

ANDRÉ LUIZ CASARIN

**Modulação da Adesão Plaquetária de Ratos
Tratados com Lipopolissacarídeo por
Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio**

Orientador: Prof.(a) Dr(a) Sisi Marcondes Paschoal



**Departamento de Farmacologia
Faculdade de Ciências Médicas – FCM
UNICAMP**

CAMPINAS
Unicamp, 2009

ANDRÉ LUIZ CASARIN

**Modulação da Adesão Plaquetária de Ratos
Tratados com Lipopolissacarídeo por Espécies
Reativas de Oxigênio e Nitrogênio**

Tese de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título Mestre em
Farmacologia.

Orientador: Prof.(a) Dr(a) Sisi Marcondes Paschoal



CAMPINAS

Unicamp, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C263m Casarin, André Luiz
Modulação da adesão plaquetária de ratos tratados com lipopolissacarídeos por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio / André Luiz Casarin. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador :Sisi Marcondes Paschoal
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Lipopolissacarídeos. 2. Adesão. 3. Plaquetas (Sangue). 4. Espécies reativas de oxigênio. 5. Óxido nítrico. I. Paschoal, Sisi Marcondes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Reactive oxygen and nitrogen species modulate the ex vivo effects of LPS on platelet adhesion to fibrinogen

- Keywords:**
- Lopopolysaccharide
 - Adhesion
 - Platelet, blood
 - Reative oxygen species
 - Nitric oxide

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Sisi Marcondes Paschoal

Prof^º. Dr^º. Carla Fernanda Franco Penteado

Prof^ª. Dr^ª. Angelina Zanesco

Data da defesa: 29-01-2010

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Andre Luiz Casarin

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Sisi Marcondes Paschoal

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Angelina Zanesco	
Professor (a) Doutor (a) Carla Fernanda Franco Pentecado	
Professor (a) Doutor (a) Sisi Marcondes Paschoal	

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/01/2010

DEDICATÓRIA

À Força Maior que rege e governa tudo e a todos, independente de raça ou credo, por me dar forças para sempre iniciar um novo dia e que me dá o descanso necessário ao anoitecer, aliviando minhas angustias, medos e frustrações. Por sempre colocar em meu caminho pessoas especiais, que me dão amparo, força, incentivo, confiança... Dando-me a certeza de que cada qual possui seu momento específico.

Aos meus pais, Armelindo e Elisabeth Casarin, por me educarem, por abrirem mão de muitos desejos e sonhos e por me fazerem alçar vôo e almejar alturas, tendo como porto seguro o seio de minha família.

Aos meus irmãos, Elisângela e Fabrício, por sempre estarem ao meu lado, por fazerem parte do alicerce de minha formação inicial e primordial: minha família.

Ao meu grande amigo Orlando J. G. Bueno, que além de amigo, em muitos momentos assumiu figura de pai, irmão, me apoiando em momentos difíceis, acompanhando cada momento desse trabalho, onde suor, lágrimas se misturaram em certos momentos.

Aos meus amigos que mesmo a certa distância, sempre me apoiaram, darem ânimo e por tonarem melhor minha existência.

Aos professores Sisi Marcondes Pachal e Edson Antunes, por acreditarem em meu potencial e em minhas qualidades, dando-me a oportunidade de crescer não apenas profissionalmente, mas também quanto ser humano.

Aos meus amigos de trabalho Elisa, Nádia, Camila e todas as demais pessoas do departamento que também contribuíram com o meu crescimento, amadurecimento, e ensinaram-me a ver um horizonte, nesta difícil tarefa que é a pesquisa, e a ter força e garra para lutar e alcançar o horizonte almejado e que sem os quais essa trajetória seria difícil e insípida.

A todos aqueles que de certa forma estiveram envolvidos neste trabalho, que a penas um aceno ou até mesmo um sorriso nos lábios puderam, sem se dar conta, tonar meu dia melhor.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Sisi Marcondes Paschoal, pela oportunidade e confiança, em mim depositada, para a realização deste trabalho, por sua orientação e por todo o crescimento profissional e humano.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pela sua co-orientação e importantes colaborações para o desenvolvimento deste trabalho.

Às Forças Soberanas por sempre me regerem, guardarem e guiarem meus passos, atos e pensamentos.

Aos meus pais por serem meu porto seguro, o pilar mestre em minha vida.

Aos meus irmãos por serem pessoas sensacionais e por sempre estarem ao meu lado, dando-me apoio.

A Orlando J. G. Bueno por ser, em determinados momentos, mais que um amigo, sempre me apoiando e acreditando em meu potencial.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia da UNICAMP agradeço por me ajudarem a crescer profissional e humanamente e por toda amizade compartilhada nestes anos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP pelos serviços prestados e a convivência.

A todos os meus familiares por toda amizade e compreensão.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Mestrado.

“...eu antes tinha querido ser os outros para conhecer o que não era eu. Entendi então que eu já tinha sido os outros, e isso era fácil, minha experiência maior seria ser o outro dos outros: e o outro dos outros era eu...”

Clarice Lispector

SUMÁRIO

LISTA DE MATERIAIS	x
LISTA DE ABREVIATURA	xi
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELA	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Sepses	18
1.2. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs)	20
1.2.1. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	20
1.2.2. Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs)	21
1.3. Antioxidantes	22
1.4. Plaquetas	23
1.5. Plaquetas e Sepses	24
1.5.1. Plaquetas e as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs)	25
1.6. OBJETIVOS	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1. Animais	28
2.2. Padronização da quantidade de LPS utilizado na realização dos protocolos experimentais	28
2.3. Protocolo Experimental	28
2.4. Obtenção de plaquetas lavadas	29
2.5. Ensaio de adesão plaquetária	29
2.6. Determinação da pressão arterial caudal	30
2.7. Determinação de GMPc	30
2.8. Análise Estatística	31
3. RESULTADOS	32
3.1. Efeito do tratamento de ratos com LPS na adesão plaquetária ao fibrinogênio	32

3.2. Efeito do pré-tratamento crônico de animais com o inibidor inespecífico da óxido nítrico sintase L-NAME na adesão de plaquetas de ratos injetados com LPS	34
3.3. Determinação dos níveis de GMPc em plaquetas de ratos tratados com LPS	37
3.4. Efeito do tratamento de ratos com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) na adesão plaquetária de ratos injetados com LPS	39
3.5. Efeito da incubação de PEG-SOD com plaquetas de ratos injetados com LPS na adesão plaquetária	41
4. DISCUSSÃO	43
5. CONCLUSÕES	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE MATERIAIS

<u>Substâncias</u>	<u>Procedência</u>
Albumina (de soro bovino)	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
Fibrinogênio (fração I, de plasma humano)	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
Kit GMPc	Cayman (Michigan, EUA)
L-NAME	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
LPS de <i>E.coli</i> (soro tipo 0111:B4)	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
N-acetilcistina	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
PEG-SOD	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
Substrato para fosfatase ácida (p-Nitrophenyl phosphate, disdium)	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
Superóxido desmutase polietileno glicol	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
Trombina (de plasma humano)	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ATP	Adenosina trifosfato
BH4	Tetraidrobiopterina
BSA	Albumina de soro bovino
Ca²⁺	Íon cálcio
CAT	Catalase
COX-1	Ciclooxigenase -1
CYP2C9	Isoforma do citocromo P450
DAG	Diacilglicerol
ECA	Enzima conversora de angiotensina
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
Fe	Ferro
FMN	Flavina mononucleotídeo
GC	Guanilil ciclase
GCs	Guanilil ciclase solúvel
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GPIIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione oxidada
GTPase	Trisfosfatase de guanosina
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IBMX	Adenosina 3-isobutil-1-metil-xantina
IP₃	Inositol trifosfato
K⁺	Íon potássio
KCl	Cloreto de potássio
LBP	Proteína ligante de LPS

L-NAME	L-nitro-argenina-metil-éster
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativadora de mitógeno
NaCl	Cloreto de sódio
NAC	N-acetilceisteína
NADPH oxidase	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato oxidase
NADPH	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κB	Fator nuclear κB
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
c-NOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
e-NOS	Óxido nítrico sintase endotelial
i-NOS	Óxido nítrico sintase induzível
n-NOS	Óxido nítrico sintase neuronal
O₂⁻	Ânion superóxido
OH⁻	Radical hidroxila
ONOO⁻	Peroxinitrito
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAR	Receptor ativado por proteasa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEG-SOD	Poliétileno glicol-conjugado superóxido dismutase
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PLC	Fosfolipase C
PRP	Plasma rico em plaqueta
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SIN-1	Dietilamina NONOato, 3-morfolinosinonamina

SNP	Nitroprussiato de sódio
SOD	Superóxido desmutase
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TXA₂	Tromboxano A ₂
UTIs	Unidades de Terapias Intensivas
vWf	von Willebrand
XD	Xantina desidrogenase
XO	Xantina oxidase
XOR	Xantina óxido redutase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Efeito do tratamento de ratos com LPS na adesão de plaquetas ao fibrinogênio	33
Figura 2 – Efeito de pré-tratamento crônico com L-NAME na adesão de plaquetas de ratos injetados com LPS	36
Figura 3 - Efeito da PEG-SOD na adesão de plaquetas de ratos injetados com LPS	38
Figura 4 – Efeito do tratamento crônico de ratos com o inibidor da NO sintase L-NAME nos níveis de GMPc de plaquetas de animais injetados com LPS	40
Figura 5 – Efeito do tratamento de ratos com NAC na adesão de plaquetas de ratos injetados com LPS	42

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Pressão arterial dos animais pré-tratados cronicamente com L-NAME antes e após a injeção de LPS	34
---	----

RESUMO

A sepse é um problema grave enfrentado em hospitais e por isso é importante mais estudos que possam esclarecer melhor a sua fisiopatologia. Alguns estudos indicam que as plaquetas podem ter um papel importante nesta condição, já que a gravidade da sepse relaciona-se positivamente com o estado de ativação destes elementos. O LPS é uma substância bastante utilizada no estudo da sepse, uma vez que mimetiza vários efeitos observados neste quadro como a grande produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar as ações do tratamento de ratos com LPS na adesão plaquetária, bem como o envolvimento de EROs e ERNs na modulação deste(s) efeito(s). Para tanto, ratos foram injetados com LPS (1 mg/kg, i.p.) e após 2h a 48h a adesão plaquetária foi avaliada. As plaquetas aderidas aos poços foram quantificadas através da determinação da atividade da fosfatase ácida. Para investigar o papel do NO e de EROs no(s) efeito(s) do LPS na adesão plaquetária, foram realizados co-tratamentos de ratos com o inibidor da óxido sintase L-NAME ou com antioxidante N-acetilcisteína (NAC), bem como a incubação de plaquetas *in vitro* com o sequestrador de O_2^- PEG-SOD. Os níveis de GMPc em plaquetas foram determinados por radioimunoensaio. O tratamento de ratos com LPS aumentou a adesão de plaquetas não-ativadas ao fibrinogênio e diminuiu a adesão de plaquetas ativadas por trombina. O tratamento crônico dos ratos com L-NAME (20 mg/kg/dia) por 7 dias antes da injeção com LPS reduziu o aumento da adesão de plaquetas não-ativadas, mas não afetou a adesão de plaquetas ativadas. Os níveis de GMPc em plaquetas de ratos tratados com LPS foram semelhantes aos observados em animais tratados com salina. Os níveis intraplaquetários de GMPc em plaquetas não-ativadas de grupo controle ou no que recebeu o LPS foram reduzidos pelo tratamento crônico do animais com L-NAME. Entretanto, em plaquetas ativadas, o tratamento dos animais com L-NAME reduziu os níveis de GMPc somente no grupo tratado com LPS em 6h. A incubação de plaquetas não-ativadas com PEG-SOD (30 U/ml) reduziu o aumento da adesão de plaquetas de ratos tratados com LPS para níveis semelhantes aos do grupo controle, mas não modificou a adesão de plaquetas ativadas, seja a dos animais controle ou dos injetados com LPS. O tratamento de ratos com NAC (150 mg/kg, i.p.) 30 min após a injeção com LPS impediu o aumento da adesão de plaquetas não-ativadas de ratos injetados com LPS e reduziu o efeito inibitório do LPS na adesão

de plaquetas ativadas por trombina. Em conclusão, o tratamento de ratos com LPS apresenta um efeito ambíguo na adesão plaquetária, já que aumenta a adesão de plaquetas não ativadas e reduz a adesão de plaquetas ativadas por trombina. O óxido nítrico (NO) modula o efeito estimulatório do LPS na adesão de plaquetas não ativadas através de mecanismos independentes de GMPc, mas não participa do efeito inibitório do LPS na adesão de plaquetas ativadas. Por outro lado, a geração sistêmica de EROs em ratos tratados com LPS modula a adesão de plaquetas não ativadas ou ativadas por trombina.

