

MÁRCIA HELENA MIRANDA CARDOSO

**EFEITO INIBITÓRIO DO ÓXIDO NÍTRICO NA ADESÃO
PLAQUETÁRIA: MECANISMOS DEPENDENTES E
INDEPENDENTES DE GMP CÍCLICO**

*Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado,
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas -
UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Farmacologia da
Farmacêutico - Márcia Helena Miranda Cardoso.*

Campinas, 17 de fevereiro de 2006.

*Prof. Dr. Edson Antunes
- Orientador -*

CAMPINAS

2006



MÁRCIA HELENA MIRANDA CARDOSO

**EFEITO INIBITÓRIO DO ÓXIDO NÍTRICO NA ADESÃO
PLAQUETÁRIA: MECANISMOS DEPENDENTES E
INDEPENDENTES DE GMP CÍCLICO**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Farmacologia*

ORIENTADOR: *Prof. Dr. Edson Antunes*

CAMPINAS

2006



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

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

UNIDADE	13
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	C179e
V	EX
TOMBO BC/	69151
PROC.	16.123.06
C	☐
D	☒ C179e
PREÇO	14,00
DATA	25.06.09

Bib ID 383270

Cardoso, Márcia Helena Miranda

Efeito do óxido nítrico na adesão plaquetária: mecanismos dependentes e independentes de GMP cíclico / Márcia Helena Miranda Cardoso. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador :Edson Antunes

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Óxido nítrico. 2. Adesividade plaquetária. 3. Inibidores da Agregação de Plaquetas. 4. Doadores de Óxido Nítrico. 5. Nitroprussiato. I. Antunes, Edson. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Slp/fcm

Título em ingles: Effect of nitric oxide on platelet adhesion: cyclic GMP-dependent and independent mechanisms

Keywords: • Nitric oxide

- Platelet Adhesiveness
- Platelet Agregation Inhibitors
- Nitric oxide donors
- Nitroprusside

Titulação: Doutorado

Banca examinadora: Prof Dr Edson Antunes

Prof Dr Antônio Condino Neto

Prof Dr José Luiz Donato

Profa Dra. Lúcia Lopes

Profa. Dra. Marta Helena Krieger

Data da defesa: 17/02/2006



Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Edson Antunes

Membros:

Prof. Dr. Edson Antunes

Profa. Dra. Lucia Rossetti Lopes

Profa. Dra. Marta Helena Krieger

Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Prof. Dr. José Luiz Danato

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 17/02/2006

*Ao Rubén, meu marido e companheiro de todas as horas,
pela dedicação, carinho e imensa ajuda,
principalmente nos momentos mais difíceis,
por seu amor*

Aos meus pais, Jairo e Aparecida,

pelo imenso amor, pelo incentivo,

porque sempre acreditam em mim

Aos meus irmãos, Regina, Claudia, Liane,

Jairo e Fabiane, meus amigos de sempre e para sempre

Aos meus sobrinhos Menian, Taruhim, Amani,

Oiran, Mainumi e Renato, as alegrias da minha vida

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pela oportunidade que me proporcionou, por sua orientação, compreensão e por seu exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa, meu agradecimento e minha admiração.

À Profa. Dra. Sisi Marcondes, por sua co-orientação, por sua ajuda e indispensável contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop pela oportunidade de realizar parte deste trabalho em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, por fornecer os materiais que permitiram a realização deste trabalho.

Ao Dr. Sérgio Lilla por sua disponibilidade e auxílio na realização de alguns experimentos.

Aos meus amigos da UNICAMP: Ellen, Carla, Mario, Cristina, Enilton, Ivani, Fernanda Priviero, Cleber, Fernanda e Marcelo Datti, Gislaine, Tatiane, Camila, Fabíola, Angelina, Harold, Cristiane, Juliana Baracat, Leyge, Letícia, Lara, Sara, Mika, Luciane, Luis, Renata Penachin, Renata Pereira, que estiveram comigo durante estes anos e fizeram o caminho mais leve.

Aos meus queridos amigos Raquel, Ana Cecília, Juliana Moreira, Rafael e Denise Becker, por todo carinho e pela ajuda imprescindível durante estes anos.

Às minhas queridas amigas de todas as horas, Adriana, Cida e Maria Ângela, pelo apoio e carinho essenciais em minha vida.

À querida Antonella, pela companhia diária, por compartilhar tantos momentos especiais durante a realização deste trabalho, por sua amizade.

À Yolanda, por sua companhia e seu apoio, principalmente durante os momentos difíceis do início deste trabalho.

A todos os professores e funcionários do departamento de Farmacologia da UNICAMP, em especial ao Wanderlei por sua importante ajuda.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Caminante no hay camino

Se hace camino al andar

Caminhante, não há caminho,

se faz caminho ao andar

(Antonio Machado)

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xxxix</i>
ABSTRACT.....	<i>xlili</i>
1 - INTRODUÇÃO.....	47
1.1 - Plaquetas.....	49
1.1.1 - Ativação e adesão plaquetária.....	50
1.1.2 - Agonistas plaquetários.....	51
1.1.3 - Vias de sinalização da adesão plaquetária.....	52
1.1.4 - Mecanismos de inibição da adesão plaquetária.....	54
1.2 - Óxido Nítrico.....	55
1.2.1 - Óxido nítrico e plaqueta.....	57
1.3 - Peróxinitrito e a função plaquetária.....	59
1.4 - Nitração de proteínas.....	60
1.5 - Objetivos.....	61
2 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
2.1 - Obtenção de plaquetas lavadas.....	65
2.2 - Ensaio de adesão.....	65

2.3 - Dosagem do GMPc.....	66
2.4 - Ensaio da atividade plaquetária pelo MTT.....	67
2.5 - Ensaio da atividade da fosfatase ácida plaquetária.....	68
2.6 - Eletroforese e <i>Western blotting</i>	68
2.7 - Purificação e Identificação da proteína nitrada.....	69
2.8 - Identificação de peptídeos tripticos.....	70
2.9 - Análise estatística.....	71
3 - RESULTADOS.....	73
3.1 - Adesão de plaquetas ao fibrinogênio.....	75
3.2 - Efeito inibitório do SNP sobre a adesão de plaquetas ao fibrinogênio.....	76
3.2.1 - Atividade da fosfatase ácida.....	78
3.2.2 - Viabilidade plaquetária.....	78
3.2.3 - Níveis de GMPc em plaquetas incubadas com SNP: Efeito do ODQ.....	80
3.2.4 - Efeito da SOD.....	83
3.2.5 - Efeito do galato.....	85
3.2.6 - <i>Western blotting</i> para 3-nitrotirosina.....	87
3.2.7 - Purificação e identificação de proteína nitrada.....	89
3.3 - Efeito inibitório do SIN-1 sobre a adesão de plaquetas ao fibrinogênio.....	92
3.3.1 - Atividade da fosfatase ácida.....	94

3.3.2 - Viabilidade plaquetária.....	94
3.3.3 - Níveis de GMPc em plaquetas incubadas com SIN-1: efeito do ODQ.....	97
3.3.4 - Efeito da SOD.....	100
3.3.5 - Efeito da SOD sobre a viabilidade e a atividade da fosfatase ácida.....	102
3.3.6 - Efeito do galato.....	105
3.3.7 - Nitração de proteínas pelo SIN-1.....	107
4 - DISCUSSÃO.....	109
5 - CONCLUSÕES.....	123
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Soro albumina bovina
COX	Cicloxygenase
DG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetil sulfóxido
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis-(beta-amino-ethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	sintase endotelial do óxido nítrico
ECG	<i>Epigallocatechin gallate</i>
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
FAK	Quinase de adesão focal
GC	Guanilato ciclase
GCS	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato

HCl	Ácido clorídrico
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IBMX	3-isobutil-1-metil-xantina
iNOS	Sintase induzível do óxido nítrico
IP₃	Trifosfato de inositol
KCl	Cloreto de potássio
KHCO₃	Bicarbonato de potássio
KH₂PO₄	Fosfato ácido de potássio
MgSO₄	Sulfato de magnésio
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazólico
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nNOS	Sintase neuronal do óxido nítrico
NO	Óxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintases
NO₂	Dióxido de nitrogênio
O₂⁻	Ânion superóxido
ODQ	<i>1H-[1,2,4] oxadiazolo quinoxalin-1-one</i>
OH⁻	Radical hidroxila
ONOO⁻	Ânion peroxinitrito
PAF	Fator ativador de plaquetas

PARs	<i>Protease-activated receptors</i>
PDE	Fosfodiesterase
PECAM-1	Molécula de adesão as célula endotelial e da plaqueta
PIP₂	4,5-bifosfato fosfatidil inositol
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PLC	Fosfolipase C
PRP	Plasma rico em plaqueta
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SIN-1	3-morfolinosidnonimina
SNP	Nitroprussiato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
TFA	Ácido trifluoroacético
TX	Tromboxano
VASP	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>

LISTA DE MATERIAIS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
Anticorpo anti-3-nitrotirosina	Biotechnology (EUA)
Anticorpo secundário conjugado	Amersham (Inglaterra)
BSA	Sigma (EUA)
Coluna Sephacryl 200 HR	Amersham (Inglaterra)
Coluna de hidroxiapatita	Bio-Rad-Laboratories (CA)
DMSO	Sigma (EUA)
<i>-(-)epigallocatechin gallate</i>	Sigma (EUA)
Fosfato de <i>p</i> -nitrofenil	Sigma (EUA)
Fibrinogênio	Sigma (EUA)
IBMX	Sigma (EUA)
Kit para dosar GMPc	Cayman Chem. Company (EUA)
MTT	Sigma (EUA)
ODQ	Sigma (EUA)
Placa de 96 poços	Costar – Corning Inc. (EUA)
Sais básicos	Merck (Alemanha)
SDS	Sigma (EUA)

SIN-1	Sigma (EUA)
Sistema de detecção <i>Western blotting</i>	Amersham (Inglaterra)
SNP	Sigma (EUA)
SOD	Sigma (EUA)
Tripsina pancreática	Sigma (EUA)
Triton-X	Sigma (EUA)
Trombina	Sigma (EUA)

