Circulation**, v. 86, p. 1302-1309, 1992.

YIP, J.; SHEN, Y.; BERNDT, M. C.; ANDREWS, R. K. Primary platelet adhesion receptors. **Life**, v. 57, n. 2, p. 103-108, 2005.

ZHANG, L.; DU, J. R.; WANG, J. et al. Z-ligustilide extracted from Radix Angelica Sinensis decreased platelet aggregation induced by ADP ex vivo and arterio-venous shunt thrombosis in vivo in rats. **Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 129, n. 7, p. 855-9, 2009.

ZUCKER, M. B.; NACHMIAS, V. T. Review Platelet Activation. **Arteriosclerosis & Thrombosis**, v. 5, n. 1, p. 2-18, 1985.