ABSTRACT

Platelets are known as hemostatic regulators, but multiple studies have shown that platelets are important in inflammatory reactions including sepsis. Lipopolysaccharide (LPS) is a component of the outer membrane of Gram negative bacteria and has a pivotal role in inducing Gram negative sepsis. LPS triggers the production of various substances including nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) that are involved in the organ failure and death. Therefore, we investigate the role of NO and ROS in modulating the platelet adhesion of LPS-treated rats using the model of platelet adhesion to fibrinogen-coated plates. Wistar rats were injected with LPS (1 mg/kg, i.p.) and 2 to 48h thereafter the platelet adhesion was evaluated. Microtiter plates were coated with fibrinogen, and rat washed platelet suspension (6×10^6 platelets) was added to each well. Adherent platelets were quantified through measurement of acid phosphatase activity. Treatment of rats with LPS significantly increased spontaneous platelet adhesion to fibrinogen-coated plates when compared to the control rats. In contrast, in thrombin-stimulated platelets LPS reduced platelet adhesion at 6 to 48h. Chronic treatment of rats with the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME (20 mg/kg/day) for 7 days before injection with LPS reduced the increase of non-activated platelet adhesion, whereas in thrombin-activated cells no differences were found. The cGMP levels in non-activated platelets of control or LPS-treated rats were reduced by chronic treatment of animals with L-NAME. However, the levels of cGMP in thrombin-activated platelets were reduced by L-NAME only in platelets 6h after LPS-treatment. The incubation of non-activated platelets with the O_2^- scavenger PEG-SOD reversed the stimulatory effect of LPS on spontaneous adhesion, but did not affected the stimulated-platelet adhesion of non-treated or LPS-treated groups. Moreover, the treatment of rats with the antioxidant N-acetylcysteine (NAC, 150 mg/kg, i.p.) 30 min after LPS injection prevented the increase of non-activated platelet adhesion as well as significantly reduced the inhibitory effect of LPS on thrombin-stimulated adhesion. Our findings suggest that NO modulates the stimulatory effect of LPS on non-activated platelet adhesion through GMPc-independent mechanisms, but it does not take part on the inhibitory effect of LPS on thrombin-activated platelet adhesion. In addition, the systemic generation of ROS in the LPS-treated rats plays an important role in both non-activated and thrombin-activated platelet adhesion.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sepses

A sepsis é uma reação inflamatória sistêmica caracterizada por uma diminuição da atividade cardiocirculatória devido à liberação descontrolada de cininas, prostaglandinas, citocinas e óxido nítrico, com redução simultânea do débito cardíaco, sendo este fator o mais importante na sepsis (1). Desse modo, ocorre o colapso do sistema vascular (choque séptico), com déficit de oxigênio, danos vasculares e coagulação intravascular disseminada. Todo esse conjunto de fatores, por sua vez, gera danos funcionais aos sistemas renal, hepático e pulmonar, podendo culminar na disfunção múltipla de órgãos (2). A sintomatologia inicial abrange os sintomas associados, normalmente, com o quadro inflamatório agudo como febre, taquipnéia, taquicardia, hipotensão tecidual, hipóxia, acidose láctica, oligúria e edema pulmonar (1; 3).

A sepsis pode ser causada por bactérias (Gram-negativas e positivas), fungos e vírus. É um dos maiores problemas enfrentados pelos clínicos nos hospitais, sendo considerado um problema de saúde pública, por tratar-se de uma patologia de alta incidência nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (4; 5). Pesquisas mostram que, nos Estados Unidos 2 a 11% de todos os pacientes hospitalizados são devido à sepsis severa e que 30 a 60% evoluem a óbito (4; 5, 6). No Brasil, estudo publicado em 2006, cujo acompanhamento do quadro clínico se deu até o 28º dia, mostra que dos 3128 casos de internação, 521 (16,7%) foram diagnosticados como sepsis, sepsis grave ou choque séptico e que a mortalidade, nesse período, foi de 46,6% (7). Em outro estudo, publicado mais recentemente por Teles et. col. (2008) (3), os altos índices de incidência de sepsis e do choque séptico no Brasil se deve as suas dimensões equatoriais, heterogeneidade populacional e desigualdade no acesso aos serviços de saúde. Quando comparados aos demais países, a mortalidade intra-hospitalar por sepsis no Brasil é muito maior (56% contra 30% em países desenvolvidos e 45% em outros países em desenvolvimento). Em um estudo italiano (8) para avaliar o padrão microbiológico e prognóstico de bacteriemia, observou que, dentre os 20.601 pacientes hospitalizados, os patógenos mais frequentes isolados foram: bactérias Gram-negativas (44,9%), Gram-positivas (40,4%), fungo (*Candida spp.* - 3,8%) e 9,6% por vários outros agentes.

As bactérias Gram-negativas mais comumente presentes na sepsis severa e no choque séptico são: a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e espécies de

Klebsiella que desencadeiam a maior parte de seus efeitos através do lipopolissacarídeo (LPS), também conhecido como endotoxina, presente na parede desses organismos. O LPS é um componente de membrana externa de bactérias Gram-negativas e são glicolípídeos complexos constituídos de uma porção lipídica denominada lipídeo A (a qual se atribui a virulência), uma região central que possui, em geral, estrutura similar dentro de um gênero ou espécie de bactéria, e cadeias laterais O-específicas (que conferem uma identidade sorológica única às espécies de Gram-negativas) (7; 5).

O LPS pode ativar muitos tipos de células, incluindo leucócitos polimorfonucleares, monócitos, macrófagos, células endoteliais, células natural *killer* e plaquetas, levando a liberação e/ou expressão de fatores pro-inflamatórios como eicosanóides, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, espécies reativas de oxigênio (EROs), fator de ativação plaquetária (PAF) e óxido nítrico (NO) (7; 9; 10; 11, 12; 13; 14; 15).

A ligação do LPS a molécula CD14 presente na superfície de macrófagos, monócitos, neutrófilos e plaquetas, levam a ativação celular (16; 17). Uma vez que a molécula de CD14 não possui um domínio transmembrana, a sinalização intracelular ocorre através do receptor TLR (toll-like receptor). O TLR é uma glicoproteína transmembrana expressa em leucócitos, linfócitos, endotélio vascular e plaquetas, responsável pela transmissão do sinal do LPS ligado ao CD14 para o citoplasma. Até o momento, 11 membros da família TLR foram identificados em humanos e 13 em ratos. O TLR4 é responsável pelo reconhecimento da maioria das bactérias Gram-negativas (12; 18; 19; 20). O complexo CD14/TRL4 leva a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) através de uma cascata de fosforilações desencadeada pela proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (21). A ativação do NF- κ B está envolvido na ativação de genes pró-inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, proteínas de adesão, proteínas do sistema complemento e enzimas (19; 20; 22).

1.2. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs)

1.2.1. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

O LPS é capaz de gerar grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) (23; 24). Dentre as EROs mais comuns podemos citar o radical ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$). Os EROs são altamente reativos e potencialmente tóxicos, podendo reagir com muitos componentes celulares como lipídeos, proteínas estruturais, enzimas e nucleotídeos causando, geralmente, alterações danosas às funções celulares (25; 26).

Estas substâncias são oriundas de diferentes fontes como a NADPH oxidase, a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (27), ciclo-oxigenase, a isoforma 2C9 da família do citocromo P450, aminoácidos oxidases e óxido nítrico sintase desacoplada (NOS) (28; 29).

O O_2^- é mais comumente produzido na mitocôndria, onde 1-3% de todos os elétrons “escapam” da cadeia de transporte de elétrons para gera-lo ao invés de contribuir para a redução do oxigênio para a formação de água (25; 30). Além da cadeia de transporte de elétrons, a NADPH oxidase é uma importante fonte de geração de O_2^- . O protótipo das NADPH oxidase ou NOX_2 foi originalmente descrita em leucócitos e é constituída de duas subunidades presentes na membrana citoplasmática a $gp91^{phox}$ a $p22^{phox}$ e três subunidades citosólicas a $p47^{phox}$, a $p67^{phox}$ e a $p40^{phox}$, além da trifosfatase da guanosina (GTPase) Rac1 (31; 32; 33; 34; 35). Hoje são descritas 7 enzimas pertencentes a família das NADPH oxidases – a $NOX1-5$ e a $Duox 1$ e 2 (35). Logo após a formação de O_2^- , este é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD) (36).

O H_2O_2 é produzido em grandes quantidades nos peroxissomas pela ação de oxidases envolvidas no catabolismo de aminoácidos e na oxidação de ácidos graxos e é degradado pela catalase e glutathiona peroxidase (37). O H_2O_2 está envolvido na produção do radical hidroxila ($\cdot OH$), uma espécie altamente reativa e com meia-vida em solução aquosa de 1ns. O $\cdot OH$, pode ser gerado pela mieloperoxidase ou reações catalisadas pelo ferro (38). A reação de Fenton é umas das principais vias de geração de $\cdot OH$ *in vivo* através da oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} e decomposição do H_2O_2 ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$). Além disso, em situações onde há grande produção de O_2^- , a via

envolvendo a reação de Haber-Weiss pode contribuir significativamente para a produção de $\cdot\text{OH}$ ($\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \text{OH}$) (38).

1.2.2. Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs)

Uma importante ERN é o óxido nítrico (NO). O NO é um radical livre gasoso, extremamente lipofílico e possui meia-vida menor que 15seg (39; 40). A síntese do NO se dá a partir da oxidação do nitrogênio do grupo guanidino da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Esta reação é dependente da NADPH e O_2 , além de vários cofatores que incluem a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), a flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH_4) (41; 42). Foram identificadas três isoformas da NOS: tipo I (nNOS), tipo II (iNOS) e tipo III (eNOS) (43; 44). As isoformas I e III também são chamadas de constitutivas (cNOS), estão continuamente presentes nos tecidos e podem ser ativadas pelo aumento da cálcio intracelular e calmodulina. Por outro lado, a iNOS não é normalmente expressa nos tecidos, mas pode ser induzida por citocinas e produtos de bactérias. As NOS estão amplamente distribuídas pelo organismo e conseqüentemente ocorre a produção de NO em diferentes células, como células endoteliais, células epiteliais, neurônios, miócitos, fibroblastos, leucócitos e plaquetas (39; 44). O NO apresenta importante função como modulador de vários processos fisiológicos bem como patológicos incluindo neurotransmissão, relaxamento da musculatura lisa vascular, reação inflamatória e modulação da reatividade plaquetária. O mecanismo de ação do NO classicamente descrito envolve a ativação da enzima guanilil ciclase solúvel (GCs), que catalisa a conversão do GTP em GMPc. O aumento de GMPc intracelular é, portanto, responsável por muitas ações fisiológicas do NO, incluindo inibição da adesão e da agregação plaquetária. Além disso, o NO também pode promover ações independentes de GMPc como a inibição da adesão plaquetária (42; 45; 46; 47), fosforilação da p38MAPK de miócitos de pintainho (48) e a ativação de canais de K^+ ativados por Ca^{+2} (49).

1.3. Antioxidantes

Em condições normais há um balanço entre a produção de EROS e mecanismos antioxidantes de fundamental importância para a sobrevivência do organismo (50; 51; 53). Os mecanismos antioxidantes são compostos por enzimas e substâncias antioxidantes que tem por função diminuir a produção sustentada e excessiva de EROS e ERNS, que ocorre durante a sepse, por exemplo, sendo, portanto, uma possível via de tratamento para o choque e prevenção da falência múltipla de órgãos (50).

Os maiores antioxidantes enzimáticos envolvidos na decomposição catalítica de EROS são a catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e a superóxido dismutase (SOD) dentre outros (7; 53; 54). A SOD converte o O_2^- em H_2O_2 e este é reduzido a água pela catalase. Já a GPx reduz o peróxido, através da glutatona reduzida, levando a formação da glutatona oxidada (GSSG) (55).

Os antioxidantes não enzimáticos são compostos pelas vitaminas C (ácido ascórbico) e E (α -tocoferol), carotenóides (54; 56), a quercetina (encontrada em frutas – como maçãs e bagas, vegetais e em algumas bebidas – como vinho e chá), carotenóides, flavonóides, ácido lipóico, a glutatona (GSH) (53) dentre outros, levando a uma diminuição na quantidade de EROs (25).

A GSH é o principal antioxidante solúvel do citosol e desempenha importante papel na proteção do organismo contra o estresse oxidativo, sendo um co-fator para diversas enzimas desintoxicantes (57). A GSH reduz as vitaminas C e E para suas formas ativas e pode, através da glutatona-S-transferase, detoxificar aldeídos reativos (como a malondialdeído) que são geradas durante a peroxidação lipídica (57; 58). Na verdade, a razão GSH/GSSG é um índice bastante utilizado para determinar estresse oxidativo (52; 59).

A N-acetilcisteína (NAC), é um antioxidante que atua diretamente como um sequestrador de radicais livres e é um precursor da glutatona (60). Por apresentar estas características a NAC é utilizada clinicamente em pacientes com intoxicação por paracetamol (60; 61), no tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (60), na prevenção da insuficiência renal causada por contraste (61), no tratamento de algumas desordens do sistema nervoso central (SNC) (62). Além disso, a NAC também é bastante utilizada como ferramenta em estudos de estresse oxidativo (60).

1.4. Plaquetas

As plaquetas são fragmentos de megacariócitos formados na medula óssea. Esses elementos estão presentes no sangue em número aproximado de $180-350 \times 10^3/\mu\text{l}$, e possuem meia-vida na circulação de 8 a 10 dias, quando são retiradas da mesma, principalmente pelo baço e fígado (63; 64).

As plaquetas têm um papel bastante estabelecido na hemostasia primária e em eventos trombóticos. Estes elementos podem ser ativados por diferentes agonistas, incluindo ADP e trombina, através de uma seqüência de eventos intracelulares denominadas sinalização “inside-out” e “outside-in” (65).

A via “inside-out” inicia-se em resposta a ligação de um agonista solúvel ao seu receptor específico. Na sua maioria os receptores presentes em plaquetas estão acoplados à proteína Gq que levará à ativação da fosfolipase C (PLC) e, portanto formação de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). O DAG ativa a proteína quinase C (PKC), enquanto que o IP_3 libera Ca^{++} do sistema tubular denso, levando a ativação de uma série de enzimas dependentes deste íon (65; 66; 67). Estas modificações intracelulares culminam com a ativação do receptor de fibrinogênio, a integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (68). Quando o fibrinogênio (solúvel ou da matriz subendotelial) se liga ao seu receptor inicia-se a via “outside-in”. Nesta etapa dá-se a ativação de fosfatases e quinases como Src e a PI_3 -quinase que são responsáveis pela firme adesão e a estabilização do agregado plaquetário (65; 67; 69).

A adesão plaquetária corresponde ao primeiro processo hemostático de contenção do extravasamento do sangue causado por lesões físicas, químicas e fisiopatológicas tanto nas células endoteliais dos vasos quanto nos tecidos vizinhos ocorrendo, assim, a adesão de plaquetas a matriz extracelular subendotelial. As principais macromoléculas presentes na matriz subendotelial responsáveis pela adesão plaquetária são a laminina, fibronectina, colágeno, fator de von Willebrand (vWF) e fibrinogênio (70).

1.5. Plaquetas e sepse

Além de serem importantes na hemostasia primária e na formação de trombos patológicos, alguns trabalhos mostram a participação das plaquetas em processos inflamatórios como a sepse (71).