LISTA DE TABELAS

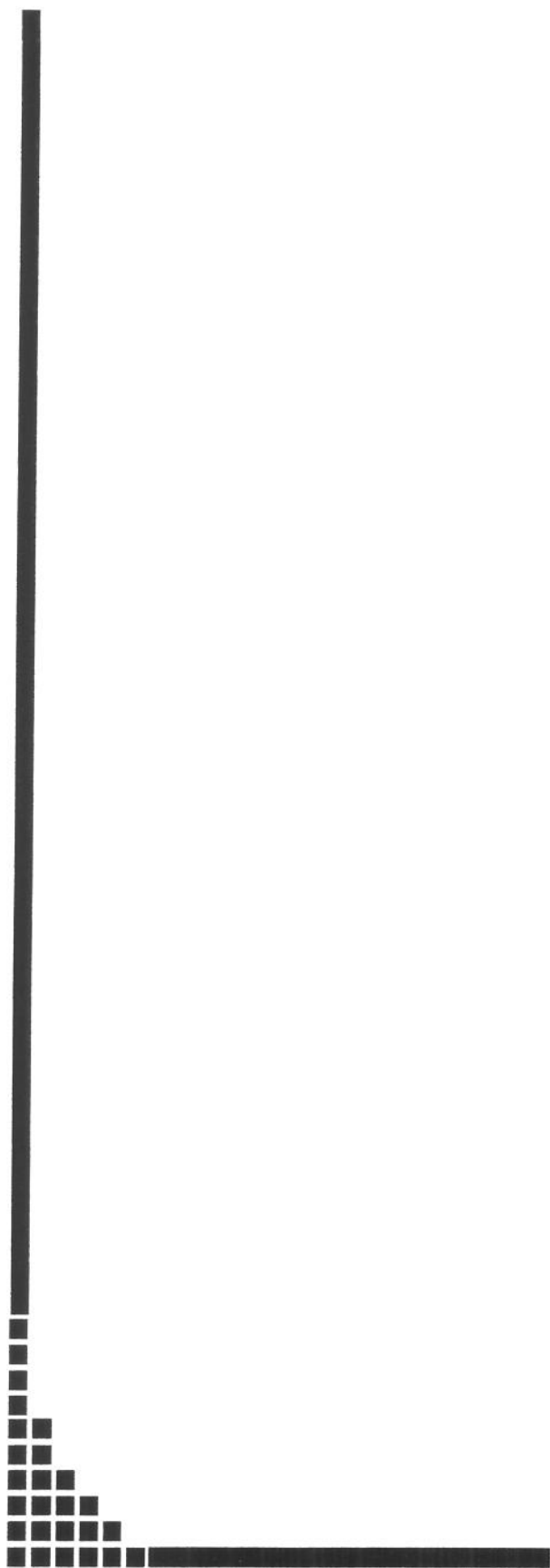
Pág.

Tabela 1 - Massa e seqüência dos peptídeos tripticos obtidos da digestão do gel da banda eletroforética, comparado com a massa teórica de peptídeos tripticos da alfa actinina-1.....	91
--	----

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1 - Adesão de plaquetas humanas ao fibrinogênio.....	75
Figura 2 - Efeito inibitório do SNP na adesão de plaquetas humanas ao fibrinogênio.....	77
Figura 3 - Efeito do SNP sobre a viabilidade plaquetária.....	79
Figura 4 - Efeito do inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, nos níveis de GMPc e na inibição da adesão plaquetária pelo SNP em 15 min.....	81
Figura 5 - Efeito do inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, nos níveis de GMPc e na inibição da adesão plaquetária pelo SNP em 60 min.....	82
Figura 6 - Efeito da SOD na inibição da adesão plaquetária pelo SNP.	84
Figura 7 - Efeito do galato na inibição da adesão plaquetária pelo SNP.....	86
Figura 8 - Detecção de proteínas nitradas em plaquetas humanas.....	88
Figura 9 - Purificação da proteína nitrada em plaquetas lavadas.....	90
Figura 10 - Efeito inibitório do SIN-1 na adesão de plaquetas humanas ao fibrinogênio.....	93
Figura 11 - Efeito do SIN-1 sobre a atividade da fosfatase ácida plaquetária.....	95

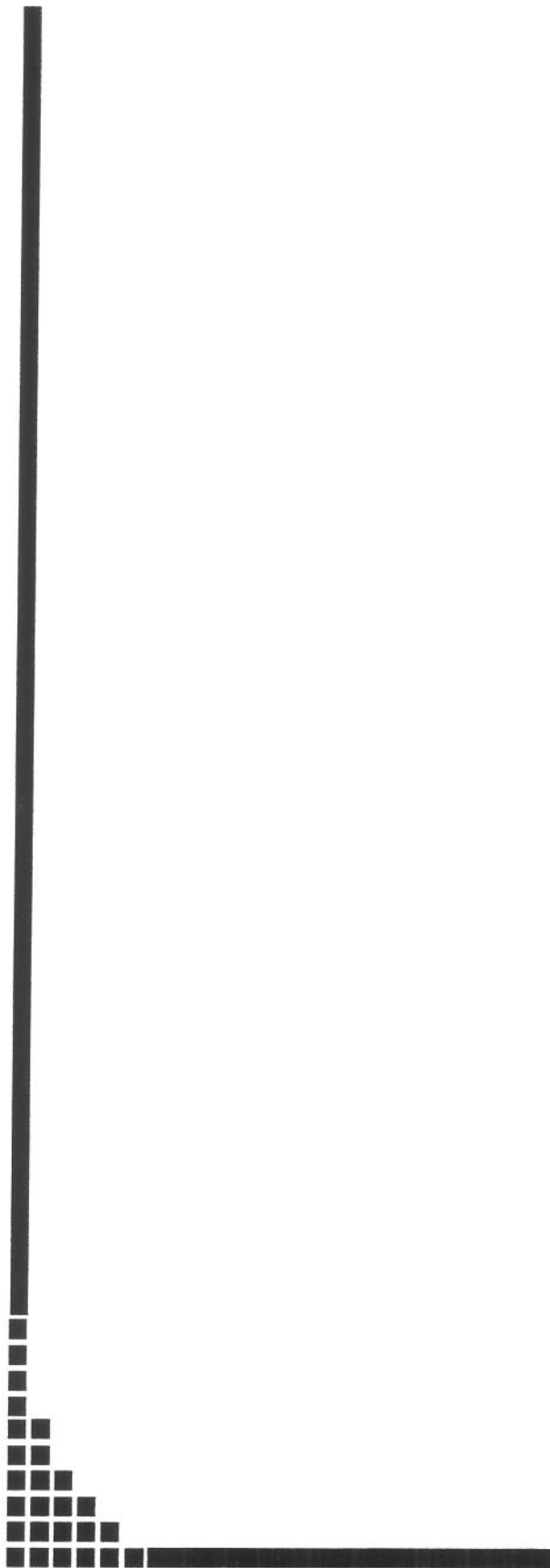
Figura 12 -	Efeito do SIN-1 sobre a viabilidade plaquetária.....	96
Figura 13 -	Efeito do inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, nos níveis de GMPc e na inibição da adesão plaquetária pelo SIN-1 em 15 min.....	98
Figura 14 -	Efeito do inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, nos níveis de GMPc e na inibição da adesão plaquetária pelo SIN-1 em 60 min.....	99
Figura 15 -	Efeito da SOD na inibição da adesão plaquetária pelo SIN-1.....	101
Figura 16 -	Efeito da SOD na inibição viabilidade plaquetária pelo SIN-1.....	103
Figura 17 -	Efeito da SOD na inibição da atividade da fosfatase ácida plaquetária pelo SIN-1.....	104
Figura 18 -	Efeito do galato na inibição da adesão plaquetária pelo SIN-1.....	106
Figura 19 -	Detecção de proteínas nitradas em plaquetas humanas.....	108



RESUMO

A inibição da adesão de plaquetas ao subendotélio é fundamental na prevenção de agregação excessiva e de formação de trombos, sendo o óxido nítrico (NO) o principal mediador envolvido neste fenômeno. O objetivo deste estudo foi investigar o mecanismo de ação do NO na inibição da adesão de plaquetas humanas, procurando identificar os mecanismos dependentes e independentes de GMP cíclico (GMPc). Os ensaios de adesão foram realizados em placas de 96 poços recobertos com fibrinogênio, usando-se plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) obtidas de indivíduos sadios. Dependendo do protocolo experimental, as plaquetas não ativadas e ativadas com trombina (50 mU/mL) foram incubadas com SNP (0,1–1,0 mM) ou SIN-1 (0,1–1,0 mM), na ausência ou na presença de ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel), SOD (seqüestrador do ânion superóxido) ou galato (antioxidante seqüestrador de peroxinitrito). A adesão foi avaliada aos 15 e 60 min de incubação, medindo-se a atividade da fostase ácida. Nossos resultados mostraram que as plaquetas se aderem significativamente ao fibrinogênio *in vitro*, sendo a resposta em 60 min maior do que em 15 min. O tratamento das plaquetas com SNP (0,1 e 1,0 mM) elevou significativamente os níveis de GMPc e reduziu a adesão plaquetária aos 15 e 60 min. A pré-incubação das plaquetas com ODQ impediu a elevação dos níveis de GMPc induzida pelo SNP (ambas as concentrações e tempos), e reverteu a inibição da adesão plaquetária observada com 0,1 mM de SNP. Entretanto, o ODQ não modificou a inibição da adesão quando se usou 1,0 mM de SNP. Por outro lado, a pré-incubação das plaquetas com SOD ou galato reverteu significativamente o efeito inibitório de 1 mM de SNP. Resultados semelhantes foram obtidos com o SIN-1 em todas as condições experimentais. No sentido de descartar que a inibição da adesão plaquetária proporcionada pelos doadores de NO não é decorrente de efeito citotóxico, realizamos ensaios de citotoxicidade (MTT). Nossos dados revelaram que o SNP não é tóxico à plaqueta em nenhuma das concentrações e condições usadas. Por outro lado, o SIN-1 mostrou-se tóxico na concentração de 1 mM, sendo este efeito citotóxico revertido pela pré-incubação das plaquetas com SOD. Numa segunda etapa deste trabalho, passamos à investigação do componente independente de GMPc responsável