O evento que ocorre mais precocemente na sepse é a diminuição significativa do número de leucócitos e plaquetas circulantes no sangue periférico (71). Em 1991, Keen e colaboradores (72) mostraram uma queda de 15% do número de plaquetas circulantes após a injeção de LPS em voluntários sadios. O número de plaquetas acumuladas em órgãos periféricos e o grau de ativação destes elementos em humanos, determinado através da expressão de proteínas na membrana plaquetária como o CD62P e o receptor de fibrinogênio GP IIb/IIIa, apresentam correlação positiva com a severidade de sepse e com o desenvolvimento da disfunção múltipla de órgãos (24; 73).

Em 2004 foram identificados pela primeira vez em plaquetas humanas os receptores “toll-like receptors” 1 e 6 (74) e em 2005, Andonegui e colegas (12) mostraram a presença de TLR-4 funcional em plaquetas.

Nos últimos anos vêm crescendo o número de trabalhos investigando os efeitos do LPS em plaquetas, entretanto os resultados obtidos são ainda bastante controversos. A administração de LPS de *E. coli* em camundongos e ratos aumenta a adesão de plaquetas à vênulas de mesentério (75). Ainda recentemente Zhang e colaboradores (76) demonstraram que o LPS aumenta a agregação plaquetária induzida por trombina e colágeno e estimula a secreção dos grânulos densos e α . Por outro lado, alguns trabalhos mostram que o LPS inibe a agregação plaquetária induzida pelo ionóforo de Ca^{++} A23187 e colágeno (77; 78). Além disso, também foi demonstrado que o LPS de *E. coli* reduz a mobilização de Ca^{++} em plaquetas, diminui a síntese de TXA_2 e aumenta a síntese de NO (78; 79).

1.5.1. Plaquetas e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs)

Em 1977 foi demonstrado pela primeira vez que as plaquetas eram capazes de liberar EROs (80). Especula-se que as EROs liberadas pelas plaquetas estejam envolvidas em mecanismo de defesa do organismo, contribuindo para a morte de parasitas e bactérias e também contribuindo para danos vasculares em algumas patologias (81; 82; 83).

As plaquetas, assim como as demais células do organismo, possuem diversas fontes enzimáticas de produção de EROS, dentre as quais a que tem ganhado maior atenção é a NADPH oxidase, pois é ativada por agonistas que também induzem a ativação plaquetária, tais como o colágeno e o ácido araquidônico (84, 85; 86). As primeiras evidências da presença dessa enzima em plaquetas foram reportadas por Seno et al (2001) (31) que detectaram as subunidades p22^{phox} e p47^{phox} e posteriormente, foi detectada a subunidade gp91^{phox} (87; 88).

Vários trabalhos sugerem que as EROS têm um papel modulatório na atividade plaquetária (89; 90). O O₂⁻ pode aumentar a agregação induzida por trombina, colágeno, ADP ou ácido araquidônico (91). Outro estudo mostra que a inibição da NADPH oxidase e o seqüestro de O₂⁻ acarretam a redução da agregação plaquetária (92). Além disso, tem sido demonstrado que a SOD, ao diminuir a quantidade de O₂⁻, promove o aumento de NO plaquetário e assim a inibição da agregação (93).

As ERNs também podem modular a atividade plaquetária. Já está bem estabelecido que o NO inibe a adesão e a agregação plaquetária através da estimulação da guanilil ciclase levando ao aumento intracelular de GMPc (94). Mais recentemente, alguns trabalhos demonstram que o NO pode inibir a função plaquetária de modo independente de GMPc, como através da nitração e nitrosilação de proteínas (95), bem como pela inibição da mobilização de Ca⁺⁺ e inibição da PI3-quinase (96).

Já o efeito do peroxinitrito em plaquetas ainda é pouco compreendido, uma vez que este radical pode tanto ativar como inibir a função plaquetária. Em plaquetas lavadas, concentrações elevadas de peroxinitrito induzem a agregação acompanhada pela expressão de p-selectina e desgranulação (97; 98). Por outro lado, em plasma rico em plaquetas (PRP), o peróxido de nitrogênio inibe a agregação induzida por colágeno (96; 97). O peroxinitrito também é capaz de induzir a fosforilação de algumas proteínas

em plaquetas e ao mesmo tempo, inibir a fosforilação induzida por trombina bem como a expressão de p-selectina, secreção de serotonina e agregação induzida por agonistas (99). Recentemente, Schildknecht e colegas (2008) (98) demonstraram que o peroxinitrito endógeno ativa a cicloxigenase-1 levando a um aumento da síntese de TXA₂ e, conseqüentemente, aumento da agregação plaquetária.

1.6. OBJETIVOS

Considerando o exposto acima, podemos notar que a ativação plaquetária parece contribuir significativamente para a evolução do quadro séptico. Entretanto, os estudos realizados até o momento com o LPS na adesão plaquetária são pouco numerosos e conflitantes. Além disso, vários trabalhos têm sugerido que as EROs e ERNs, liberadas em grandes quantidades na sepse, possuem um papel modulatório na atividade plaquetária. Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi investigar o envolvimento das EROs e ERNs na modulação da adesão plaquetária de ratos tratados com LPS.

Objetivos específicos foram:

- ❖ Investigar os efeitos do tratamento de ratos com LPS em diferentes intervalos de tempo (2 – 48h) na adesão de plaquetas ao fibrinogênio;
- ❖ Investigar os efeitos da incubação de plaquetas de ratos tratados com LPS com o seqüestrador de O_2^- PEG-SOD na adesão plaquetária;
- ❖ Investigar os efeitos do tratamento de ratos com o antioxidante NAC na adesão de plaquetas de ratos injetados com LPS;
- ❖ Investigar os efeitos do tratamento crônico de ratos com o inibidor da NO sintase L-NAME na adesão de plaquetas de ratos injetados com LPS.
- ❖ Determinar os níveis de GMPc em plaquetas de ratos tratados com LPS.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, pesando 250-340g, provenientes do Centro Multinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – Unicamp). Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA – IB – UNICAMP, protocolo nº 1368-1. Os animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia (Faculdade de Ciências Médicas), onde foram mantidos a 24°C, com iluminação diária de 12h e com água e alimento *ad libitum*.

2.2. Padronização da quantidade de LPS utilizada na realização dos protocolos experimentais

Ratos Wistar machos (250-350g) receberam uma única injeção i.p. de quantidades crescentes de LPS (0,5, 1 e 2 mg/kg) como mostrado na literatura. Os animais foram mantidos sob observação por 72h e a quantidade de LPS escolhida foi aquela que não causou a morte do animal, mas ao mesmo tempo levou a uma significativa redução do número de plaquetas circulantes.

2.3. Protocolo Experimental

Ratos Wistar machos (250-350g) receberam uma única injeção i.p. (1mg/kg) de solução de LPS (Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* soro tipo 01- B:111). Após 2, 6, 8 e 48hs do tratamento com o LPS, os animais foram anestesiados com isoflurano e uma incisão longitudinal no abdômen foi feita para a coleta de sangue arterial obtido do ramo descendente da artéria aorta. Os ratos controle receberam uma injeção i.p. de solução fisiológica de mesmo volume que aqueles tratados com LPS. Um segundo grupo experimental foi realizado, onde os ratos, 30min após a injeção com o LPS, foram tratados com N-acetilcisteína (150mg/kg i.p). Finalmente, em um terceiro grupo experimental os animais foram tratados com L-NAME (20mg/kg/rato/dia) na água de

beber por um período de 7 dias. Ao final deste período os animais foram injetados com LPS i.p. (1mg/kg) e pós 6, 8 e 48hs, ainda mantendo-se o tratamento com o L-NAME, o sangue foi coletado.

2.4. Obtenção de Plaquetas Lavadas

O sangue dos animais foi colocado em ACD-C (citrato de sódio 12,4 mM, ácido cítrico 13 mM e glicose 11 mM) (9:1 v/v). Primeiramente foi obtido o PRP (plasma rico em plaqueta) através da centrifugação do sangue total a 200g em temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, 3ml de PRP foi adicionados a 4ml de tampão de lavagem (NaCl 140 mM, KCl 0,5 mM, citrato trisódico 12mM, glicose 10 mM e sacarose 12,5 mM, pH 6) e centrifugado por 13 min a 800 g. O precipitado plaquetário foi ressuspensão em 7 ml de tampão de lavagem e a suspensão novamente centrifugada a 800 g por 13 min. Finalmente, as plaquetas foram ressuspensas em solução de Krebs-Ringer desprovida de Ca^{++} e o número de plaquetas foi ajustado para $1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml através de contagem manual utilizando-se câmara de Neubauer. Ao final, foi adicionado cloreto de cálcio à suspensão plaquetária, para uma concentração final de 1mM.

2.5. Ensaio de Adesão Plaquetária

Os ensaios de adesão foram realizados como descrito anteriormente por Bellavite et al (1994) (100), e detalhado a seguir. Microplacas contendo 96 poços foram revestidas com fibrinogênio (50 μ l/poço), e mantidas por 16h à 4°C. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com solução de Krebs-Ringer desprovida de cálcio (200 μ l/poço). Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 100 μ l /poço de BAS (1%). Após 60 min à 37°C, o BSA foi removido e microplaca lavada duas vezes com solução de Krebs-Ringer desprovida de cálcio (200 μ l/poço). A suspensão de plaquetas (50 μ l de $1,2 \times 10^8$ plaqueta/ml) foi adicionada aos poços na ausência ou na presença de trombina (1 – 50 mU/ml). Em alguns protocolos experimentais as plaquetas forma pré-incubadas com PEG-SOD (30 U/ml), por 5 min em temperatura ambiente, antes da adição da solução de Krebs ou trombina. Após 30 min, as plaquetas não aderidas foram removidas e os poços foram lavados duas vezes com solução de Krebs-Ringer (200 μ l/poço). Em seguida, foi adicionado 150 μ l/poço do substrato da fosfatase ácida (p-

nitrofenilfosfato 5mM em tampão citrato 0,1 M pH 5,4 contendo Triton X-100 - 0,1%). Após a incubação em temperatura ambiente por 60 min, a reação foi interrompida adicionando-se 100 µl de NaOH 2 N.

As leituras foram feitas em leitor de ELISA à 405 nm. A porcentagem de células aderidas foi calculada em relação a uma curva padrão onde se adicionou concentrações conhecidas de plaquetas ($0 - 6 \times 10^6$ plaquetas/poço) aos poços não revestidos com fibrinogênio.

2.6.Determinação da Pressão Arterial Caudal

As pressões dos animais foram determinadas antes de se iniciar o tratamento com L-NAME, 7 dias após o início do tratamento e antes do sacrifício dos animais (após a injeção de salina ou LPS). Para a medida das pressões arteriais, os animais foram colocados em gaiolas aquecidas à temperatura de aproximadamente 38°C por 20 minutos, para provocar dilatação dos vasos caudais. Após este período, os animais foram colocados em um contensor modelo 1262 (Narco Bio Systems, inc, Houston, Texas, EUA). Na cauda do animal, adaptou-se um manguito acoplado a um sistema de microfones capaz de captar sinais de 0,5 mv de amplitude. O registro foi visualizado através de um osciloscópio modelo CS 4025 (Kenwood Corporation, Japão). O manguito foi inflado até 200 mmHg, de modo a não se visualizarem suas pulsações. Em seguida era desinsuflado até reiniciarem as pulsações, e o valor da pressão arterial era lido no manômetro (Zatz, 1990) (101). As medidas foram consideradas válidas com ou na ausência de variações significativas, isto é, acima de 5 mmHg. Estas medidas de pressão arterial foram realizadas em sala isolada e silenciosa.

2.7. Determinação de GMPc

As plaquetas, de ratos controle ou injetados com LPS, foram isoladas como descrito anteriormente e ressuspensas em Krebs-Ringer numa concentração final de $1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml. Em seguida, as plaquetas foram incubadas à temperatura ambiente com 2 mM de IBMX (inibidor inespecífico de fosfodiesterase) por 30 min. Em seguida, as plaquetas foram incubadas com solução de Krebs-Ringer ou trombina (30 mU/ml) por 30 min. Em alguns protocolos as plaquetas foram pré-incubadas por 5 min com PEG-SOD (30 U/ml). A incubação foi interrompida adicionando-se duas partes de

etanol acidificado gelado (99%) para uma parte de suspensão plaquetária, e as amostras agitadas manualmente, com vigor, por aproximadamente 30 segundos. Em seguida, as amostras foram incubadas em gelo por 30 min e centrifugadas a 4000g, 4°C, por 30 min. Os sobrenadantes das amostras foram recolhidos e guardados, sendo os precipitados lavados com 0,5 ml de etanol acidificado gelado (67%), centrifugados novamente à 14000g à temperatura ambiente por 5 min. Estes sobrenadantes foram adicionados aos primeiros. As amostras foram secas à 55-60°C em banho-maria, sob fluxo de nitrogênio, e estocadas à -20°C.

Os níveis de GMPc foram quantificados utilizando-se Kit Cayman (Michigan, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Cada amostra, proveniente de 6×10^6 plaquetas, foi quantificada em duplicata e os resultados expressos em pmol/ml.

2.8. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias (EPM) de n experimentos. Diferenças estatísticas significativas foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni. O teste t de Student não-pareado, ou pareado, foi usado para comparar grupos específicos quando apropriado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3. Resultados

3.1 Efeito do tratamento de ratos com LPS na adesão plaquetária ao fibrinogênio

A figura 1A mostra que a incubação de plaquetas não ativadas de ratos controle em placas recobertas com fibrinogênio induziu significativa adesão aos 30 min ($5.3 \pm 0.2\%$). A adesão de plaquetas de ratos 2, 6 e 8h após a injeção de LPS (1 mg/kg, i.p.) foi significativamente maior que a adesão de plaquetas de ratos controle (37%, 53% e 68% de aumento da adesão, respectivamente) (figura 1A). Já em 48h, a adesão retornou para valores semelhantes aos observados em plaquetas de ratos controle. A ativação de plaquetas com trombina (1-30 mU/ml) induziu uma adesão significativamente maior quando comparada a adesão de plaquetas não ativadas, tanto de ratos controle como de ratos tratados com LPS (figura 1B). O efeito da trombina na adesão de plaquetas de ratos não foi dependente da concentração do agonista, na verdade, trata-se de um efeito tudo ou nada, já que em concentração menor de trombina (0.3 mU/ml) não foi observado nenhuma modificação com relação a adesão de plaquetas não ativadas (resultados não mostrados). Diferente do observado na adesão de plaquetas não ativadas, o tratamento de ratos com LPS em 6 e 8h reduziu significativamente a adesão (figura 1B). Em 48h, a adesão causada por concentrações menores de trombina é maior do que a observada 6 ou 8h após a injeção de LPS, entretanto, ainda é menor do que a observada em plaquetas controle. A adesão plaquetária não foi afetada pelo tratamento de ratos com LPS após 2h (figura 1B).

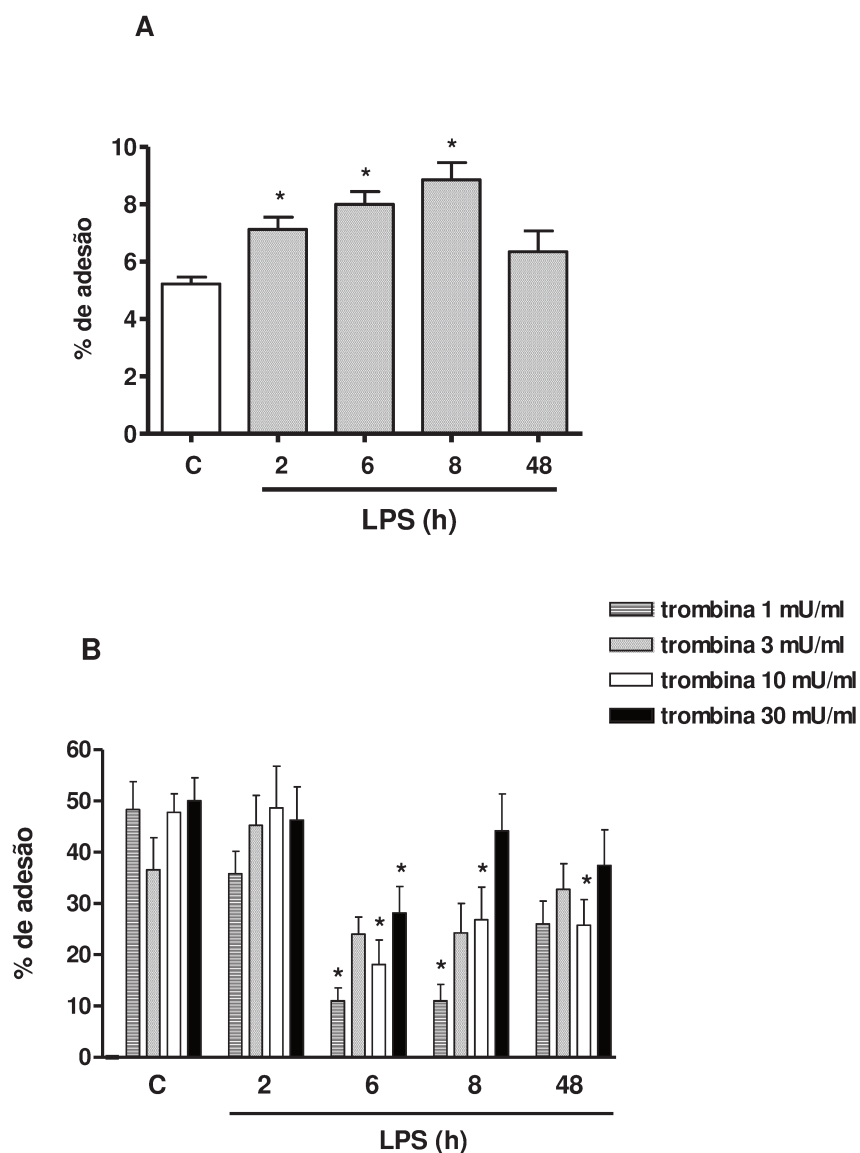


Figura 1- Efeito do tratamento de ratos com LPS na adesão de plaquetas ao fibrinogênio. Os ratos foram injetados com salina ou com LPS (1mg/kg, i.p.) e após 2 - 48h o sangue foi coletado. As plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço), não ativadas (painel A) ou ativadas por trombina (1-30 mU/ml) (painel B), foram incubadas em placas recobertas com fibrinogênio por 30 min. Os resultados estão apresentados como média da porcentagem de plaquetas aderidas à placa \pm E.P.M. provenientes de 4-10 animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle. C = controle.

3.2. Efeito do pré-tratamento crônico de animais com o inibidor inespecífico da óxido nítrico sintase (L-NAME) na adesão de plaquetas de ratos injetados com LPS

Os ratos foram tratados com L-NAME (20mg/kg/dia) na água de beber durante 7 dias com o objetivo de investigarmos o papel do NO, liberado sistemicamente nos ratos injetados com LPS, na adesão plaquetária. A pressão arterial dos animais foi aferida para nos certificar da eficiência do tratamento dos animais com L-NAME. Como mostrado na tabela 1, o tratamento dos animais com L-NAME causou um aumento significativo da pressão arterial no sétimo dia. Porém, a injeção dos ratos com LPS levou a uma redução do aumento da pressão arterial, mas a mesma ainda foi significativamente maior quando comparada aos animais antes do início do tratamento com L-NAME.

Tabela 1 – Pressão arterial dos animais pré-tratados cronicamente com L-NAME antes e após a injeção de LPS

	Pressão Caudal Inicial	Pressão Caudal 7 Dias Após o Início Do Tratamento com L-NAME	Pressão Caudal Final Após injeção de LPS
Controle	91,67 ± 3,07	-	-
Controle + L-NAME	86,67 ± 3,33	160 ± 5,77*	-
LPS 6hs	96,67 ± 3,33	186,7 ± 3,33*	163 ± 3,33 * [#]
LPS 48hs	96,67 ± 3,33	170 ± 5,77*	146 ± 8,8* [#]

A pressão arterial dos animais foi determinada pelo método de tail-cuff antes do início do tratamento com L-NAME (20 mg/kg/dia), após 7 dias de tratamento e após a injeção com LPS (1mg/kg, i.p.). Os resultados representam as médias ± S.E.M. de 3 de ratos. * $P < 0,05$ comparado à pressão arterial inicial; [#] $P < 0,05$ comparado a pressão arterial do grupo tratado com L-NAME antes da injeção de LPS.

O tratamento de ratos por 7 dias com L-NAME antes da injeção com salina causou um aumento pequeno, mas significativo da adesão de plaquetas não ativadas (fig. 2A). Entretanto, a adesão de plaquetas de ratos 6h após a injeção de LPS foi significativamente reduzida pelo pré-tratamento crônico dos animais com L-NAME à valores semelhantes aos observados com plaquetas de ratos controles (fig. 2A). O tratamento crônico com L-NAME não modificou a adesão de plaquetas não ativadas de ratos 48h após a injeção com LPS. O pré-tratamento crônico dos animais com L-NAME não modificou a adesão de plaquetas ativadas com trombina (30 mU/ml) de ratos injetados com salina ou LPS (fig. 2B).

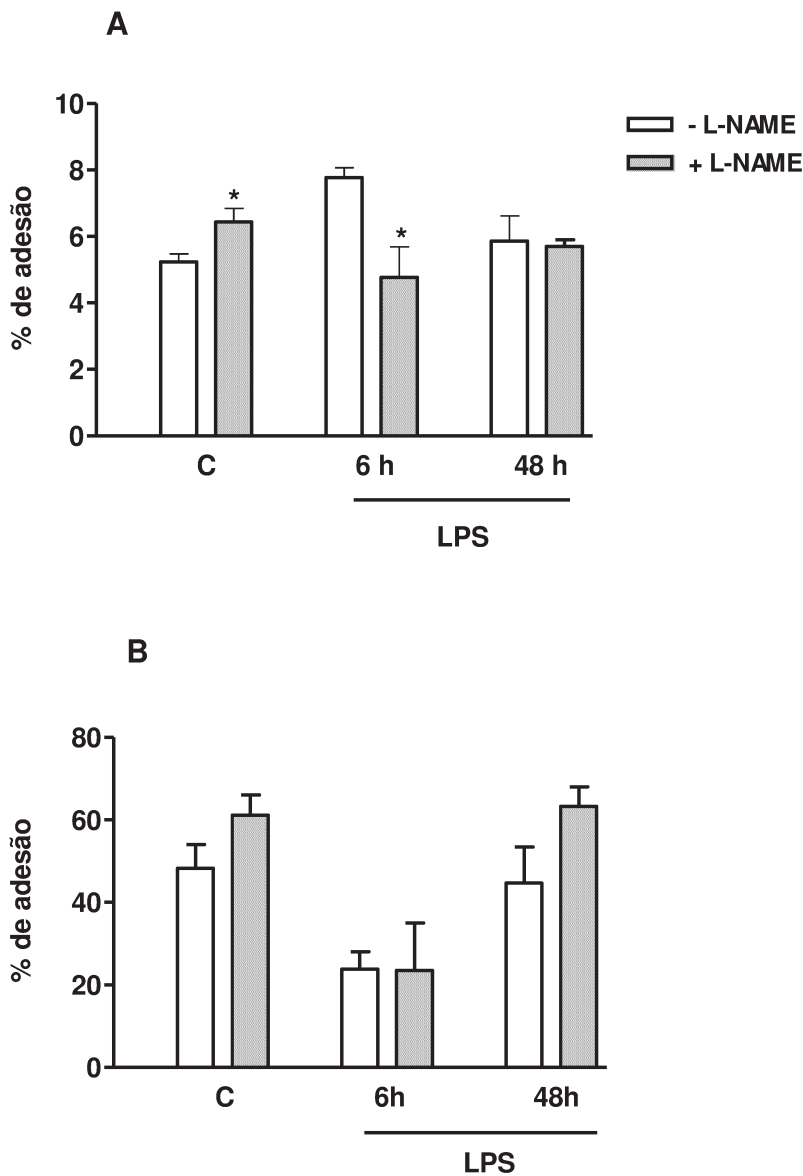


Figura 2- Efeito de pré-tratamento crônico com L-NAME na adesão de plaquetas de ratos injetados com LPS. Os animais foram tratados com L-NAME (20mg/kg/dia) na água de beber por um período de 7 dias. Ao final deste período os animais foram injetados com salina ou LPS (1mg/kg, i.p.) e pós 6, 8 e 48hs, ainda mantendo-se o tratamento com o L-NAME, o sangue foi coletado. As plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço), não ativadas (painel A) ou ativadas por trombina (30 mU/ml) (painel B), foram incubadas em placas recobertas com fibrinogênio por 30 min. Os resultados estão apresentados como média da porcentagem de plaquetas aderidas à placa \pm E.P.M. provenientes de 3-8 animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo não tratado com L-NAME. C = controle.

3.3. Efeito da incubação de PEG-SOD com plaquetas de ratos injetados com LPS na adesão plaquetária

A incubação de plaquetas controle com PEG-SOD (30 U/ml) por 5 min inibiu significativamente a adesão de plaquetas não ativadas (23% de inibição, figura 4A). Da mesma forma, a PEG-SOD reduziu a adesão de plaquetas de ratos 6h após a injeção com LPS para valores semelhantes ao do grupo controle ($5,2\pm 0,2\%$, $7,8\pm 0,3\%$ e $5,1\pm 0,9\%$ de adesão para os grupos controle, 6h após a injeção de LPS e plaquetas de ratos tratados com LPS e incubadas com PEG-SOD, respectivamente). Já a adesão de plaquetas 48h após a injeção de LPS não foi afetada pela incubação com PEG-SOD (figura 4A).

A adesão de plaquetas controle ativadas por trombina (30 mU/ml) não foi modificada pela PEG-SOD (figura 4B). De modo semelhante, a incubação de PEG-SOD com plaquetas provenientes de ratos tratados com LPS, após 6 ou 48h, não alterou a adesão de plaquetas ativadas por trombina (figura 4B).

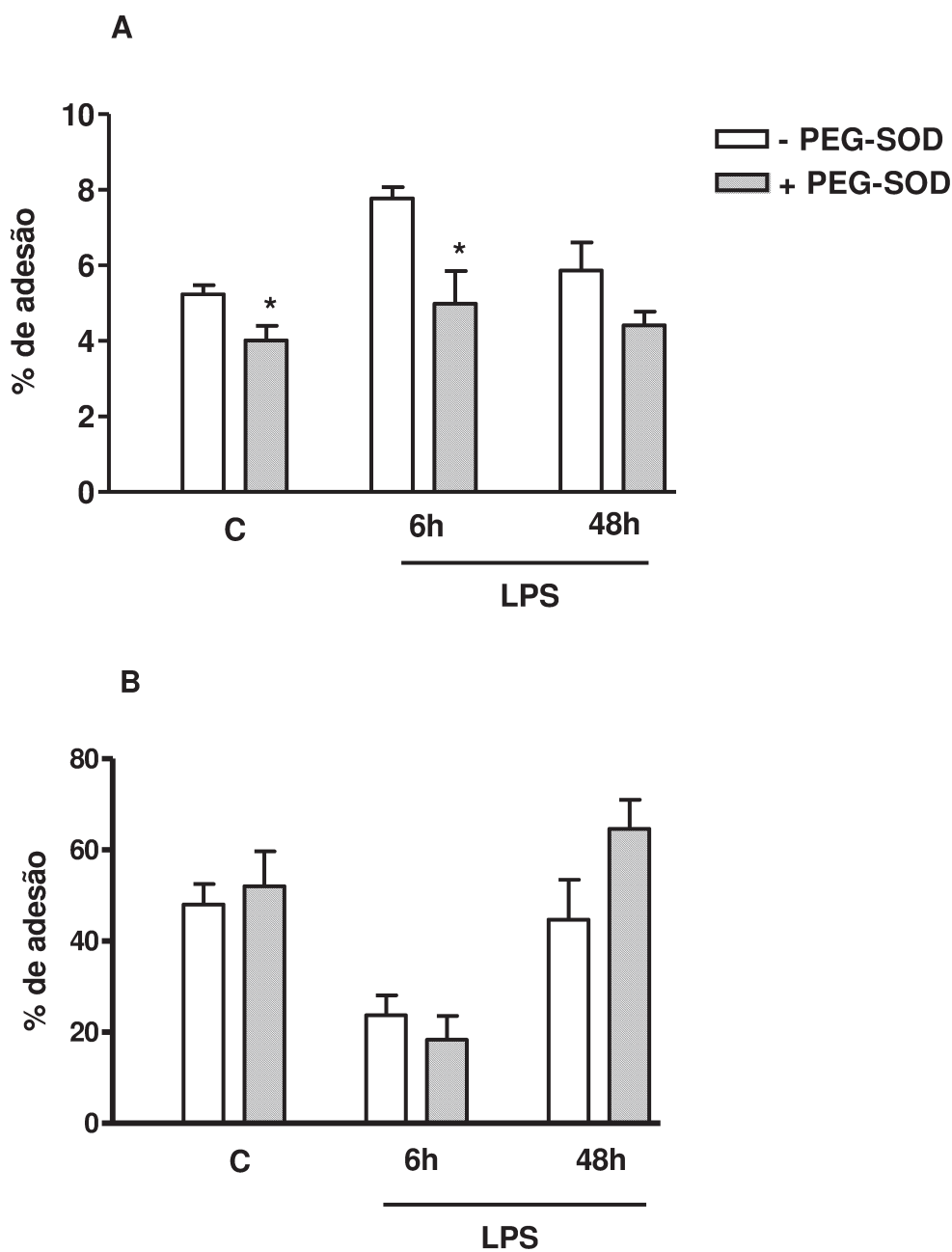


Figura 3- Efeito da PEG-SOD na adesão de plaquetas de ratos injetados com LPS.