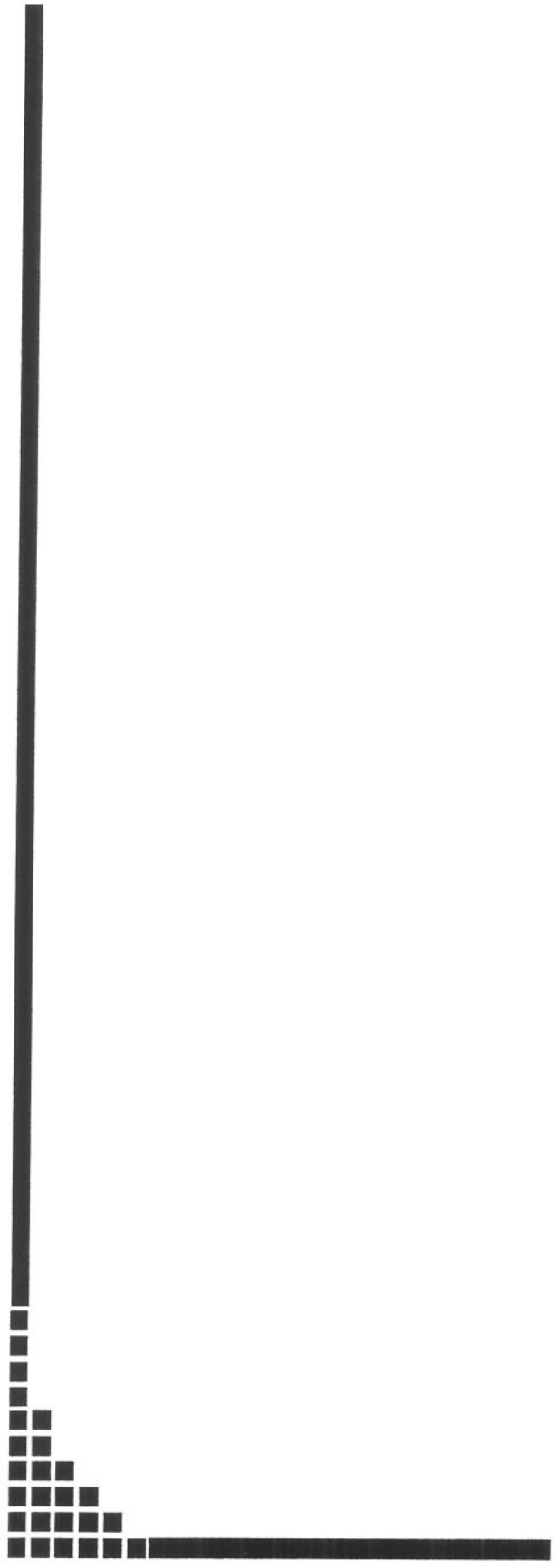
pela inibição da adesão plaquetária em resposta ao SNP e SIN-1, dando ênfase à nitrotirosina. A incubação de plaquetas com SNP (0,1 mM) por 15 min não revelou nenhuma proteína nitrada, mas quando as plaquetas foram tratadas com concentração maior de SNP (1 mM) ou SIN-1, houve o aparecimento de uma nitração de proteína nos resíduos de tirosina com uma massa molecular aparente de 110 kDa, identificada como alfa-actinina-1. A nitração foi aumentada em plaquetas ativadas com trombina. Por outro lado, amostras de plaquetas tratadas com SNP ou SIN-1 (0,1 e 1 mM) por 60 min não mostraram nitração de proteína nos resíduos de tirosina. No conjunto, estes dados sugerem que o NO inibe a adesão de plaquetas não ativadas e ativadas, por mecanismos dependentes e independentes de GMPc sendo que a nitração da α -actinina 1 plaquetária, parece ser o principal mecanismo responsável pelo componente independente de GMPc. Paralelamente, observamos que em concentrações elevadas, o SIN-1 diminui a viabilidade e a atividade da fosfatase ácida das plaquetas devido à formação de ânion superóxido.



ABSTRACT

The inhibition of platelet adhesion to the subendothelium by nitric oxide (NO) is essential in preventing excessive aggregation and thrombus formation. The objective of this work was to investigate the mechanisms of the NO on inhibition of human platelet adhesion looking for identify of the cGMP-dependent and -independent mechanisms. Adhesion assay was carried out in the 96-well microtiter plates coated by fibrinogen, using washed platelet ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) from healthy volunteers. Depending on the experimental protocols, non activated or thrombin (50 mU/mL)-activated platelets were incubated with NO donors (SNP or SIN-1), guanylyl cyclase inhibitor (ODQ), O_2^- scavenger (SOD) and (-) epigallocatechin gallate, and allowed to adhere to the wells for either 15 or 60 min at 37°C. Cell toxicity was estimated using the MTT assay by platelets after exposure to NO donors. Nitrated proteins were detected by immunoblotting. Purification and identification of them were done by Western blotting analysis and mass spectrometry respectively. Significant platelet adhesion was achieved when non-activated and activated platelets were kept on plates for 15 min or 60. The adhesion was significantly increased when platelets were activated with of thrombin. SNP (0,001 – 1000 μ M) inhibited significantly both non-activated and thrombin-stimulated platelet adhesion. The MTT reduction assay showed that the exposure of platelets to SNP (0.1 and 1 mM) caused any toxic effect. Pretreatment of platelets with ODQ nearly abolished SNP (0.1 mM)-mediated cGMP elevation and the inhibition of platelet adhesion, but failed to affect the inhibitory effect of SNP (1 mM) on cell adhesion. Pre-incubation of platelets with SOD, reversed the effect of SNP 1mM. Epigallocatechin gallate did not affect the effect of SNP at 0.1mM; on the other hand, reduced this effect at 1mM SNP. SIN-1 (0,001 – 100 μ M) concentration-dependently inhibited both non-activated and thrombin-stimulated platelet adhesion. In the higher concentration (1 mM), the SIN-1 inhibited almost all platelet adhesion. Pretreatment of platelets with ODQ markedly reverted the increased the levels of cGMP as well as decreased the inhibition of platelet adhesion by SIN-1 at 0,1 mM. SOD did not change the SIN-1 (0,1 mM)- mediated platelet inhibition, but reverted the platelet inhibition in all another conditions. MTT assay showed that the SIN-1 at

1 mM caused toxic effect in the platelets, and this effect was restored by SOD. ECG did not affect the effect of SIN-1, excepted in the small concentration, when the inhibitory effect of thrombin-activated platelets was decreased. Immunoblotting indicated the presence of nitrated protein that was recognized as alpha-actinin 1. In conclusion, cGMP-dependent and -independent mechanisms contribute to inhibition of platelet adhesion by NO, and that the α -actinic nitration can be the most important c GMP-independent mechanism. Parallel of this, we observed that the high concentration of SIN-1 decreased the viability and acid phosphatase activity by formation of superoxide anion.



1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Plaquetas

As plaquetas são fragmentos de células gigantes, os megacariócitos, formados na medula óssea. As plaquetas têm a forma de discos diminutos, sendo consideradas, na verdade, corpúsculos celulares e não células propriamente ditas. 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 então são retirados da mesma, principalmente pelo baço, e fígado (HARKER, 1978).

A função primordial das plaquetas é manter a hemostasia, formando tampões hemostáticos que ocluem sítios danificados do sistema vascular. Após a transecção de vasos sangüíneos, as plaquetas aderem ao tecido conectivo às margens da lesão, e, depois de alguns minutos, forma-se um tampão hemostático plaquetário que oclui a lesão e detém a perda de sangue.

As plaquetas são anucleadas e o citoplasma contém numerosas organelas como mitocôndrias, sistema de Golgi, ribossomos e microtúbulos. Contém ainda três tipos de grânulos, classificados como densos, alfa e lisossomais. Os grânulos densos contêm a serotonina, ATP, ADP, cálcio e pirofosfato (HOLMSEN e WEISS, 1979). Os grânulos alfa contêm o fator 4 plaquetário, a β -tromboglobulina, o fator de crescimento derivado de plaqueta, proteínas catiônicas, fator bactericida e fatores que participam da cascata da coagulação, como o fibrinogênio, o fator V e o fator VII/von Willebrand. Nos grânulos lisossomais encontram-se algumas hidrolases ácidas, como a β -glucosidase e a β -galactosidase (HOLMSEN e WEISS, 1979), assim como a fosfatase ácida (BENTFELD e BAINTON, 1975).

Na membrana plasmática das plaquetas estão expressos receptores que medeiam as interações adesivas (SHATTIL, 1994). Estes receptores de adesão são estruturalmente diversos, compreendem a família das integrinas ($\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$), a leucina (GPIb/IX), as imunoglobulinas (PECAM-1) e P-selectina.

As integrinas formam a maior família de receptores heterodiméricos $\alpha\beta$ -transmembrânicos que regulam a adesão plaquetária (CLARK e BRUGGE, 1995). A integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) é a mais detalhadamente estudada, representando cerca de 17% do total de proteínas da membrana plaquetária (CALVETE, 1995; HERRICK et al., 1999; BELISARO et al., 2000). Este receptor GPIIb/IIIa é o principal receptor plaquetário para fibrinogênio; é um heterodímero dependente de cálcio, e medeia a agregação, adesão firme e o espalhamento plaquetário (CALVETE, 1999).

Quando ativadas, as plaquetas secretam várias proteínas que facilitam sua interação com outras plaquetas, células endoteliais e leucócitos, através de proteínas como as P-selectinas, trombospondina, fibrinogênio, fibronectina e vitronectina (OFOSU, 2002). As plaquetas também sintetizam e liberam o TXA_2 (HAMBERG et al., 1975) e o PAF (CHIGNARD et al., 1979; 1980), dois mediadores conhecidos pela capacidade de liberar o conteúdo granular para o meio externo, e amplificar a ativação plaquetária.

1.1.1 - Ativação e adesão plaquetária

A ativação plaquetária, observada após danos da parede vascular, resulta no aparecimento de quatro fenômenos distintos (ROSS, 1999): (1) "shape change" (que envolve a mudança da forma discóide da plaqueta para a forma esférica acompanhada de pseudópodes); (2) adesão (processo no qual as plaquetas se ligam a superfícies que não a de outras plaquetas); (3) agregação (processo onde as plaquetas se ligam apenas à superfície de outras plaquetas); e (4) secreção (extrusão dos conteúdos dos grânulos α e densos das plaquetas durante a agregação, a adesão ou mesmo na ausência de ambas).

A ativação das plaquetas pode ocorrer na presença ou na ausência de ativadores exógenos, dependendo das condições hemodinâmicas locais e da natureza da lesão vascular.

Quando as plaquetas estão em repouso, o GPIIb/IIIa (integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$) está em estado de baixa ativação e não se liga ao fibrinogênio solúvel. Entretanto, na vigência de lesão vascular, o fibrinogênio intacto é encontrado no local danificado. Este fibrinogênio insolúvel interage com a glicoproteína GPIIb/IIIa expressa nas plaquetas não ativadas, promovendo a adesão das mesmas ao local danificado (SIXMA e WESTER, 1977; SAVAGE e RUGGERI, 1991; SHATTIL, 1999).

A adesão observada em plaquetas não ativadas é menor do que aquela vista em plaquetas ativadas; apesar disso, é um fenômeno de grande relevância, tanto na hemostasia fisiológica, quanto em oclusões vasculares patológicas, uma vez que o fibrinogênio imobilizado está exposto no local do dano vascular, sendo este o primeiro evento para cessar o sangramento (SAVAGE et al., 1992; BELIZARIO et al, 1997).

Quando as plaquetas são expostas a seus agonistas (ADP, colágeno, trombina), a afinidade/atividade do $\alpha_{IIb}\beta_3$ aumenta rapidamente. A ativação plaquetária pode aumentar o número ou a afinidade do ligante aos receptores específicos da adesão (BELLAVITE, 1994).