Os ratos foram injetados com salina ou com LPS (1mg/Kg,i.p.) e após 6 ou 48h o sangue foi coletado. As plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço), não ativadas (painel A) ou ativadas por trombina (30 mU/ml) (painel B), foram pré-incubadas com PEG-SOD (30 U/ml) e a adesão foi avaliada após 30 min. Os resultados estão apresentados como média da porcentagem de plaquetas aderidas à placa \pm E.P.M. provenientes de 3-8 animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado à adesão de plaquetas não incubadas com PEG-SOD. C = controle

3.4.Determinação dos níveis de GMPc em plaquetas de ratos tratados com LPS

Os níveis de GMPc em plaquetas não ativadas de ratos 6 ou 48h após a injeção de LPS foram semelhantes aos observados no grupo controle (figura 3A). Além disso, a ativação das plaquetas com trombina (30 mU/ml), seja no grupo controle ou tratado com LPS, não modificou os níveis de GMPc quando comparado às plaquetas não ativadas (figura 3B). A incubação de plaquetas não ativadas de ratos controle com SNP 100 μ M, um doador de NO usado como controle positivo de nossos experimentos, elevou os níveis de GMPc para $4,4 \pm 0.3$ pmol/ml (resultado não mostrado).

A incubação de PEG-SOD (30 U/ml) com plaquetas não ativadas de ratos 6h após a injeção com LPS aumentou, de forma marcante, os níveis de GMPc com relação à plaquetas de ratos tratados com LPS na ausência do seqüestrador de O_2^- (aumento de 37%). Por outro lado, a PEG-SOD não alterou os níveis de GMPc em plaquetas de nenhum outro grupo estudado, seja de ratos controle ou tratados com LPS e, não importando o estado de ativação destes elementos (figura 3).

O tratamento crônico de ratos com L-NAME (20 mg/kg/rato/dia, durante 7 dias) reduziu, apesar de não ser estatisticamente significativa, os níveis de GMPc em plaquetas não ativadas do grupo controle (redução de 26%) e do grupo tratado com LPS (redução de 30 e 24% em 6 e 48h, respectivamente), quando comparado com seus respectivos controles (figura 3A). Os níveis de GMPc em plaquetas ativadas por trombina do grupo controle, ou dos animais 48h após a injeção de LPS, não foi modificado pelo tratamento com L-NAME. Entretanto, o tratamento de ratos com L-NAME reduziu em 30% os níveis de GMPc de plaquetas ativadas de animais 6h após a injeção de LPS quando comparado ao seu respectivo controle, ou seja, plaquetas de ratos que foram expostos somente ao LPS (figura 3B).

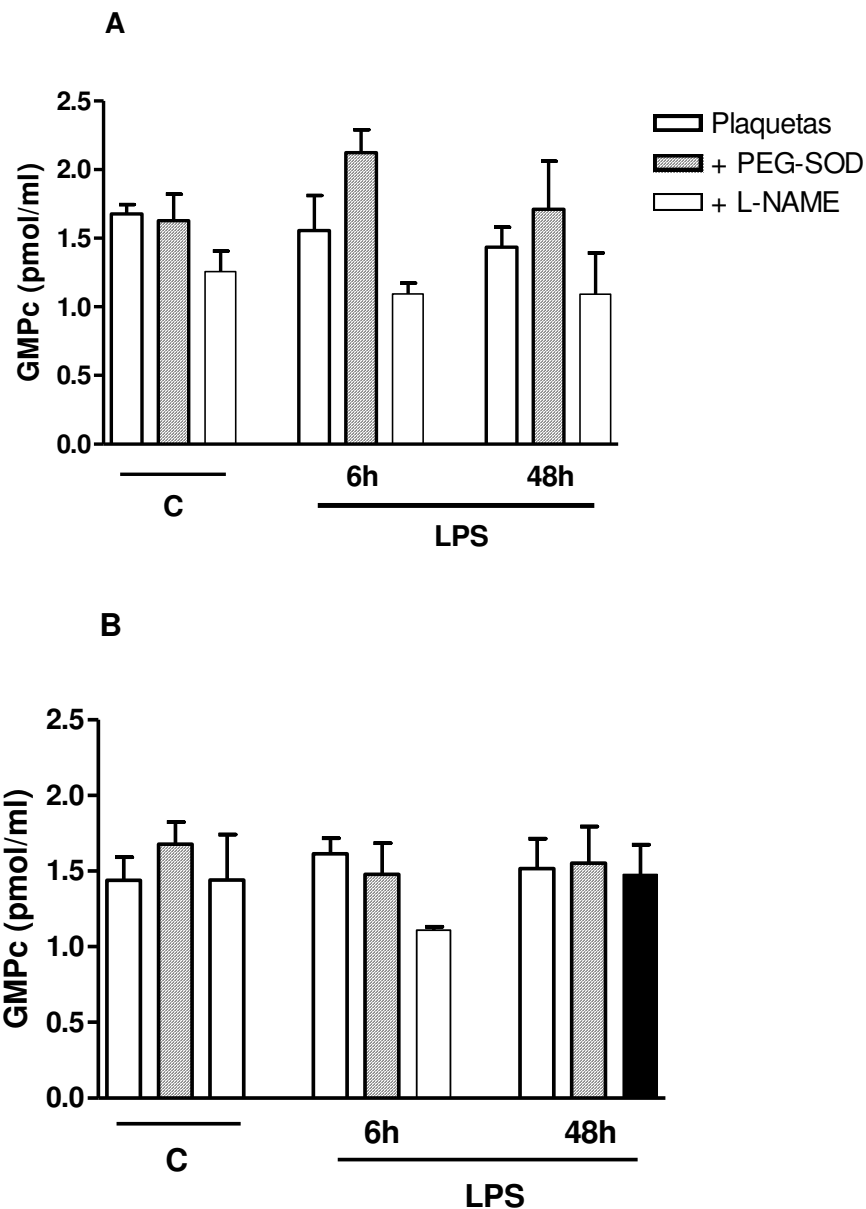


Figura 4 – Efeito do tratamento crônico de ratos com o inibidor da NO sintase (L-NAME) nos níveis de GMPC de plaquetas de animais injetados com LPS. Os ratos foram tratados cronicamente com L-NAME (20 mg/kg/dia) durante 7 dias, quando então foram injetados com salina (controle) ou LPS (1 mg/kg, i.p.) e, após 6 ou 48h, o sangue foi coletado. Os níveis de GMPC foram determinados em plaquetas não ativadas (painel A) e ativadas com 30 mU/ml de trombina (painel B), pré-incubadas ou não com PEG-SOD (30 U/ml). Os resultados representam a média \pm E.P.M. de 4 animais por grupo. C = controle.

3.5. Efeito do tratamento de ratos com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) na adesão plaquetária de ratos injetados com LPS

A injeção de ratos com NAC (150 mg/kg, i.p.) 30 min após a administração de salina não modificou a adesão de plaquetas não ativadas ou ativadas com trombina (30 mU/ml) (figura 3A). A adesão de plaquetas de ratos 6h após a injeção de LPS foi reduzida por NAC para valores observados no grupo controle (5.3 ± 0.2 e $5.7\pm 0.4\%$ de adesão de plaquetas controles, na presença e ausência de NAC, respectivamente; 7.8 ± 0.4 e $5.4\pm 0.9\%$ de adesão de plaquetas de ratos tratados com LPS em 6h na presença e ausência de NAC, respectivamente). A NAC não afetou a adesão de plaquetas não ativadas de ratos 48h após a injeção com LPS (figura 3A).

Como observado com plaquetas não ativadas, a adesão de plaquetas ativadas com trombina (30 mU/ml) não foi alterada com a administração de NAC (figura 3B). O tratamento de ratos com NAC aumentou significativamente a adesão de plaquetas ativadas de ratos 6h após a injeção com LPS (46% de aumento), entretanto, a adesão ainda permaneceu marcadamente menor do que a observada no grupo controle (figura 3 B). A adesão de plaquetas ativadas de ratos 48h após a injeção com LPS não foi afetada pelo tratamento dos animais com NAC.

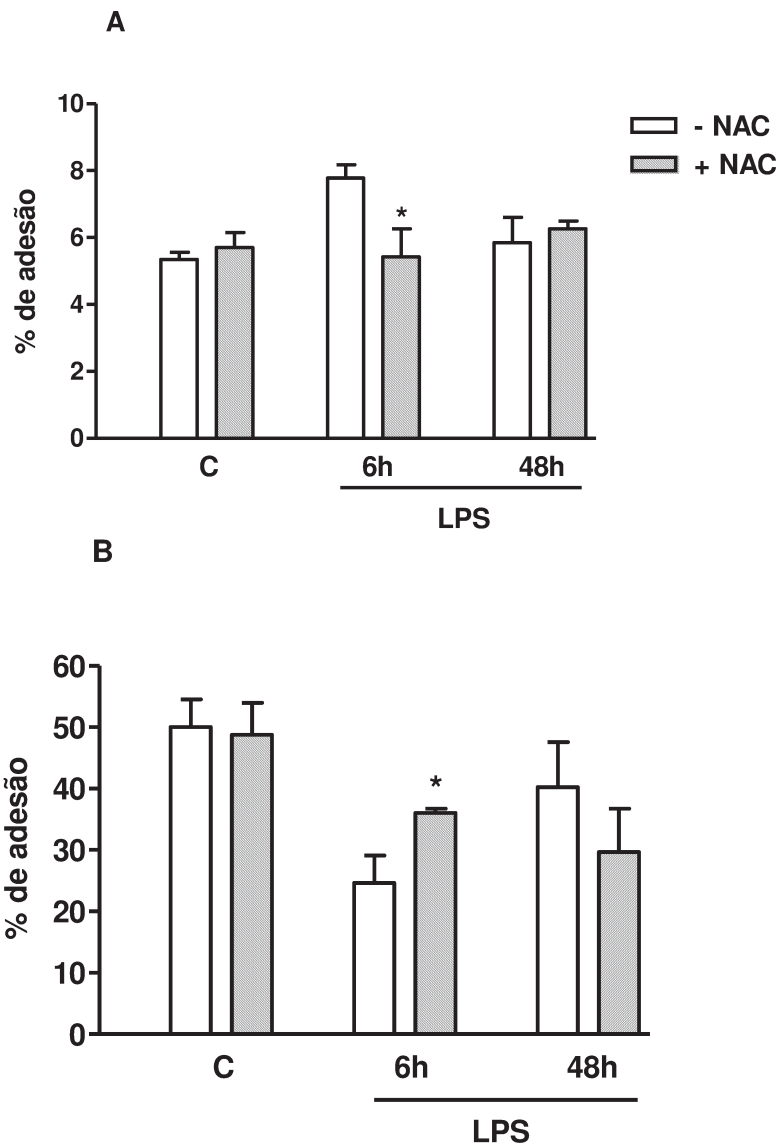


Figura 5- Efeito do tratamento de ratos com NAC na adesão de plaquetas de ratos injetados com LPS. Os animais foram tratados com o antioxidante NAC (150 mg/kg, i.p.) 30 min após a injeção de salina ou LPS (1mg/kg, i.p.). O sangue de ratos controles foi coletado 2h após a injeção de NAC e após 6 ou 48h da injeção de LPS. As plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço), não ativadas (painel A) ou ativadas por trombina (30 mU/ml) (painel B), foram incubadas em placas recobertas com fibrinogênio por 30 min. Os resultados estão apresentados como média da porcentagem de plaquetas aderidas à placa \pm E.P.M. provenientes de 4-8 animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado com o respectivo grupo não tratado com NAC. C = controle.

4. Discussão

A importância das plaquetas na hemostasia já é bastante reconhecida, mas nos últimos anos vêm aumentando as evidências que sugerem um papel importante desses elementos em reações inflamatórias, incluindo a sepse. A evidência mais clara do envolvimento das plaquetas na patogênese da sepse é a marcante trombocitopenia, provavelmente decorrente do acúmulo desses elementos no pulmão e fígado (62; 71; 102). Além disso, alguns trabalhos mostram que a gravidade da sepse se correlaciona positivamente com a diminuição da contagem de plaquetas bem como o seu grau de ativação (24; 73; 103).

Vários estudos mostram que a administração de LPS em animais e humanos leva a vários sinais observados na sepse como trombocitopenia, leucopenia, febre, aumento de concentração de interleucinas circulantes, aumento da produção de NO e EROS (71; 104; 105). Apesar de numerosos estudos investigando a ação do LPS em plaquetas, os dados continuam controversos, variando de acordo com o protocolo experimental empregado e a fonte de LPS. Estudos prévios mostraram que em alguns casos o LPS promove a inibição plaquetária (71; 77; 78; 106), outros grupos nenhum efeito (107; 108; 109) e ainda há grupos que observaram a ativação da adesão ou da agregação plaquetária (75; 76; 110; 111; 112).