1.1.2 - Agonistas plaquetários

Uma série de substâncias são capazes de se ligar às plaquetas e iniciar reações bioquímicas que levam à formação de agregados plaquetários e secreção granular (TOLLEFSEN et al., 1974; FITZGERALD, 2001). Estes agonistas plaquetários são classificados em fortes e fracos, dependendo da capacidade destes em estimular a secreção de grânulos plaquetários na ausência (forte) ou na presença (fraco) de agregação plaquetária. O ADP, por exemplo, é considerado um agonista fraco, e tem um importante papel na potencialização da ativação mediada por outros estímulos. O TXA_2 também parece ter um papel secundário na função hemostática da plaqueta (FITZGERALD, 2001).

A trombina é um dos mais potentes ativadores plaquetários, sendo capaz de estimular a secreção plaquetária em condições nas quais não há agregação (HOLMSEN e WEISS, 1979; CHARO et al., 1977). COUGHLIN (2000) relatou que a sinalização mediada pela trombina é, pelo menos em parte, devido a receptores pertencentes à família dos receptores contendo 7 domínios trans-membrânicos acoplados à proteína G, denominados PARs (*protease-activated receptors*). São conhecidos quatro PARs em ratos e humanos: PAR-1 (VU et al., 1991), PAR-2 (NYSTEDT et al., 1994), PAR-3 (RASMUSSEN et al., 1991) e PAR-4 (XU et al., 1998; KAHN et al., 1998). O PAR-1, PAR-3 e PAR-4 podem ser ativados pela trombina, ao passo que o PAR-2 é ativado pela tripsina e triptase, mas não pela trombina (MOLINO et al., 1997; KAWABATA et al., 1999). A plaqueta humana expressa PAR-1 e PAR-4, sendo a ativação destes receptores suficiente para desencadear a agregação e a secreção (COUGHLIN, 2000).

A trombina interage com seu principal receptor na membrana plaquetária, o PAR-1, promovendo a clivagem de seu domínio N-terminal extracelular em um sítio específico Arg 41- Ser 42 (COUGHLIN et al., 1991; GRAND et al., 1996). Esta clivagem é irreversível e expõe uma nova porção N-terminal, que se liga intramolecularmente ao corpo do próprio receptor, resultando em sua ativação. A ativação do PAR-1 promove a ativação da fosfolipase C através da proteína Gq, desencadeando a cascata de sinalização que resulta na ativação plaquetária (KAWABATA e KURODA, 1999; OFOSU, 2002).

1.1.3 - Vias de sinalização da adesão plaquetária

A adesão plaquetária é um evento complexo, envolvendo uma série de componentes subendoteliais e plasmáticos que se ligam especificamente a diferentes glicoproteínas de membrana, e, à semelhança da agregação, é um passo crucial na hemostasia e trombose (BELLAVITE et al., 1994; BELISARIO et al., 2000).

Depois do dano vascular o contato do GPIIb plaquetário com o fator de von Willebrand subendotelial inicia a adesão da plaqueta ao subendotélio vascular danificado. Esta adesão inicial é fortalecida pela interação do receptor GPIIb/IIIa plaquetário com o fibrinogênio (BELISARIO et al, 1997; OFOSU, 2002). Através desta ligação, o fibrinogênio medeia tanto a adesão quanto a agregação plaquetária (NIIYA et al., 1987).

A sequência de sinalização desencadeada durante a ativação plaquetária é conhecida como sinalização “inside-out” ou “outside-in”. A sinalização “inside-out” representa as reações iniciadas pela ligação de um ou mais agonistas a seus receptores de membrana, levando à conversão de um receptor de baixa afinidade para um de alta afinidade. A via “outside in” representa reações iniciadas pela ligação do GPIIb/IIIa com seus ligantes, transmitindo informação dentro da célula (SHATTIL et al., 1998).

Na via de sinalização “inside out”, a forma ativada da integrina está apta para se ligar tanto ao fibrinogênio, quanto a outras proteínas circulantes (BELISARIO et al., 2000). Os agonistas se ligam a seus receptores acoplados à proteína G; em seguida, ocorre ativação de determinadas enzimas, como a fosfolipase C. Esta, quando ativada, cliva o fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP₂), liberando diacilglicerol (DG) e trifosfato de inositol (IP₃) (BELL e MAYERUS, 1980; SHATTIL et al., 1998). O IP₃ libera cálcio do sistema tubular denso da plaqueta, e o aumento do cálcio intracelular leva à fosforilação da miosina de cadeia leve, facilitando a ativação de enzimas dependentes de cálcio, como a proteína quinase C e a fosfolipase A₂ ((BRASS e JOSEPH, 1985; BRASS et al., 1987). O diacilglicerol (DC) ativa a proteína quinase C (PKC) que, por sua vez, regula a formação do citoesqueleto da plaqueta e ativa o complexo $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa), provocando mudanças conformacionais (HASHIMOTO et al., 1987). Assim, o $\alpha_{IIb}\beta_3$ expõe seu sítio de ligação, passando de um estado de baixa afinidade (plaqueta em repouso), para um de alta afinidade (plaqueta ativada) (LÉVY-TOLEDANO, 1999).

A ligação do fibrinogênio ao $\alpha_{IIb}\beta_3$ transduz um sinal dentro da célula que influencia a função plaquetária, iniciando a segunda etapa da sinalização denominada “outside-in” (SHATTIL et al., 1994). Esta via de sinalização é responsável pela segunda onda de agregação e reorganização do citoesqueleto, sendo importante para a firme adesão, assim como para a estabilização dos grandes agregados de plaquetas (PEERSCHKE, 1995). Após a ligação dos ligantes com o $\alpha_{IIb}\beta_3$, a sinalização é propagada pela interação entre a cadeia citoplasmática da integrina, moléculas sinalizantes e proteínas do citoesqueleto, incluindo a vinculina, a talina e a α -actinina. Algumas enzimas podem ser ativadas simplesmente pela ligação do fibrinogênio ao seu receptor, como a Syk (OBERGFELL et al., 2002), ou pela ativação da proteína G, como a PI_3 -K γ (LÉVY-TOLEDANO, 1999), mas outras são ativadas somente quando há ativação total das plaquetas, isto é, ativação da PLC e ligação do fibrinogênio, como é o caso da FAK (SHATTIL et al., 1994).

1.1.4 - Mecanismos de inibição da adesão plaquetária

A ativação plaquetária pode ser inibida em vários níveis, como na ligação do agonista à membrana plaquetária, na liberação de tromboxano ou na translocação de cálcio. Entretanto, de um modo geral, as respostas plaquetárias são inibidas pela elevação dos níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc). Inibidores plaquetários como prostaciclina e o óxido nítrico (NO) são capazes de elevar os níveis plaquetários de AMPc e GMPc, respectivamente, ativando proteínas quinases dependentes de AMPc (PKA) ou GMPc (PKG), levando à redução na concentração do cálcio intracelular (NOLTE et al., 1994).

A proteína de adesão focal VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*) é um substrato comum tanto para PKA quanto para PKG (HALBRÜGGE et al., 1992). MASSBERG e colaboradores (2004) demonstraram que há um aumento da adesão plaquetária em ratos deficientes de VASP,

comprovando que a mesma está envolvida na regulação negativa da adesão plaquetária à parede vascular sob condições fisiológicas. Nas plaquetas, a VASP está estrategicamente localizada na interseção das duas maiores vias inibitórias. Em resposta à ativação das PKA ou PKG, a VASP é fosforilada nos resíduos de serina 157, serina 239 e treonina 278, sendo esta fosforilação intimamente relacionada à regulação negativa da adesão plaquetária (MASSBERG et al., 2004). A fosforilação da VASP nos resíduos de serina 157, mediada por PKA e/ou PKG, também leva à inibição da ligação do fibrinogênio com o receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ plaquetário (HORSTRUP et al., 1994; HAUSER et al., 1999).

1.2 - Óxido Nítrico

O NO é um mediador fisiológico gasoso primeiramente identificado como “Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio” (EDRF; FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980). Em mamíferos, o NO participa de numerosas funções na sinalização inter e intracelular, incluindo dilatação dos vasos sanguíneos, transmissão neuronal, citotoxicidade, coordenação do ritmo cardíaco e regulação da atividade respiratória celular, dentre outros (MONCADA et al., 1988, 1991; GROVES e WANG, 2000).

A síntese do NO ocorre a partir de um dos átomos de nitrogênio do grupo guanidino terminal da L-arginina (PALMER et al., 1988), por meio da ação de uma família de enzimas conhecidas como NO sintases (NOS). Existem três isoformas da NOS: iNOS (ou NOS II), eNOS (NOS III) e nNOS (ou NOS I). A forma induzível (iNOS ou NOS II) é independente de cálcio, e sua síntese é induzida em diversos tipos celulares por estímulos como citocinas pró-inflamatórias e endotoxinas. As formas constitutivas estão presentes em condições fisiológicas no endotélio (eNOS ou NOS III) e nos neurônios (nNOS ou NOS I) (WANG e MARSDEN, 1995; DUDZINSKI et al., 2005). Diferentemente da iNOS, tanto a eNOS quanto a nNOS são ativadas pela entrada de cálcio na célula (IGNARRO et al., 1987; PALMER et al., 1988).

Após a formação de NO, este ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs), aumentando os níveis de GMPc nas células alvo (ARNOLD et al., 1977). O GMPc é, portanto, responsável por muitas ações biológicas do NO, incluindo inibição da adesão e da agregação das plaquetas (SZABÓ e THIEMERMANN, 1995). Além disso, o NO também pode promover ações independentes de GMPc, como o efeito citotóxico sobre células tumorais (STUEHR e NATHAN, 1989; NATHAN, 1992) e a ativação direta de canais de K⁺ ativados por Ca⁺⁺ (BOLOTINA et al., 1994).

Nitrovasodilatadores como o nitroprussiato de sódio (SNP) e 3-morfolinossidnonimina (SIN-1) são doadores de NO bastante utilizados como ferramenta para se entender o papel fisiológico e patológico da via NO-GMPc.

O nitroprussiato de sódio (SNP) foi usado por décadas para o tratamento da hipertensão arterial, e permanece como droga rotineiramente utilizada para emergência hipertensiva, doenças cardíacas crônicas e agudas, hipotensão intraoperativa e cirurgias cardíacas (ROBIN 1992; FRIEDERICH e BUTTERWORTH, 1995; NAPOLI e IGNARRO, 2003). O SNP tem a propriedade de liberar NO, levando ao efeito dilatador, tanto dos vasos coronarianos quanto de outros vasos periféricos, independentemente da síntese endógena de NO (IGNARRO et al., 1985; FEELISCH et al., 1987). Diferentemente de outros nitrovasodilatadores que requerem a presença de compostos altamente específicos contendo tiol, o SNP libera espontaneamente o NO em pH fisiológico, funcionando portanto como uma pró-droga (MONCADA et al., 1991).