A adesão plaquetária é considerada o passo mais importante para o processo hemostático. Defeitos genéticos (ou adquiridos) na adesão plaquetária podem comprometer seriamente o processo hemostático, levando ao aumento do risco de desordens vasculares. Portanto, este trabalho teve como objetivo aprofundar os conhecimentos sobre o efeito da exposição de animais ao LPS em plaquetas, bem como investigar o efeito modulatório de EROS e NO, liberados nestas condições, na adesão plaquetária.

Para investigar os efeitos do LPS na adesão plaquetária utilizamos microplacas recobertas com fibrinogênio para mimetizar o processo de adesão à matriz vascular, uma vez que, sabidamente, o fibrinogênio *in vivo*, além da forma solúvel, pode ser encontrado imobilizado na superfície de plaquetas ativadas e depositado na parede vascular no local do dano (113; 114; 115).

Em nosso trabalho, observamos que o tratamento de ratos com LPS aumentou a adesão espontânea de plaquetas ao fibrinogênio, mas diminuiu significativamente a adesão de plaquetas ativadas por trombina. Em 2001, Saluk-Juszczak e colaboradores (82), utilizando LPS de *P. mirabilis* e incubando este com plaquetas *in vitro*, também demonstraram que a incubação de plaquetas com LPS era capaz de aumentar a adesão de plaquetas não ativadas ao colágeno e inibir a adesão de plaquetas ativadas por trombina.

A NAC, um antioxidante largamente utilizado em estudos de estresse oxidativo, é capaz de seqüestrar ROS, aumentar o conteúdo celular de glutathione e inibir a NADPH oxidase (116). Tem sido demonstrado que a NAC é capaz de inibir diferentes efeitos causados pelo LPS incluindo diminuição da expressão de TLR4 em célula da musculatura lisa vascular (117), diminuição de danos renais, cardíacos e hepáticos em ratos (118), diminuição da febre em coelhos (119), diminuição da ativação do fator NF- κ B e da produção de TNF- α (120) através da redução da geração de EROS e/ou aumento da produção de glutathione. Nossos resultados mostram que o aumento da adesão espontânea de plaquetas de ratos 6h após a injeção de LPS foi diminuído nos animais que foram tratados com NAC, indicando que o aumento da adesão espontânea nestes animais é mediado pelo aumento sistêmico da geração de ROS. De fato, Cerwinka e colaboradores (87) demonstraram, através de microscopia intravital, que a administração de LPS em camundongos causava um aumento da adesão de plaquetas em vênulas de intestino e que este aumento era mediado por O_2^- proveniente de neutrófilos.

Alguns estudos mostram que a produção de EROs aumenta a ativação do receptor de fibrinogênio em plaquetas (34; 121; 122). Já está bem estabelecido que em plaquetas não ativadas o receptor de fibrinogênio, integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou glicoproteína IIb-IIIa, está no estado de baixa afinidade (120). Há evidências que a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ pode ser regulada em diferentes sítios por agentes oxidantes. A oxidação da porção externa deste receptor tem efeito pró-agregante, provavelmente por estabilizar a interação com seu ligante (121; 122), enquanto que a porção intracelular da cadeia β_3 do receptor de fibrinogênio pode ser fosforilada pela adição de H_2O_2 , etapa importante na sinalização “outside-in” da ativação plaquetária (123).

Além da geração sistêmica, as EROs geradas pelas próprias plaquetas também parecem participar no aumento da adesão espontânea de plaquetas de ratos tratados com LPS já que a incubação desses elementos com a PEG-SOD, um seqüestrador de O_2^- ,

também reduziu significativamente este efeito. Já foi demonstrado em trabalhos prévios que o LPS de *Chlamydia pneumoniae* e *Proteus mirabilis* leva a um aumento da produção de ROS em plaquetas (26; 111; 124). Resultados do nosso grupo, ainda não publicados, mostram que a administração de LPS de *E. coli* em ratos induz aumento da produção de ROS em plaquetas *in vitro*. Portanto, a geração aumentada de O_2^- em plaquetas de ratos tratados com LPS contribui para o aumento da adesão plaquetária. Em 1977, Handin e colaboradores (91) demonstraram que a incubação de plaquetas humanas com o sistema gerador de O_2^- , xantina-xantina oxidase, causou agregação plaquetária com concomitante liberação de serotonina. A PEG-SOD converte o O_2^- em H_2O_2 , portanto, esta espécie reativa poderia contribuir para a diminuição da adesão de plaquetas de ratos injetados com LPS causada por PEG-SOD. Há muito tempo vem sendo estudado o efeito de H_2O_2 sobre a ativação plaquetária e os resultados obtidos são bastante controversos, uma vez que, alguns autores descrevem o H_2O_2 como inibidor da ativação plaquetária, enquanto outros, como ativador plaquetário. A incubação de plaquetas com o sistema gerador de H_2O_2 , glicose-glicose oxidase, causa inibição da agregação induzida por ADP, colágeno e pelo análogo do TXA_2 U-46619 (91). Por outro lado, Pignatelli et al. (1998) (125) demonstraram que em plaquetas a catalase, enzima responsável pela transformação do H_2O_2 em água e oxigênio, inibe a produção de TXA_2 e IP_3 induzida pelo colágeno. Ainda, Belisario e colegas (2000) (115) observaram que o H_2O_2 não apresenta qualquer efeito na adesão de plaquetas ao fibrinogênio imobilizado. Desta forma, é difícil descartar que o H_2O_2 seja o responsável pelo efeito da incubação de plaquetas com a PEG-SOD.

Com o objetivo de investigarmos se o NO produzido sistemicamente estaria envolvido na modulação do efeito estimulatório do LPS na adesão de plaquetas não ativadas, os ratos foram tratados cronicamente com L-NAME. Para nos certificar que o tratamento crônico com L-NAME foi efetivo, foi feita a aferição da pressão arterial dos animais após o período de 7 dias, já que este modelo experimental é bastante utilizado como modelo de hipertensão (126). Em todos os grupos estudados, foi observado um significativo aumento da pressão arterial nos animais tratados com L-NAME quando comparado aos ratos controles, comprovando a eficácia do tratamento. Como o esperado, o tratamento crônico dos animais com L-NAME aumentou a adesão de plaquetas de ratos controle, indicando o papel modulatório do NO neste processo. Há vários trabalhos na literatura descrevendo o efeito inibitório do NO na adesão plaquetária através de mecanismos dependentes e independentes de $GMPC$ (47; 127).

Por outro lado, o tratamento crônico com L-NAME reduziu a adesão de plaquetas de ratos 6h após a injeção de LPS para valores semelhantes aos observados no grupo controle. Este resultado foi surpreendente já que o L-NAME reduz a produção de NO, um potente inibidor da ativação plaquetária, e ao mesmo tempo aumenta, indiretamente, a biodisponibilidade do estimulador da atividade plaquetária O_2^- , por impedir sua reação com o NO e formação do peroxinitrito ($ONOO^-$). Os nossos resultados, através da determinação de GMPc, comprovam estes fatos já que o tratamento de ratos com L-NAME causou uma redução deste segundo mensageiro em plaquetas não ativadas de animais injetados com LPS em 6h e, aumento marcante em plaquetas incubadas com PEG-SOD.

O $ONOO^-$ poderia contribuir para o aumento da adesão de plaquetas não ativadas observado nos ratos expostos ao LPS, já que tanto o L-NAME, NAC e SOD reduziram este efeito. Esta ERN apresenta efeitos bastante controversos em plaquetas, ora ativando ora inibindo estes elementos (96). A incubação de plaquetas humanas com peroxinitrito induz agregação de plaquetas lavadas, aumento da expressão de p-selectina e aumento da concentração de Ca^{++} citosólico (96; 97; 125). Mais recentemente, foi demonstrado que o $ONOO^-$, formado endogenamente em plaquetas ativadas, causa aumento da ativação da cicloxigenase 1 (COX-1), com conseqüente aumento da produção de TXA_2 e aumento da agregação plaquetária, sendo estes efeito inibidos pela pré-incubação de plaquetas com apocinina (inibidor da NADPH-oxidase), PEG-SOD, L-NAME ou ácido úrico (seqüestrador de NO, íon hidroxila e peroxinitrito) (128). Por outro lado, trabalhos prévios do nosso grupo mostram que o peroxinitrito contribui para o efeito inibitório dos doadores de NO nitroprussiato de sódio (SNP) e SIN-1 na adesão plaquetária ao fibrinogênio (46; 129). Portanto, é preciso trabalhos adicionais para investigar o papel do peroxinitrito na adesão de plaquetas não ativadas no nosso modelo experimental.

Ainda, alguns autores têm demonstrado que o NO pode ativar plaquetas, via aumento de GMPc e ativação da PKG, dependendo da fonte onde é gerado e da concentração produzida (130). Não podemos deixar de ressaltar que a pressão dos animais tratados com L-NAME foi bastante reduzida após a injeção de LPS, embora esta ainda se mantivesse estatisticamente maior do que a dos animais controle. O L-NAME é um inibidor inespecífico de NOS, mas possui uma seletividade maior para a NOS endotelial (131). Durante a sepse, ou após a administração de LPS em animais, ocorre uma ampla expressão da iNOS com conseqüente formação de grandes

quantidades de NO (132; 133). Portanto, no nosso modelo experimental, provavelmente, ainda temos alguma produção de NO. Entretanto, não podemos esquecer que na sepse a diminuição da pressão arterial não se deve somente ao aumento da produção de NO. O LPS é capaz de aumentar a síntese de prostaciclina, um potente vasodilatador, entretanto, a participação deste prostanóide na hipotensão observada na sepse ainda é bastante discutida (134; 135). Além disso, foi observado que a enzima conversora de angiotensina (ECA), responsável pela formação do potente vasoconstritor angiotensina II e degradação do vasodilatador bradicinina, está diminuída na sepse (136; 137). Também já foi demonstrado que em ratos endotoxêmicos ocorre o aumento da expressão do receptor de bradicinina do tipo B1, cuja ativação leva a hipotensão via liberação de prostaciclina (138). Desta maneira, a medida da pressão arterial nos ratos tratados com L-NAME não nos fornece informações sobre a quantidade de NO ainda formada no animal, somente mostra que houve diminuição da produção desta espécie. Sendo assim, no nosso modelo experimental, a iNOS poderia ainda estar gerando NO e este, por sua vez, estaria contribuindo para o aumento da adesão espontânea de plaquetas de ratos tratados com LPS.

Oposto ao observado na adesão espontânea, como já mencionado acima, a adesão de plaquetas ativadas por trombina foi significativamente inibida pelo LPS. O efeito inibitório maior foi observado 6h após a injeção de LPS, mas mesmo após 48h ainda havia uma marcante redução da adesão plaquetária. Na adesão espontânea ocorre a ligação do fibrinogênio com seu receptor e corresponde a etapa inicial da fosforilação de proteínas, enquanto que com plaquetas ativadas a adesão é um processo decorrente da ativação de várias vias intracelulares (139).

A trombina se liga a receptores ativados por proteases (PAR). Há quatro tipos de receptores pertencentes a esta família – PAR-1 a PAR-4, sendo que a trombina é capaz de ativar somente os receptores PAR-1, PAR-3 e PAR-4. Em plaquetas humanas são encontrados os receptores PAR-1 e PAR-4, enquanto que em plaquetas de roedores são encontrados os receptores PAR-3 e PAR-4. A sinalização intracelular induzida pela trombina em roedores é mediada pelo receptor PAR-4 e o receptor PAR-3 somente facilita a clivagem do receptor PAR-4 por baixas concentrações de trombina (140). A ligação da trombina ao receptor PAR-4, que está acoplado à proteína G_q ou G_{12} , leva à ativação da fosfolipase C, sendo a PLC β 2 e PLC γ 2 as mais encontradas em plaquetas (141; 142). Por sua vez a PLC hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5P2 presente na membrana plaquetária levando à síntese dos segundos mensageiros inositol trifosfato (IP3) que

contribuiu para a mobilização de cálcio e diacilglicerol (DAG) que ativa a PKC. Isso é seguido pela fosforilação específica da cadeia leve de miosina. O aumento na concentração de Ca^{++} , juntamente com a fosforilação mediada pela p38MAP quinase, ativa a fosfolipase A2 aumentando a disponibilidade de ácido araquidônico e síntese de TXA_2 . Este, por sua vez, contribuiu para a amplificação da ativação plaquetária (67). Todos estes processos intracelulares levam, finalmente, a conversão do receptor $\alpha IIb\beta_3$ do estado de baixa afinidade para o de alta afinidade. Tem início assim, a segunda etapa de sinalização, envolvendo a ativação de diferentes fosfatases, tirosina quinases entre outras enzimas, mecanismos importantes para a firme adesão plaquetária (142; 143).

A redução da adesão de plaquetas ativadas de ratos expostos ao LPS pode ser decorrente da inibição de etapas iniciais da ativação plaquetária, acarretando assim uma diminuição da ativação do receptor de fibrinogênio. De fato, Sheu e colaboradores (78; 79) demonstraram que o LPS de *E. coli* inibe a mobilização intracelular de Ca^{++} e a ativação da proteína quinase C (PKC) em plaquetas humanas estimuladas por colágeno.

O tratamento crônico dos animais com L-NAME e, conseqüentemente redução da produção de NO, não afetou a adesão de plaquetas ativadas de ratos controle ou tratados com LPS, mesmo sendo observado uma queda marcante nos níveis de $GMPC$ no grupo tratado com LPS em 6h. Portanto, estes resultados sugerem que a adesão de plaquetas ativadas no nosso modelo não é modulada por NO, diferente do observado na adesão de plaquetas não ativadas. Esta indicação é corroborada por resultados obtidos pelo nosso grupo (109) mostrando que o efeito inibitório do LPS na adesão de plaquetas humanas ativadas por trombina ocorre na ausência de aumento dos níveis intracelulares de $GMPC$.

Também, diferente do observado na adesão de plaquetas não ativadas, a pré-incubação de plaquetas com a PEG-SOD não afetou a adesão de plaquetas ativadas com trombina, indicando que EROs geradas pelas plaquetas não modulam o efeito inibitório do LPS na adesão de plaquetas de ratos expostos ao LPS. Entretanto, o tratamento de ratos com NAC 30 min após a injeção de LPS reduziu o efeito inibitório da exposição de ratos ao LPS na adesão de plaquetas ativadas. Apesar do efeito do NAC ter sido oposto daquele observado na adesão de plaquetas não ativadas, devemos ter em mente que o efeito geral do NAC na adesão, de plaquetas não ativadas ou ativadas, foi recuperar os valores da adesão observados nos ratos controle. Portanto, estes resultados indicam que NAC, por suas características já mencionadas acima, recupera o balanço

redox do animal e assim, restaura os níveis de adesão de plaquetas de ratos tratados com LPS para valores da adesão de ratos controles.