O molsidomine, um vasodilatador administrado oralmente para pacientes com doenças cardíacas congestivas e patologias isquêmicas, é convertido em 3-morfolinossidnonimina (SIN-1) por ação de esterases hepáticas (TANAYAMA et al., 1974; RUDOLPH e DIRSCHINGER, 1985). Este, por sua vez, libera o NO através de sua decomposição por meio de uma reação não enzimática que ocorre em três passos. O primeiro passo compreende a abertura do anel sidnonimina, catalisado por uma base, para formar o SIN-1 A. O segundo passo requer o oxigênio, que doa um elétron ao SIN-1 A, liberando ânion superóxido e

SIN-1^{•+}, um radical catiônico. Finalmente, no terceiro passo, o SIN-1^{•+} é decomposto para formar o SIN-1 C e liberar o NO. Portanto, o SIN-1 libera simultaneamente ânion superóxido e NO na proporção de 1:1 (FEELISCH et al., 1989; SINGH et al., 1999).

Outra droga utilizada como ferramenta no estudo do NO e suas ações é o ODQ (1-H-[1,2,4] oxidiazolo quinoxalin-1-one), reconhecido como inibidor potente e seletivo da GCs (GARTHWAITE et al., 1995). O mecanismo de ação do ODQ na GCs purificada de pulmão bovino foi investigado por SCHRAMMEL et al. (1996), os quais demonstraram que a incubação desta enzima com doadores de NO, na presença de ODQ, resulta em diminuição dos níveis de GMPc. Os autores observaram que a atividade desta enzima, medida na ausência de NO (ou de doadores de NO), também foi inibida pelo ODQ. Portanto, sugeriu-se que a inibição da GCs se faz de modo competitivo com o NO, resultando na oxidação do grupo heme ferroso à forma férrica, que apresenta baixa afinidade pelo NO, contribuindo deste modo para a inativação da enzima. O ODQ previne o aumento dos níveis de GMPc em plaquetas e em tecido vascular (MORO et al., 1996).

1.2.1 - Óxido nítrico e plaqueta

Estudos anteriores demonstraram a presença de eNOS em plaquetas humanas (MEHTA et al., 1995; CHEN e MEHTA, 1996). Estes autores notaram um aumento da conversão de L-arginina para L-citrulina em plaquetas incubadas com L-arginina, ADP ou adrenalina, sendo esta conversão inibida em meio desprovido de cálcio (ou magnésio) ou na presença de EGTA. RADOMSKI e colaboradores (1990a) também demonstraram que as plaquetas são capazes de gerar NO através da eNOS. Além disso, o RNAm de eNOS e a própria enzima foram identificados por *reverse-transcription polymerase reaction* (RT-PCR) e *Western Blotting*, respectivamente, em plaquetas (MEHTA et al., 1995; CHEN e MEHTA, 1996).

Enquanto a presença da eNOS em plaquetas já é bem aceita, ainda é bastante controverso se plaquetas expressam a iNOS (BERKELS et al., 1997). WALLERATH et al. (1997) demonstraram a presença da iNOS em plaquetas, mas não conseguiram amplificar fragmentos de DNA desta enzima. Estes autores levantam dúvidas sobre a possibilidade das plaquetas expressarem a iNOS já que são elementos anucleados, e sugerem que a iNOS, em plaquetas, é provavelmente originada dos megacariócitos. De fato, trabalho prévio já demonstrou a presença da iNOS em megacariócitos (LELCHUK et al., 1992).

O NO derivado de plaquetas tem um papel crucial na função plaquetária, regulando a atividade excessiva das plaquetas. Ou seja, o NO inibe a adesão destas ao subendotélio, prevenindo a formação de trombos plaquetários (RADOMSKI et al, 1987; LOW et al, 2002).

Trabalhos anteriores mostraram que o SNP produz uma inibição concentração-dependente da agregação plaquetária *in vitro* (GLUSA e MARKWARDT, 1974), sendo esta inibição também observada em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva tratados com SNP (HINES e BARASH, 1989). Em estudos *in vivo*, METHA et al. (1979) mostraram que o SNP, em baixas doses, inibe de 20 a 40% a agregação plaquetária induzida pela adrenalina e pelo ADP.

Já está bem determinado que o NO se liga ao grupo prostético heme ferroso da GCs promovendo sua ativação devido a subseqüentes mudanças na conformação desta proteína (IGNARRO, 1989). Uma vez ativada, a GCs catalisa a conversão da guanosina trifosfato (GTP) ao GMPc. Este segundo mensageiro promove redução da concentração de cálcio intracelular através da ativação da PKG (NOLTE et al., 1994).

Até recentemente acreditava-se que a inibição plaquetária pelo NO era exclusivamente mediada pela via GCs/GMPc/PKG. Entretanto, têm sido proposto que a atividade anti-plaquetária do NO pode ocorrer também por mecanismos independentes de GMPc (GORDGE et al., 1998; TSIKAS et al., 1999).

Embora os mecanismos independentes de GMPc ainda não sejam claros, evidências sugerem que a nitração de resíduos de tirosina podem explicar a inibição da função plaquetária pelo NO. NASEEN et al. (2000) mostraram que a nitração de proteínas plaquetárias humanas ocorre durante a agregação de plaquetas induzida por colágeno, e sugerem que o processo de nitração pode ser parte do mecanismo inibitório do NO na ativação plaquetária.

Apesar de existirem numerosos estudos sobre os efeitos do NO na agregação plaquetária, poucos têm avaliado o papel do NO na adesão plaquetária. Estes são limitados, até o momento, aos trabalhos *in vitro* de WU et al. (1997) e MILLER et al. (2003).

1.3 - Peroxinitrito e a função plaquetária

O peroxinitrito (ONOO^-) é um agente oxidante formado a partir da reação do NO e ânion superóxido (O_2^-). A formação do peroxinitrito *in vivo* transforma estes dois radicais livres relativamente não reativos em uma espécie muito mais reativa (BECKMAN et al., 1990; PRYOR e SQUADRITO, 1995). A quantidade de ONOO^- formada depende da competição entre o NO e a superóxido dismutase (SOD) pelo O_2^- (BOULOS et al., 2000). Entretanto, a reação de O_2^- e NO para formar o ONOO^- ocorre três vezes mais rapidamente do que a taxa constante de reação de O_2^- e SOD (HUIE e PADMAJA, 1993).

Pesquisas recentes têm indicado o ONOO^- como um agente danoso em uma série de condições patológicas (CLEMENTS et al., 2003). A ação citotóxica do ONOO^- pode estar relacionada com a sua habilidade em iniciar a peroxidação lipídica (RUBBO et al., 1994), oxidar radicais sulfidrilas (RADI et al., 1991) ou nitrar resíduos de tirosina em uma variedade de proteínas (BECKMAN et al., 1992; ISCHIROPOULOS, 1992).

LUFRANO e BALAZY (2003) mostraram que o ONOO^- , através de um mecanismo de transporte complexo, penetra na membrana plaquetária. Também é possível que o ONOO^- seja formado na plaqueta devido à disponibilidade tanto do

NO quanto do O_2^- . Isto porque, quando ativadas, as plaquetas, além de sintetizarem NO por ação da eNOS, também produzem espécies oxigênio reativas (ROS), como o O_2^- e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SABETKAR et al., 2002).

O $ONOO^-$, em concentrações elevadas ($> 150 \mu M$), estimula a agregação de plaquetas humana (MORO et al., 1994). Entretanto, o tratamento de plaquetas humanas com concentrações de 4 a $50 \mu M$ de $ONOO^-$ promove inibição da agregação plaquetária, através da nitração de resíduos de tirosina da COX (BOULOS et al., 2000). Resultados inibitórios semelhantes foram relatados anteriormente (YIN et al., 1995; MONDORO et al., 1997; BROWN et al., 1998).

O $ONOO^-$ leva à nitração de proteínas plaquetárias (MONDORO et al., 1997), sendo que em vários tipos celulares a presença de proteínas nitradas tem sido usada como marcador para a formação de $ONOO^-$ nos tecidos (LOW et al., 2002).

1.4 - Nitração de proteínas

A nitração é uma modificação pós-translacional de proteínas, derivada da reação com agentes nitrantes. De acordo com RADI (2004), um número relativamente limitado de proteínas são preferencialmente marcadas para a nitração, e, dentro destas, apenas um ou poucos resíduos de tirosina específicos podem ser nitrados (SOUZA et al., 1999). A nitração dos resíduos de tirosina é uma modificação covalente da proteína, resultante da adição de um grupo nitro ($-NO_2$) em um dos dois carbonos *ortho* equivalentes, no anel aromático dos resíduos de tirosina (ISCHIROPOULOS, 2003).

Vários mecanismos foram propostos para detectar a formação de nitrotirosina: (1) nitração dependente de heme-peroxidases (EISERICH et al., 1998), (2) nitração dependente da atividade de pseudoperoxidases, como Cu/Zn-SOD (YIM et al., 1993), catalase (OGINO et al., 2001), hemoglobina (GRZELAK et al., 2001) e mioglobina

(KILINC et al., 2001), e (3) nitração de tirosina dependente de ONOO^- . Este último mecanismo foi considerado de grande interesse biológico, pois esta reação funciona como um indicador de reações inflamatórias oxidativas mediadas pelo NO (BECKMAN et al, 1990; ISCHIROPOULOS et al., 1992; SCHOPFER et al., 2003).

A maioria dos estudos sobre nitração relata a detecção de 3-nitrotirosina em células, tecidos ou fluidos animais ou humanos (ISCHIROPOULOS, 1998). Através de imunoprecipitação, alguns estudos descreveram várias proteínas que são modificadas por nitração *in vivo*: SOD-Mn, em rejeição crônica renal (CROW et al., 1996), lipoproteína de baixa densidade em lesões ateroscleróticas (BRUCKDORFER, 2001), prostaciclina sintetase em lesões ateroscleróticas bovina (ZOU et al., 1997), succinil coA:3 transferase em proteínas dos rins de ratos diabéticos (MARCONDES et al., 2001) e proteínas em doença de Parkinson (BRUCKDORFER, 2001). Entretanto, trabalhos recentes sugerem que a nitração seletiva de proteínas específicas pode ocorrer também durante processos fisiológicos (NASEEN et al., 2000; ISCHIROPOULOS, 2003).