Em conclusão, o tratamento de ratos com LPS apresenta um efeito ambíguo na adesão plaquetária, já que aumenta a adesão de plaquetas não ativadas e reduz a adesão de plaquetas ativadas por trombina. O óxido nítrico (NO) modula o efeito estimulatório do LPS na adesão de plaquetas não ativadas através de mecanismos independentes de GMPC, mas não participa do efeito inibitório do LPS na adesão de plaquetas ativadas. Por outro lado, a geração sistêmica de EROs em ratos tratados com LPS modula a adesão de plaquetas não ativadas ou ativadas por trombina.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no nosso trabalho nos permitem concluir que:

- ✓ O óxido nítrico modula o efeito estimulatório do tratamento de ratos com LPS na adesão de plaquetas não ativadas através de mecanismos independentes de GMPC, mas não está envolvido no efeito inibitório do LPS na adesão de plaquetas ativadas por trombina;
- ✓ A produção endógena de EROs em plaquetas modula o efeito estimulatório do LPS na adesão espontânea, mas não participa do efeito inibitório do LPS na adesão de plaquetas ativadas por trombina;
- ✓ As EROs, produzidas sistemicamente, são importantes para o efeito do LPS na adesão de plaquetas não ativadas ou ativadas por trombina, provavelmente, por levar a um desequilíbrio do balanço redox do animal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martinez MC, Andriantsitohaina R. Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potencial Significance in Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009; 11(3): 1-34.
2. Azevedo LCP, Janiszewski M, Pontieri V, Pedro M de A, Bassi E, Tuci PJF, Laurindo FRM. Platelet-Derived Exosomes from Septic Shock Patients Induce Myocardial Dysfunction. 2007; 11(6): 1-10.
3. Teles JM, Silva E, Westphal G, Filho RC, Machado FR. Surviving Sepsis Campaign in Brazil. *Shock*. 2008; 30(1):47-52.
4. Silva E, Passos R da H, Ferri MB, Figueiredo LFP. Sepsis: From Bench to Bedside. *Clinics*. 2008; 63(1):109-20.
5. Bochud PY, Calandra T. Pathogenesis of Sepsis: New Concepts and Implications for Future Treatment. *BMJ*. 2003; 326:262-266.
6. Araújo, CA; Vasconcelos, D O; Cavalcanti, D C; Silva F M L; Souza, W & Coutinho, M H. Fator Inibidor de Macrófagos e Septicemia. *Rer. Port. Imunoalergologia*. 2005; 13: 19-23.
7. Junior JALS, David CM et al. Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. *RBTI*. 2006; 18(1): 9-17.
8. Girardis M, Rinaldi L, Donno L, Marietta M, Codeluppi M, Marchegiano P, Venturelli C. Effects on Management and Outcome of Severe Sepsis and Septic Shock Patients Admitted to the Intensive Care Unit After Implementation of a Sepsis Program: a Pilot Study. 2009; 13(5):R1143.
9. Perera PY, Mayadas TN, Takeuchi O, Akira S, Zaks-Zilberman M, Goyert, SM, Vogel SN. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J. Immunol*. 2001; 166:574-581.
10. Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MK, Dower SK. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J. Immunol*. 2002; 168:4701-4710.
11. Zeuke S, Ulmer AJ, Kusumoto S, Katus HA, Heine H. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc*.

Res. 2002; 56:126-134.

12. Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert K V J, Pate K D, Kubes P. Platelets Express functional Toll-like receptor-4. *Blood*. 2005; 106: 2417-2423.
13. Sheu JR, Hung WC, Kan YC, Lee YM, Yen MH. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of Escherichia coli lipopolysaccharide in human platelets. *Br. J. Haematol*. 1998; 103:29-38.
14. Golenbock DT, Hampton RY, Qureshi N, Takayama K, Raetz CR. Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J. Biol. Chem*. 1991; 266:19490-19498.
15. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and immunity. *J. Endotoxin Res*. 2001; 7:167-202.
16. McCuskey R S, Urbaschek R, Urbaschek B. The Microcirculation During Endotoxemia. *Cardiovascular Research*. 1996; 32: 752-763.
17. Amura CR, Kamei T, Ito N, Soares MJ, Morrison DC. Differential regulation of lipopolysaccharide (LPS) activation pathways in mouse macrophages by LPS-binding proteins. *J. Immunol*. 1998; 161:2552-2560.
18. Jayachandran M, Brunn J G, Karnicki K, Miller RS, Owen W G, Miller V M. In vivo of lipopolysaccharide and TLR4 on platelet production and activity: implications for thrombotic risk. *J. Appl. Physiol*. 2007; 102: 429.
19. Heuman D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta* 2002; 323: 59-72.
20. Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, Kullberg BJ, Van der Ven AJ, Van der Meer JW, Netea MG. Functional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms. *Mol. Med*. 2008; 14(5-6): 346-52.
21. Jean-Baptiste, E. Cellular Mechanisms in Sepsis. *Journal Intensive Care Medicine*. 2007; 22: 63-72.
22. Kawai T, Akira S, TLR Signaling Cell Death Differ. 2006; 13(5): 816-25.
23. Cuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B. The Microcirculation During Endotoxemia. *Cardiovascular Research*. 1996;32:752-763.
24. Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S & Neumann FJ. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med*. 1997. 23: 379-385.
25. Kovacic P, Pozzos RS, Somanathan R, Shangari N, O'Brien PJ. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free

- radicals, and structure-activity relationships. *Curr. Med. Chem.* 2005; 12: 2601-2623.
26. Zielinski T, Wachowicz B, Saluk-Jaszczak J, Kaca W. The Generation of Superoxide Anion in Blood Platelets in Response to Different Forms of *Proteus mirabilis* Lipopolysaccharide: Effects of Staurosporin, Wortmannin, and Indomethacin. *Thrombosis Research.* 2001;103:149-155.
 27. Murrant CL, Reid MB. Detection of Reactive Oxygen and Reactive Nitrogen Species in Skeletal Muscle. *Microsc Res Tech.* 2001;55(4):236-48.
 28. Görlach A. Redox Regulation of the Coagulation Cascade. *Antioxidantes & Redox Signaling.* 2005;7(9-10):1398-1404.
 29. Kälvegren H, Bylin H, Leanderson P, Richter A, Grenegard M, Bengtsson T. *Chlamydia pneumoniae* Induces Nitric Oxide Synthase and Lipoxygenase-Dependent Production of Reactive Oxygen Species in Platelets. *Thromb Haemost.* 2005;94:327-335.
 30. Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analys: High-dose Vitamin E Supplementation may Increase all-mortality. *Ann. Intern. Med.* 2005;142(1):37-46.
 31. Seno T, Inoue N, Gao D, Okuda M, Sumi Y, Matsui K, et al. Involvement of NADH/NADPH Oxidase in Human Platelet ROS Production. *Thromb Res.* 2001;103(5):399-409.
 32. Bokok Gm. Regulation of the Human Neutrophil NADPHOxidase by the Rac GTP-binding Ptrotein. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6(2):212-18.
 33. Pignatelli P, Sanguigni V, Lenti L, Ferro D, Finocchi A, Rossi P, Violi F. Gp91phox-dependent expression of platelet CD40 ligand. *Circulation.* 2004; 110:1326-1329.
 34. Stokes KY, Russel JM, Jennings MH, Alexander JS, Granger DN. Platelet-associated NAD(P)H oxidase contributes to the thrombogenic phenotype induced by hypercholesterolemia. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 43: 22-30.
 35. Brown DI, Griendling KK. NOX Proteins in Signal Transduction. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47(9):1239-53.
 36. Krötz, F, Sohn HY, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele T M, Becker B F, Theisen K, Klauss V, Pohl U. NAD(P)H-oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood.* 2002; 100: 917-924.
 37. Lehninger AL, Nelson DL, Coxx MM. Lehninger Princípios da Bioquímica. In: Lehninger AL. 3ªEd. São Paulo. Savier, 2000:973.

38. Liochev PS, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle-70 years later: An alternative view. *Redox Rep.* 2002; 7: 55-7.
39. Wolf G. Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthase: Biology, Pathology, Localization. *Histol Histopathol.* 1997;12(1):251-61.
40. Zhang, H., Joseph, J., Feix, J., Hogg, N., Kalyanaraman, B. Nitration and oxidation of a hydrophobic tyrosine probe by peroxynitrite in membranes: comparison with nitration and oxidation of tyrosine by peroxynitrite in aqueous solution. *Biochemistry.* 2001; 40:7675-7686.
41. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol. Sci.* 2005; 26: 190-95.
42. Bian K, Murad F. Nitric oxide (NO): biogenesis, regulation and relevance to human diseases. *Front. Biosci.* 2003; 8:d264-78
43. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 12231-12234.
44. Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Reviews* 1991; 43: 109-42.
45. Bergenti L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 1999; 65(18-19): 1865-74.
46. Marcondes S, Cardoso Mh, Morganti RP, Thomazzi SM, Lilla S, Murad F, De Nucci G, Antunes E. Cyclic GMP-Independent Mechanisms Contribute to the Inhibition of Platelet Adhesion by Nitric Oxide Donor: a Role for Alpha-Actinin Nitration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(9):3434-9.
47. Irwin C, Roberts W, Naseem KM. Nitric Oxide Inhibits Platelet Adhesion to Collagen Through cGMP-dependent and Independent: The Potential Role for S-Nitrosylation. *Platelets.* 2009; 20: 478-86.
48. Rabkin JG, McElhiney M. Depression and Distress in Older HIV+ Adults. *GMHC Treat Issues.* 2007;21(2):3-5.
49. Bolotina VM, Najibi S, Palacino PJ, Cohen RA. Nitric Oxide Directly Activates Calcium-Dependent Potassium Channels in Vascular Smooth Muscle. *Nature.* 1994;368(6474):580-3.
50. Cadenas, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors.* 1997; 6: 391-397.
51. Gutteridge JM, Mitchell J. Redox Imbalance in the Critically ill. *Br Med Bull.* 1999;55(1):49-75.

52. Masella R, Di Benetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem* 2005; 16: 577-586.
53. McCord MJ. The Evolution of Free radicals and Oxidative Stress. *Am J Med.*2000;108:652-659.
54. Bayir H. Reactive Oxygen Species. *Crit Care Med.*2005;33(12):s498-501.
55. Kulbacka J, Saczko J, Chwilkowska A. Oxidative Stress in Cells Damage Processes. *Pol Merkur Lekarski.*2009;27(157):44-7.
56. Freedman JE. Oxidative Stress and Platelets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2008; 28: s11-s16.
57. Bhattacharyya J, Biswas S, Datta AG. Mode of action of endotoxin: role of free radicals and antioxidants. *Curr. Med. Chem.* 2004; 11:359-368.
58. Berger MM, Chioloro RL. Antioxidant Supplementation in Sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Crit Care Med.*2007;35(9 suppl):s584-90.
59. Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Che. Rev.* 2004; 104: 6255-85.
60. Atkuri KR, Mantova JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine – A Safe Antidote for Cysteine/Glutathione Deficiency. *Curr Opin Pharmacol.*2007; 7(4):355-9.
61. Millea PJ. N-Acetylcysteine: Multiple Clinical Applications. *Am Fam Physician.*2009; 80(3):265-9.
62. Vanderschueren S, De Weerd A, Malbrain M, Vankersschaever D, Frans E, Wilmer A, Bobbaers H. Thrombocytopenia and Prognosis in Intensive Care. *Crit Care Med.* 2000; 28: 1871-6.
63. Klinger MH. Platelets and inflammation. *Anat Embryol (Berl).* 1997; 196:1-11.
64. Yeaman MR. The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clin Infect Dis.* 1997; 25: 951-68.
65. Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V. Platelet Receptors and Signaling in the Dynamics of Thrombus Formation. *Haematologica.*2009;94(5):700-11.
66. Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood.* 1990; 75: 128-138.
67. Lévy-Toledano, S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a “hierarchy”? *Haemostasis.* 1999; 29:4-15.
68. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm.

Blood. 1998; 91:2645-2657.

69. Offermanns, S. Activation of platelets function through G protein-coupled receptors. *Circ. Res.* 2006; 99: 1293-1304.

70. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell Adhesion Mechanisms in Platelet. *Arter, Thromb and Vasc Biol.* 2008;28:403-412.

71. Stohlawtz P, Folman CC, von dem Borne AE, Pernerstorfer T, Eichlerm HG, Panzer S, Jilma B. Effects of Endotoxemia on Thrombopoiesis in Men. *Thromb Haemost.* 1999; 81:613-7.

72. Keen, R.R., Stella, L., Flanigan, D.P. & Lands, W.E. Differential detection of plasma hydroperoxides in sepsis. *Crit. Care Med.* 1991; 19:1114-1119.

73. Russwurm S, Vickers J, Meier-Hellmann A, Spangenberg P, Bredle D, Reinhart, K, Losche W. Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock.* 2002; 17:263-268.

74. Shiraki R, Inoue N, Kawasaki S, Takei A, Kadotani M, Ohnishi Y, Ejiri J, Kobayashi S, Hirata K, Kawashima S, Yokoyama M. Expression of Toll-Like Receptors on Human Platelets. *Thromb Res.* 2004;113(6):379-85.

75. Katayama T, Ikeda Y, Handa M, Tamatani T, Sakamoto S, Ito M, Ishimura Y, Suematsu M. Immunoneutralization of glycoprotein Ibalph attenuates endotoxin-induced interactions of platelets and leukocytes with rat venular endothelium in vivo. *Circ. Res.* 2000; 6:1031-1037.

76. Zhang G, Han J, Welch EJ, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya TA, Malik AB, Du X, Li Z. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol.* 2009; 182: 7997-8004.

77. Saba HI, Saba SR, Morelli G, Hartmann RG. Endotoxin-mediated inhibition of human platelet aggregation. *Thromb. Res.* 1984; 34:19-33.