Existem evidências de que proteínas plaquetárias podem ser espontaneamente nitradas sem a adição de ONOO^- exógeno, e que esta seria estimulada por um processo fisiológico, como por exemplo a ativação de plaquetas por agonistas endógenos (SABETKAR et al., 2002). Este fenômeno sugere que, pelo menos em algumas situações, a nitração de proteínas é reversível e pode contribuir para processos regulatórios (KAMISAKI et al, 1998; IRIE et al., 2003).

1.5 - Objetivos

O objetivo deste projeto foi investigar o papel do NO na inibição da adesão de plaquetas humanas ao fibrinogênio, *in vitro*, procurando identificar os mecanismos dependentes e independentes de GMPc .

Os objetivos específicos foram:

1. Investigar o efeito de doadores de NO (SNP e SIN-1) sobre a adesão plaquetária e as concentrações de GMPc;
2. Investigar o efeito do inibidor seletivo da guilinalo ciclase solúvel, ODQ, sobre inibição da adesão plaquetária e as concentrações de GMPc;
3. Investigar o efeito da superóxido dismutase (SOD) e do seqüestrador de ONOO^- , *Epigallocatechin gallate* (ECG), sobre a inibição da adesão plaquetária;
4. Identificar as proteínas nitradas em plaquetas tratadas com SNP e SIN-1.



2 - MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP (Parecer n.º 259/2002).

2.1 - Obtenção de plaquetas lavadas

Sangue humano, obtido de voluntários sadios, que não receberam qualquer medicação durante pelo menos 10 dias anteriores ao experimento, foi coletado na presença de ACDC (9:1 v/v). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação do sangue total à 200 x *g* em temperatura ambiente por 15 min. Ao PRP, adicionou-se solução de tampão de lavagem pH 6,0 (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, citrato de sódio 12 mM, glicose 10 mM e sacarose 12 mM), 5:7 v/v, e então centrifugado à 800 x *g* por 12 min. O sobrenadante foi desprezado. O resíduo plaquetário foi cuidadosamente ressuspenso em tampão de lavagem e novamente centrifugado à 800 x *g* por 12 min. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as plaquetas foram ressuspensas em solução de Krebs-Ringer desprovida de cálcio (NaCl 118 mM, NaHCO₃ 35 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄.7H₂O 1,17 mM, Glicose 5,6 mM). As plaquetas foram contadas em câmara de Neubauer, ajustando-se o número final para 2x10⁸ plaquetas/mL. A partir desta solução, foram obtidas outras diluições de plaquetas. Finalmente, adicionou-se 1 mM de cloreto de cálcio à suspensão plaquetária.

2.2 - Ensaio de adesão

Os ensaios de adesão foram realizados como descrito previamente por BELLAVITE et al. (1994), com algumas modificações. Foram utilizadas placas de 96 poços, sendo as mesmas previamente tratadas com 50 µL de fibrinogênio (50 µg/mL em Krebs-Ringer).

As placas foram deixadas *overnight* à 4°C. Após 12 h, os poços foram lavados com 200 µL de Krebs-Ringer por 2 vezes, e as ligações não específicas foram bloqueadas pela adição de 100 µL/poço de BSA 0,1% (p/v). Após 1 h de incubação à 37°C, as placas foram lavadas mais duas vezes com 200 µL de Krebs-Ringer e secas à 37°C.

Em seguida, adicionou-se aos poços 50 μ L da suspensão plaquetária ($1,2 \times 10^8$ plaqueta/mL), ativadas ou não com 50 μ L de trombina (50 mU/mL). Foram acrescentados (isoladamente ou em associação): SNP (0,001-1 mM), SIN-1 (0,001-1 mM), ODQ (10 μ M), SOD (100 U/mL) e galato (5 μ M). As placas foram incubadas por 15 ou 60 min à 37°C e posteriormente lavadas por 2 vezes com 200 μ L de Krebs-Ringer para que as plaquetas não aderidas fossem removidas. Os poços ensaiados receberam 50 μ L de Krebs-Ringer e os poços reservados ao controle receberam 50 μ L da curva padrão plaquetária (concentrações variadas da suspensão plaquetária original), em triplicata. Em seguida, adicionou-se a todos os poços, 150 μ L de um substrato para fosfatase ácida (tampão citrato 0,1M pH 5,4 contendo fosfato de *p*-nitrofenil 5mM e Triton X-100 0,1%). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1h, e após esse período, 100 μ L de NaOH 2N foram adicionados a cada poço para interromper a reação. A absorbância foi determinada no leitor de ELISA à 405nm. A adesão plaquetária foi calculada pela medida da atividade da fosfatase ácida das plaquetas aderidas ao fibrinogênio, comparando-as com a curva padrão.

2.3 - Dosagem do GMPc

2.3.1 - Extração do GMPc

As plaquetas foram isoladas como descrito anteriormente e ressuspensas em Krebs-Ringer numa concentração final de $1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL. Os ensaios foram feitos com plaquetas não ativadas e ativadas com trombina (50 mU/mL). Em seguida, as plaquetas foram incubadas com 2 mM de IBMX (inibidor inespecífico de fosfodiesterase) por 15 min à temperatura ambiente. Posteriormente, as plaquetas foram incubadas na ausência ou na presença de ODQ (10 μ M), SNP ou SIN-1, nas concentrações de 0,1 e 1 mM, por 15 ou 60 min à 37°C.

A incubação foi interrompida adicionando-se etanol absoluto acidificado (99%) gelado, e as amostras agitadas manualmente com vigor por aproximadamente 30 segundos. Em seguida, as amostras foram incubadas em gelo por 30 min e centrifugadas à 3000 x g, 4°C, por 30 min.

Os sobrenadantes das amostras foram recolhidos e guardados, sendo os precipitados lavados com 0,5 mL de etanol acidificado (67%) gelado, centrifugado novamente à 14000 x g 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 estocada a - 20°C até a dosagem.

2.3.2 - Dosagem do GMPc

A dosagem foi realizada utilizando-se o kit da Cayman, seguindo-se as instruções do fabricante. O método imunoenzimático é baseado na competitividade do GMPc livre com o GMPc *tracer* (GMPc ligado a uma molécula de acetilcolinesterase). A intensidade da cor determinada pelo espectrofotômetro é proporcional ao GMPc livre durante a incubação. Cada poço recebeu material proveniente de $1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL (50 μ L), sendo que cada amostra foi realizada em triplicata. A leitura foi realizada a 412 nm (PRADELLES e GRASSI, 1989; MAXEY et al., 1992).

2.4 - Ensaio da atividade plaquetária pelo MTT

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade dos doadores de NO sobre as plaquetas, utilizamos o método originalmente descrito por MOSMANN (1983) e modificado por XIA et al. (2000). É um ensaio colorimétrico baseado na redução do MTT pelas desidrogenases mitocondriais de plaquetas metabolicamente ativas.

A reação produz o sal formazan que é insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos. Para tanto, foram adicionados 50 µL/poço de suspensão plaquetária contendo $1,2 \times 10^8$ plaqueta/mL a uma placa de 96 poços. Os ensaios foram feitos com plaquetas não ativadas e ativadas com trombina (50 mU/mL). Em seguida, acrescentamos os doadores de NO (SNP ou SIN-1), nas concentrações de 0,1 e 1 mM, na presença ou ausência de SOD (100 U/mL). Após incubação por 15 ou 60 min à 37°C, foi adicionado a cada poço solução de Krebs-Ringer para um volume final de 100 µL e, em seguida, 10 µL de MTT (5 mg/mL em água). Finalmente, após incubação por 3 horas à 37°C, a reação foi interrompida com 100 µL de SDS 10% em HCl (0,01 M). Realizou-se mais uma incubação adicional de 1h à 37°C, no final da qual seguiu-se a leitura da placa em leitor de microplacas (Spectra Max 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, E.U.A.), no comprimento de onda de 540 nm.

2.5 - Ensaio da atividade da fosfatase ácida plaquetária

Os ensaios da atividade da fosfatase ácida foram realizados conforme descrito anteriormente (seção 2.2), com algumas modificações. Os ensaios foram realizados usando-se placas de 96 poços não previamente tratadas com fibrinogênio.

2.6 - Eletroforese e *Western blotting*

Plaquetas humanas lavadas (6×10^6 plaquetas/mL) foram incubadas (37°C) com SNP (0,1 ou 1,0mM) ou SIN-1 (0,1 ou 1,0 mM) por 15 ou 60 min, na ausência ou na presença de trombina (50 mU/mL). Após a incubação, a suspensão plaquetária (1 mL) foi centrifugada à 10000 g por 10 min à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 40 µl de tampão dissociante (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 2%

e azul de bromofenol 0,1%). Foi utilizado como controle positivo para estes ensaios a albumina bovina nitrada com peroxinitrito (1 µg/poço), como descrito por BECKMAN et al. (1994). A eletroforese de proteínas foi feita em gel de poliacrilamida-SDS (6%) e transferida para membranas de PVDF. As membranas foram bloqueadas por 30 min à temperatura ambiente, com 5% de leite em TBS (Tris 200 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,6) contendo 0,1% de Tween (TBS-T) e em seguida incubadas *overnight* com anticorpo de camundongo anti-3-nitrotirosina (1:2000) à 4°C. Após incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas 6 vezes durante 1 h com solução de TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com a peroxidase (1:8000) por 1 h à temperatura ambiente. Novamente, as membranas foram lavadas 6 vezes durante 1 h com solução de TBS-T e então as bandas imunorreativas foram detectadas através do aumento de quimioluminescência.

2.7 - Purificação e Identificação da proteína nitrada

Amostras de plaquetas (1×10^9 platelets/mL), não ativadas ou ativadas com trombina (50 mU/mL), foram reunidas na presença de inibidores de protease (10 µg/mL inibidor de tripsina *soybean*, 64 µM benzamidina, 0,005 U/mL aprotinina, 25 µM leupeptina, 15 µM pepstatina A, 8 µM antipain e 200 µM PMSF) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. As amostras foram sonicadas por 10 min à 4°C e centrifugadas à 10,000 g por 5 min à 4°C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente a 100,000 g por 1 h à 4°C. As amostras foram armazenadas à -80°C para futuros procedimentos.

As proteínas do sobrenadante plaquetário foram precipitadas com 60% de sulfato de amônia por 18 h à 4°C sob agitação. A suspensão foi centrifugada à 12,000 g (4°C) por 10 min e o *pellet* foi ressuscitado em 15 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,2) 10 mM. A coluna *Sephacryl S-200 HR* (1 X 100 cm) foi equilibrada com o tampão fosfato de sódio (pH 7,2) 10 mM contendo NaCl (0,3 M) e então adicionou-se 1 mL do sobrenadante plaquetário. A cromatografia foi

realizada no mesmo tampão, no fluxo de 10 mL/h. As frações coletadas foram analisadas por *Western blotting* usando-se anticorpo monoclonal anti-nitrotirosina. As frações contendo proteína nitrada foram reunidas e carregadas em uma coluna de hidroxiapatita (1 X 2 cm) equilibrada com o tampão fosfato de sódio (pH 7,2, 10 mM). As proteínas ligadas foram eluídas através de um gradiente crescente de concentração de fosfato de sódio (50, 100, 150 e 200 mM) no fluxo de 6 mL/h, e as frações foram analisadas por *Western blotting*. A banda no gel SDS contendo a proteína nitrada purificada foi corada com *Coomassie blue* e cortada usando uma lâmina. A banda do gel cortada foi descorada e a proteína foi reduzida, alquilada com iodoacetamida, e digerida com tripsina de acordo com o procedimento de HELLMAN et al. (1995). Os peptídeos alquilados foram extraídos, secos e analisados por cromatografia capilar em fase reversa acoplada a espectrometria de massa por "electrospray" (LC/ESI-MS/MS).

2.8 - Identificação de peptídeos trípticos por "nanospray" LC-MS/MS

Cromatografia capilar em fase reversa acoplada à espectrometria de massa por "electrospray" foi realizada usando-se um sistema com bomba ternária CapLC Waters conectada, através de um módulo com válvula de seleção de fluxo, à uma fonte de nano Z spray de um espectrômetro de massa híbrido - de aceleração ortogonal - quadruplo e tempo de voo (Q-TOF Ultima, Micromass, Manchester, Reino Unido) operando em modo íon positivo. As condições de ionização usadas foram: Voltagem do capilar 2.3 kV, voltagem do cone de 100V, e a temperatura da fonte 80°C. O Argônio foi usado para a fragmentação dos íons na célula de colisão.

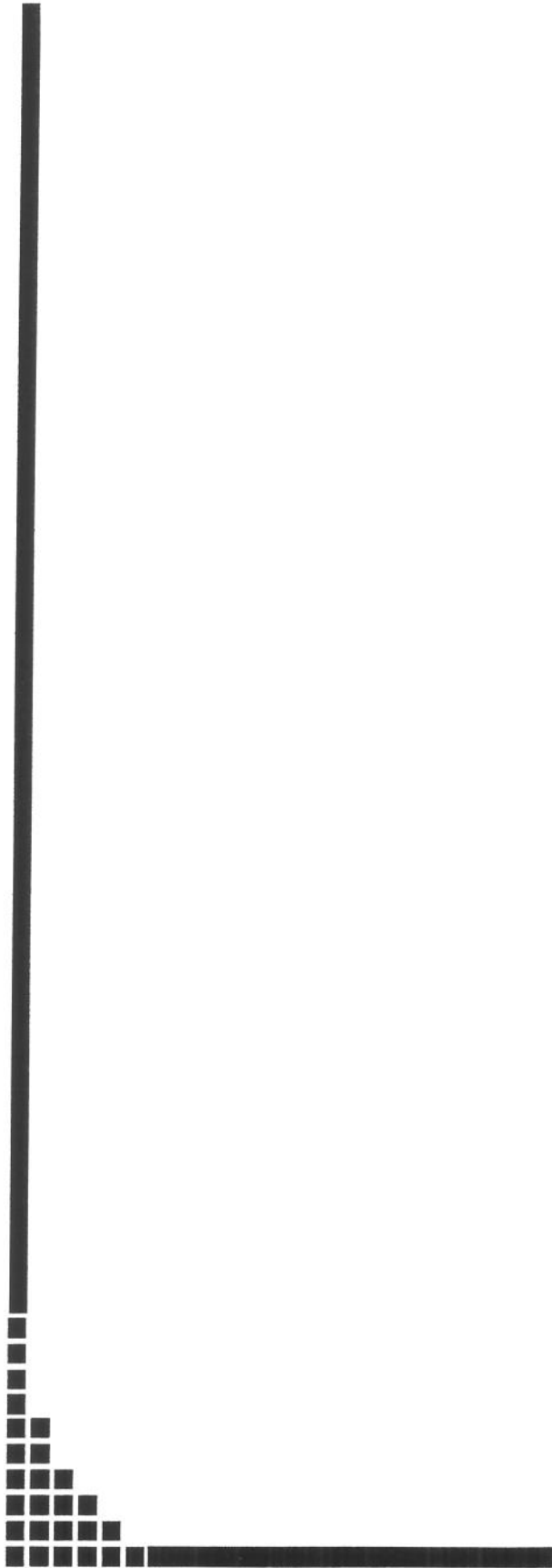
O digesto protéico em gel foi injetado no sistema através de um "autosampler" CapLC. O solvente A consistiu de 5% acetonitrila com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA); o solvente B consistiu de 95% de acetonitrila com 0,1% TFA; e o solvente C consistiu de H₂O em 0,1% TFA. A amostra foi concentrada e dessalificada numa pré-coluna à 30 µl/min durante 3 min usando a

bomba C. Após alteração das bombas A e B, um gradiente foi aplicado na pré-coluna e depois usado para eluir a amostra da coluna analítica. A coluna analítica foi equilibrada com 5% do solvente B, e um gradiente linear de 10% até 70% deste solvente foi aplicado durante 60 min em uma velocidade de fluxo de aproximadamente 200 nL/min, usando-se um “split” pré-coluna com deliberação de bomba em 1 µl/min.

A aquisição dos dados foi realizada on-line com separação em cromatografia capilar. Um exame inicial minucioso foi realizado por TOF-MS, a aquisição foi feita na abrangência de m/z de 400-2000 cada segundo, com critério de alteração de MS para MS/MS incluindo intensidade do íon e estado de carga. A aquisição dos dados MS/MS foi realizada sobre uma abrangência m/z de 50-2000 m/z cada segundo para mais de 3 picos co-eluídos, mas apenas para íons carregados dupla ou triplamente. A energia de colisão variou automaticamente segundo a massa e o estado de carga dos peptídeos eluentes. Os dados de espectrometria de massas em tandem foram processados usando o software Proteinlynx (Micromass, Manchester, UK) e *Mascot MS/MS Ion Search tool* (<http://www.matrixscience.com>).

2.9 - Análise estatística

Os resultados dos testes de adesão e de viabilidade plaquetária foram expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (EMP) de n experimentos. Diferenças estatísticas significativas foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni. Quando apropriado, teste t de Student não-pareado foi usado para comparar grupos específicos. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.



3 - RESULTADOS

3.1 - Adesão de plaquetas ao fibrinogênio

A figura 1 mostra que a incubação das plaquetas não ativadas ($1,2 \times 10^8$ plaqueta/mL) em placas recobertas com fibrinogênio induz adesão significativa aos 15 min ($10 \pm 0,5\%$) e 60 min ($30 \pm 1\%$), sendo a adesão em 60 min significativamente maior do que em 15 min.

Quando as plaquetas foram ativadas com trombina (50 mU/mL), a adesão foi significativamente maior em ambos os tempos de incubação; porém, não notamos diferenças significativas entre os mesmos tempos de incubação ($50 \pm 5\%$ e $55 \pm 4\%$ de adesão em 15 min e 60 min respectivamente; $p < 0,01$).

Plaquetas não ativadas e ativadas com trombina não foram capazes de se aderir à placa quando lavadas 24 h antes do teste de adesão e mantidos em temperatura ambiente.

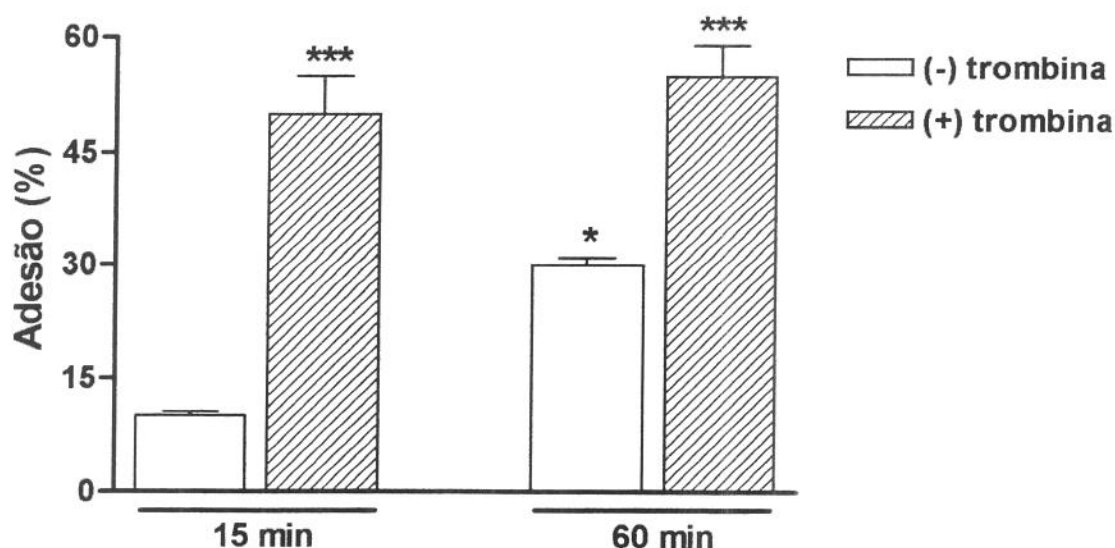


Figura 1 - Adesão de plaquetas humanas ao fibrinogênio. Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foram incubadas por 15 min ou 60 min, na ausência ou na presença de trombina (50 mU/mL). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de seis a nove experimentos separados, cada um em triplicata. * $p < 0,05$ comparado à adesão em 15 min na ausência de trombina; *** $p < 0,01$ comparado à adesão na ausência de trombina.

3.2 - Efeito inibitório do SNP sobre a adesão de plaquetas ao fibrinogênio

A adição de SNP (0,001 - 1000 μM) inibiu de maneira concentração-dependente a adesão de plaquetas não ativadas ao fibrinogênio em 15 min (figura 2A). A adesão das plaquetas ativadas com trombina também foi significativamente inibida pelo SNP. Entretanto, nas concentrações de 0,1 e 1 μM , o efeito inibitório do SNP foi significativamente menor em plaquetas ativadas em relação às plaquetas não ativadas (figura 2 A).

O SNP também inibiu de modo significativo e concentração-dependente a adesão de plaquetas não ativadas e ativadas com trombina, em 60 min, sendo esta inibição de mesma magnitude em ambos os estados plaquetários (figura 2B). O efeito inibitório do SNP, em 0,1 a 10 μM em plaquetas não ativadas, foi significativamente reduzido aos 60 min, quando comparado ao de 15 min de incubação.