78. Sheu JR, Hung WC, Su CH, Lin CH, Lee LW, Lee YM, Yen MH. The antiplatelet activity of Escherichia coli lipopolysaccharide is mediated through a nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Eur. J. Haematol.* 1999; 62:317-326.

79. Sheu JR, Hung W, Kan YC, Lee YM, Yen MH. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of Escherichia coli lipopolysaccharide in human platelets. *Br. J. Haematol.* 1998; 103:29-38.

80. Marcos AJ, Silk ST, Safier LB, Ulman HL. Superoxide production and reducing activity in human platelets. *J Clin Invest.* 1977; 59: 149-58.

81. Cesbron JY, Capron A, Vargaftig BB, Lagarde M, Pincemail J, Braquet P, Taelman H, Joseph M. Platelets mediate the action of diethylcarbamazine on microfilariae. *Nature*. 1987; 325: 533-36.
82. Saluk-Juszczak J, Wachowicz B, Zielinski T; Kaca W. Adhesion of thrombin-stimulated and unstimulated blood platelets to collagen in the presence of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharides. *Platelets*. 2001; 12:470-475.
83. Janiszewski M, Do Carmo AO, Pedro MA, Silva E, Knobel E, Laurindo FR. Platelet-Derived Exosomes of Septic Individuals Posses Proapoptotic NAD(P)H Oxidase Activity: A Novel Vascular Redox Pathway. *Crit Care Med*.2004;32(3):818-25.
84. Pignatelli P, Lenti L, Sanguigni V, Frati G, Simeoni I, Gazzaniga PP, Pulcinelli FM, Violi F. Carnitine inhibits arachidonic acid turnover, platelet, and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284: H41-48.
85. Krötz F, Sohn H Y, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele T M, Becker B F, Theisen K, Klauss V, Pohl U. NAD(P)H-oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood* 2002; 100: 917-924.
86. Zielinski T, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Kaca W. Polysaccharide Part of *Proteus mirabilis* Lipopolysaccharide may be Responsible for the Stimulation of Platelet Adhesion to Collagen. *Platelets*.2002; 13(7):419-24.
87. Cerwinka WH, Cooper D, Kriegelstein CF, Ross CR, McCord JM, Granger DN. Superoxide mediates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol*. 2003; 284:H535-541.
88. Pignatelli P, Sanguigni V, Lenti L, Ferro D, Finocchi A, Rossi P, Violi F. Gp91phox-dependent expression of platelet CD40 ligand. *Circulation*. 2004; 110:1326-1329.
89. Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24:1988-96.
90. Olas B, Wachowicz B. Role of Reactive Nitrogen Species in Blood Platelet Functions. *Platelets*.2007;18(8):555-65.
91. Handin RI, Karabin R, Boxer GJ. Enhancement of platelet function by superoxide anion. *J Clin Invest*. 1977; 59:959-65.
92. Begonja AJ, Gambaryan S, Geiger J, Aktas B, Pozgajova M, Nieswandt B, Walter U. Platelet NAD(P)H-oxidase-generated ROS producton regulates alphaIIbeta3-integrin activation independent of the NO/cGMP pathway. *Blood*. 2005; 106: 2757-

2760.

93. Clutton P, Miermont A, Freedman JE. Regulation of endogenous reactive oxygen species in platelets can reverse aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:187-92.
94. Carella G, Mazzone M, Burrai I, Carbone L, Siciliano M. Nitro Derivatives: Considerations on Their Antiplatelet Activity. *Clin Ter.*2000;151(5):345-7.
95. Oberprieler NG, Roberts W, Riba R, Graham AM, Homer-Vanniasinkams S, Naseem Km. cGMP-Independent Inhibition of Integrin AlphaIIbBeta3-Mediated Platelet Adhesion and Outside-in Signalling by Nitric Oxide. *FESB Lett.*2007;581(7):1529-34.
96. Moro M., Darley-Usmar V M, Goodwin DA, Read NG, Zamora-Pino R, Feelisch M, Rodomski MW, Moncada S. Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1994; 91: 6702-6706.
97. Brown, A., Wyatt, M., Eddeb, F., Mantle, D. Plasma Lipid Peroxidation During Vascular Surgery. *Biochem Soc Trans.* 1998; 26(4): S334.
98. Schildknecht S, van der Loo B, Weber K, Tiefenthaler K, Daiber A, Bachschmid MM. Endogenous peroxynitrite modulates PGHS-1-dependent thromboxane A2 formation and aggregation in human platelets. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; 45:512-520.
99. Titheradge MA. Nitric Oxide in Septic Shock. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1411:437-455.
100. Bellavite P, Andrioli G, Guzzo P, Arigliano P, Chirumbolo S, Manzato F, Santonastaso C. A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates. *Anal. Biochem.* 1994; 216:444-450.
101. Zatz R. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. *Laboratory Animal Science.* 1990; 40: 198-201.
102. Peerschke EI. Bound Fibrinogen Distribution on Stimulated Platelets. Examination by Confocal Scanning Laser Microscopy. *Am J Pathol.* 1995; 147:678-87.
103. Mavrommatis AC, Theodoridis T, Orfanidou A, et al. Coagulation System and Platelets are Fully Activated in Uncomplicated Sepsis. *Crit Care Med.* 2000; 28:451-457.
104. Harker LA. Platelet Survival Time: Its Measurement and Use. *Prog Hemost Thromb.* 1978; 4:321-7.
105. Brandtzaeg, P. Significance and pathogenesis of septic shock. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996; 216:15-37.

106. Cicala C, Santacroce C, Itoh H, Douglas GJ, Page CP. A Study on Rat Platelet Responsiveness Following Intravenous Endotoxin Administration. *Life Sci.* 1997; 60:PL31-PL38.
107. Yaguchi A, Lobo FL, Vicent JL, Pradier O. Platelet Function in Sepsis. *J of Thromb and Haemostasis.* 2004; 2: 2096-2102.
108. Whitworth NH, Barradas MA, Mikhailidis DP, Dandona P. An Investigation into the Effects of Bacterial Lipopolysaccharide on Human Platelets. *Eur J Haematol.* 1989; 43:112-9.
109. Morganti RP, Cardoso MHM, Pereira FG, Lorand-Metze I, De Nucci G, Marcondes S, Antunes E. Mechanisms underlying the inhibitory effects of Lipopolysaccharide on human platelet adhesion. *Platelets.* 2010.
110. Saluk-Juszczak J, Wachowicz B, Kaca W. Stimulatory effects of endotoxin on the platelet secretory process. *Microbios.* 1999; 99:45-53.
111. Irani K, Pham Y, Coleman LD, Roos C, Cooke GE, Miodovnik A, Karim N, Wilhide CC, Bray PF, Goldschmidt-Clemont PJ. Priming of platelet α IIb β 3 by oxidants is associated with tyrosine phosphorylation of β 3. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology* 1998; 18:1698-1706.
112. Cerwinka, W.H., Cooper, D., Krieglstein, C.F., Feelisch, M., Granger, D.N. Nitric oxide modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venule. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002; 282:H1111-H1117.
113. Sixma JJ, Wester J. The Hemostatic Plug. *Semin Hematol.* 1997; 14: 265-99.
114. Jen CJ, Hu SJ. Direct Platelet-Fibrin Interaction that does not Require Platelet Activation. *Am J Physiol.* 1987; 253:H745-50.
115. Belisario MA, Tafuri S, Domenico C, Squillacioti C, Morte RD, Lucisano A, Staiano N. H₂O₂ Activity on Platelet Adhesion to Fibrinogen and Protein Tyrosine Phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1495: 183-193.
116. Martinez-Losa M, Cortijo J, Juan G, O'Connor JE, Sanz MJ, Santagelo F, Morcillo EJ. Inhibitory Effects of N-acetylcysteine on the Functional Responses of Human Eosinophils in Vitro. *Clin Exp Allergy.* 2007; 37:714-22.
117. Lin FY, Chen YH, Tasi JS, Chen JW, Yang TL, Wang HJ, Li CY, Chen YL, Lin SJ. Endotoxin induces toll-like receptor 4 expression in vascular smooth muscle cells via NADPH oxidase activation and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 2630-2637.
118. Hsu BG, Lee RP, Yang FL, Harn HJ, Chen HI. Post-treatment with N-

acetylcysteine Ameliorates Endotoxin Shock-Induced organ Damage in Conscious Rats. 2006; 79: 2010-6.

119. Huang WT, Lin MT, Chang CP. An NMDA Receptor-dependent Hydroxyl Radical Pathway in the Rabbit Hypothalamus May Mediate Lipopolysaccharide Fever. *Neuropharmacology*. 2006; 50: 504-11.

120. Shang F, Zhao L, Zheng Q, Wang J, Xu Z, Liang W, Liu H, Liu S, Zhang L. Simvastatin Inhibits Lipopolysaccharide-induced Tumor Necrosis Factor-Alpha Expression in Neonatal Rat Cardiomyocytes: The Role of Reactive Oxygen Species. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 351: 947-52.

121. Walsh PN. Platelet Coagulation-Protein Interactions. *Semin Thromb Hemost*. 2004; 30: 461-471.

122. Wu Y, Ozaki Y, Inoue K, Satoh K, Ohmori T, Yatomi Y, Owada K. Differential activation and redistribution of c-Src and Fyn in platelets, assessed by MoAb specific for C-terminal tyrosine-dephosphorylated cSrc and Fyn. *Biochim. Biophys. Acta*. 2000; 1497:27-36.

123. Savage B, Shattil SJ, Ruggeri ZM. Modulation of Platelet Function Through Adhesion Receptors. A Dual Role for Glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) Mediated by Fibrinogen and Glycoprotein Ib-von Willebrand Factor. *J Biol Chem*. 1992; 267: 11300-6.

124. Kälvegren H, Bylin H, Leanderson P, Richter A, Grenegard M, Bengtsson T. *Chlamydia pneumoniae* Induces Nitric Oxide Synthase and Lipoxygenase-Dependent Production of Reactive Oxygen Species in Platelets. *Thromb Haemost*. 2005; 94:327-335.

125. Pignatelli P, Pulcinelli FM, Lenti L, Gazzaniga PP, Violi F. Hydrogen Peroxide is Involved in Collagen-induced Platelet Activation. *Blood*. 1998; 91:484-90.

126. Boer, R., Ulrich, W.R., Klein, T., Mirau, B., Haas, S., Baur, I. The Inhibitory Potency and Selectivity of Arginine Substrate Site Nitric-Oxide Synthase Inhibitors is Solely Determined by their Affinity Toward the Different Isoenzymes. *Mol Pharmacol*. 2000; 58:1026-34.

127. Marchesi C, Ebrahimian T, Angulo O, Paradis P, Schiffrin EL. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. *Hypert*. 2009 Dec;54(6):1384-92

128. Schildknecht, S., van der Loo, B., Weber, K., Tiefenthaler, K., Daiber, A.,

Bachschmid, M.M. Endogenous peroxynitrite modulates PGHS-1-dependent thromboxane A2 formation and aggregation in human platelets. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; 45:512-520.

129. Redondo PC, Jardin I, Hernández-Cruz JM, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA. Hydrogen Peroxide and Peroxynitrite Enhance Ca²⁺ Mobilization and Aggregation in Platelets from Type 2 Diabetic Patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 333: 794-802.

130. Cardoso, M.H., Morganti, R.P., Lilla, S., Murad, F., De Nucci, G., Antunes, E., Marcondes, S. The Role of Superoxide Anion in the Inhibitory Effect of SIN-1 in Thrombin-Activated Human Platelet Adhesion. *Eur J Pharmacol.* 2010; 627:229-234.

131. Naseem KM, Chirico S, Mohammadi B, Bruckdorfer KR. The synergism of hydrogen peroxide with plasma S-nitrosothiols in the inhibition of platelet activation. *Biochem J.* 1996 Sep 15;318 (Pt 3):759-66.

132. Walter U, Gambaryan S. cGMP and cGMP-dependent Protein Kinase in Platelets and Blood Cells. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(191):533-48.

133. Heemskerk S, Masereeuw R, Russel FG, Pickkers P. Selective iNOS Inhibition for the Treatment of Sepsis-Induces Acute Kidney Injury. *Nat Rev Nephrol.* 2009; 5(11):629-40.

134. Li Z, Zhang G, Marianovic JA, Ruan C, Du X. A Platelet Secretion Pathway Mediated by cGMP-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem.* 2004; 279: 42469-75.

135. Höcherl K, Schmidt C, Kurt B, Bucher M. Activation of the PGI₂/IP system contributes to the development of circulatory failure in a rat model of endotoxic shock. *Hypertension.* 2008; 52: 330-335.

136. Koizumi T, Johnston D, Bjertnaes LJ, Banerjee MR, Newman JH. Inhibition of endogenous nitric oxide during endotoxemia in awake sheep - effects of Nomega-nitro-l-arginine on the distribution of pulmonary vascular resistance and prostanoid products. *Experimental Lung Research.* 2002; 28: 473-484.

137. Watanabe K, Lam G, Keresztes RS, Jaffe EA. Lipopolysaccharides decrease angiotensin converting enzyme activity expressed by cultured human endothelial cells. *Journal Cellular Physiology.* 192; 150: 433-439.

138. Rice CL, Kohler JP, Casey L, Szidon JP, Daise M, Moss GS. Angiotensin-converting enzyme (ACE) in sepsis. *Circulatory Shock* 1983; 11: 59-63.

139. McLean PG, Perretti M, Ahluwalia A. Inducible expression of the kinin B1 receptor in the endotoxemic heart: mechanisms of des-Arg⁹bradykinin-induced

coronary vasodilation. *British Journal Pharmacology* 1999; 128: 275-282.

140. Shattil, S.J., Newman, P.J. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood*. 2004; 104:1606-1615.

141. Brass, L.F. Thrombin and Platelet Activation. *Chest*. 2003; 124(3 Suppl): 18S-25S.

142. Lee SB, Rao AK, Lee KH, Yang X, Bae YS, Rhee SG. Decreased expression of phospholipase C-beta 2 isozyme in human platelets with impaired function. *Blood*. 1996; 88:1684-1691.

143. Hartwing JH, Barkalow K. Polyphosphoinositide Synthesis and Platelet Shape Change. *Curr Opin Hematol*. 1997; 4:351-6.