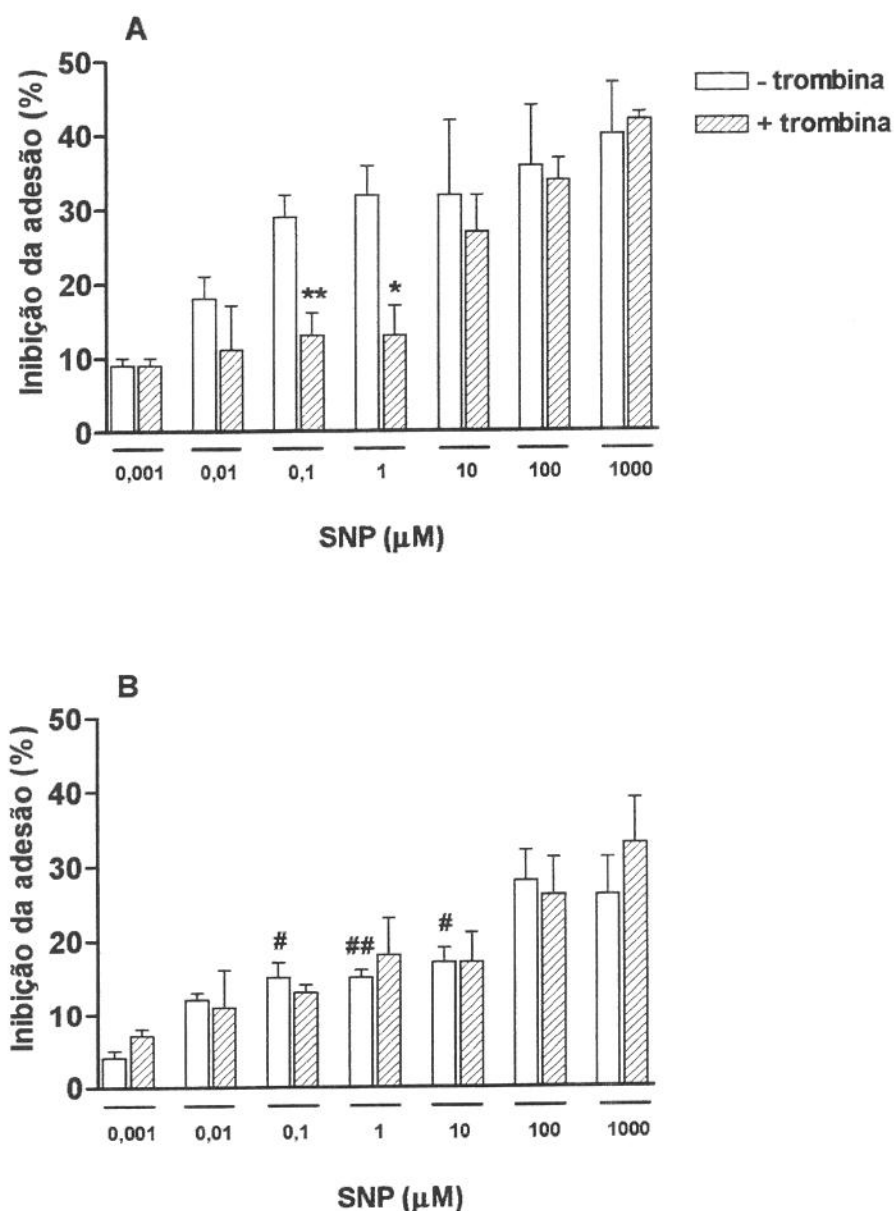


Figura 2 - Efeito inibitório do nitroprussiato de sódio (SNP) na adesão de plaquetas humanas ao fibrinogênio. Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL), não ativadas e ativadas com trombina (50 mU/mL) foram incubadas com SNP (0,001 - 1000 µM) por 15 min (painel A) ou 60 min (painel B) antes da medida da adesão plaquetária. Os resultados representam a média (porcentagem de inibição) $\pm$ E.P.M. de três experimentos separados, cada um em triplicata. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado à respectiva adesão na ausência de trombina. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ comparado à respectiva inibição da adesão em 15 min.

3.2.1 - Atividade da fosfatase ácida

Avaliamos o efeito do SNP sobre a atividade da fosfatase ácida, uma vez que a adesão é quantificada através da determinação da atividade desta enzima.

Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaqueta/mL; 50 μ L/poço), não ativadas ou ativadas com trombina (50 mU/mL) foram adicionadas à placas (não recobertas com fibrinogênio), e incubadas com SNP (0,1 e 1,0 mM), por 15 ou 60 min. Em seguida, determinou-se a atividade da fosfatase ácida, conforme descrito em "Materiais e Métodos". Nossos resultados mostraram que o SNP (0,1 e 1,0 mM), não interfere na atividade da fosfatase ácida em nenhum das condições estudadas.

3.2.2 - Viabilidade plaquetária

Os ensaios de redução do MTT mostraram que o SNP (0,1 e 1,0 mM) não causou efeito tóxico, nem nas plaquetas não ativadas nem nas plaquetas ativadas com trombina, em nenhum dos tempos de incubação estudados (15 e 60 min) (figura 3).

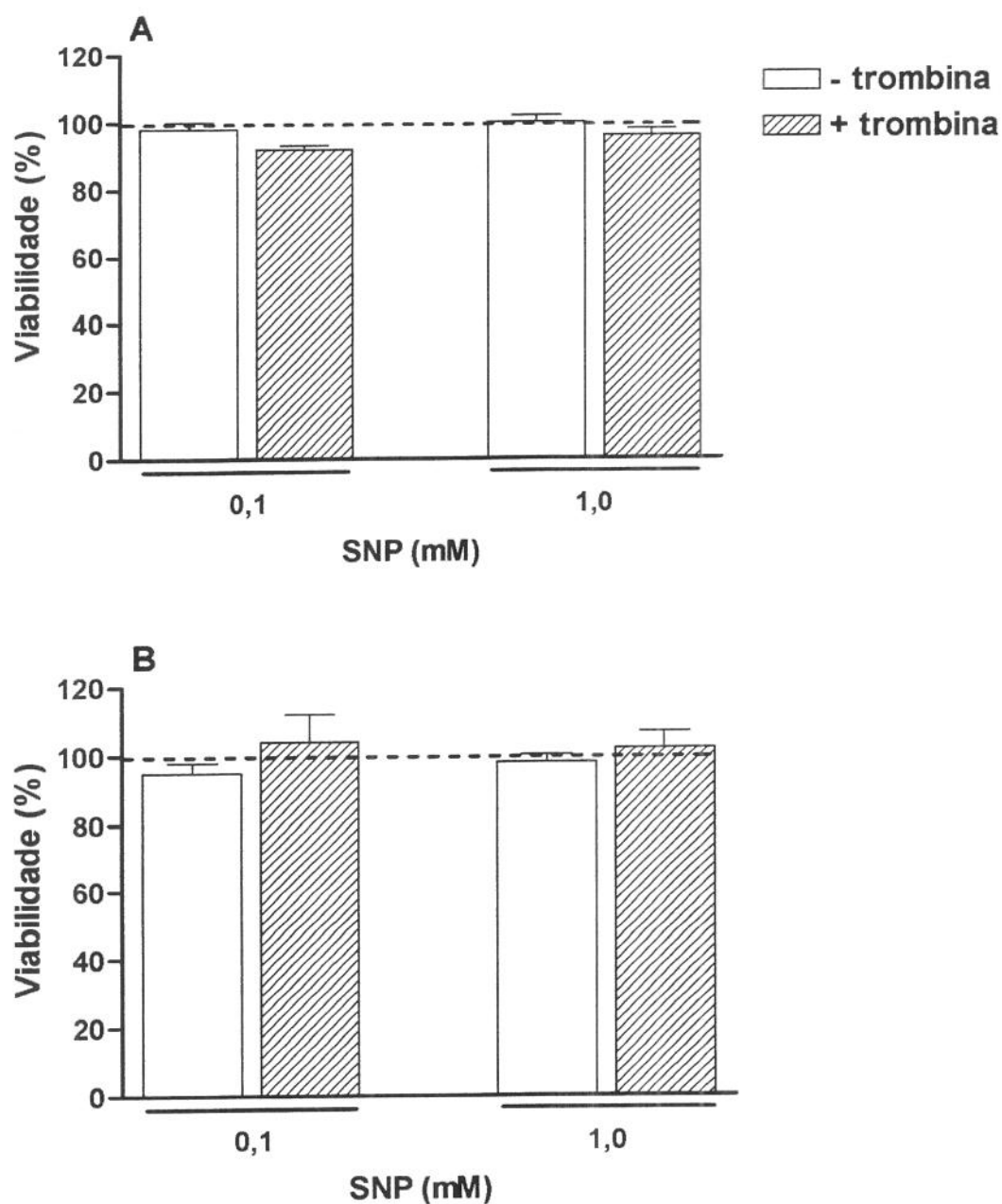


Figura 3 - Efeito do nitroprussiato de sódio (SNP) sobre a viabilidade plaquetária. Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL), nãoativadas ou ativadas com trombina (50 mU/mL) foram incubadas com SNP (0,1 e 1 mM) por 15 min (painel A) ou 60 min (painel B). Os resultados representam a média da porcentagem de viabilidade plaquetária $\pm$ E.P.M. de três experimentos separados, cada um em triplicata.

3.2.3 - Níveis de GMPc em plaquetas incubadas com SNP: Efeito do ODQ

A figura 4 A mostra que, em 15 min, a inibição da adesão plaquetária pelo SNP (0,1 mM) foi acompanhada por um marcante aumento nos níveis de GMPc nas plaquetas não ativadas e ativadas pela trombina. O pré-tratamento das plaquetas com ODQ (10 μ M) praticamente aboliu a elevação dos níveis de GMPc em resposta ao SNP (0,1 mM). A inibição da adesão plaquetária, nesta concentração de SNP, foi também revertida pelo tratamento com ODQ (figura 4B).

De maneira semelhante, a inibição da adesão plaquetária pelo SNP, na concentração de 1 mM, foi acompanhada por um marcante aumento nos níveis de GMPc, sendo este aumento prevenido pelo ODQ (figura 4A). Entretanto, o ODQ não modificou significativamente o efeito inibitório do SNP (1 mM) na adesão plaquetária (figura 4B).

No tempo de incubação de 60 min (figura 5), o SNP (0,1 e 1,0 mM) aumentou os níveis de GMPc, tanto nas plaquetas não ativadas quanto nas plaquetas ativadas com trombina (figura 5A), à semelhança do tempo de 15 min. O pré-tratamento das plaquetas com ODQ (10 μ M) restabeleceu os níveis de GMPc aos valores basais, e reduziu marcadamente o efeito inibitório do SNP (0,1 e 1 mM) na adesão das plaquetas não ativadas e ativadas pela trombina (figura 5B).

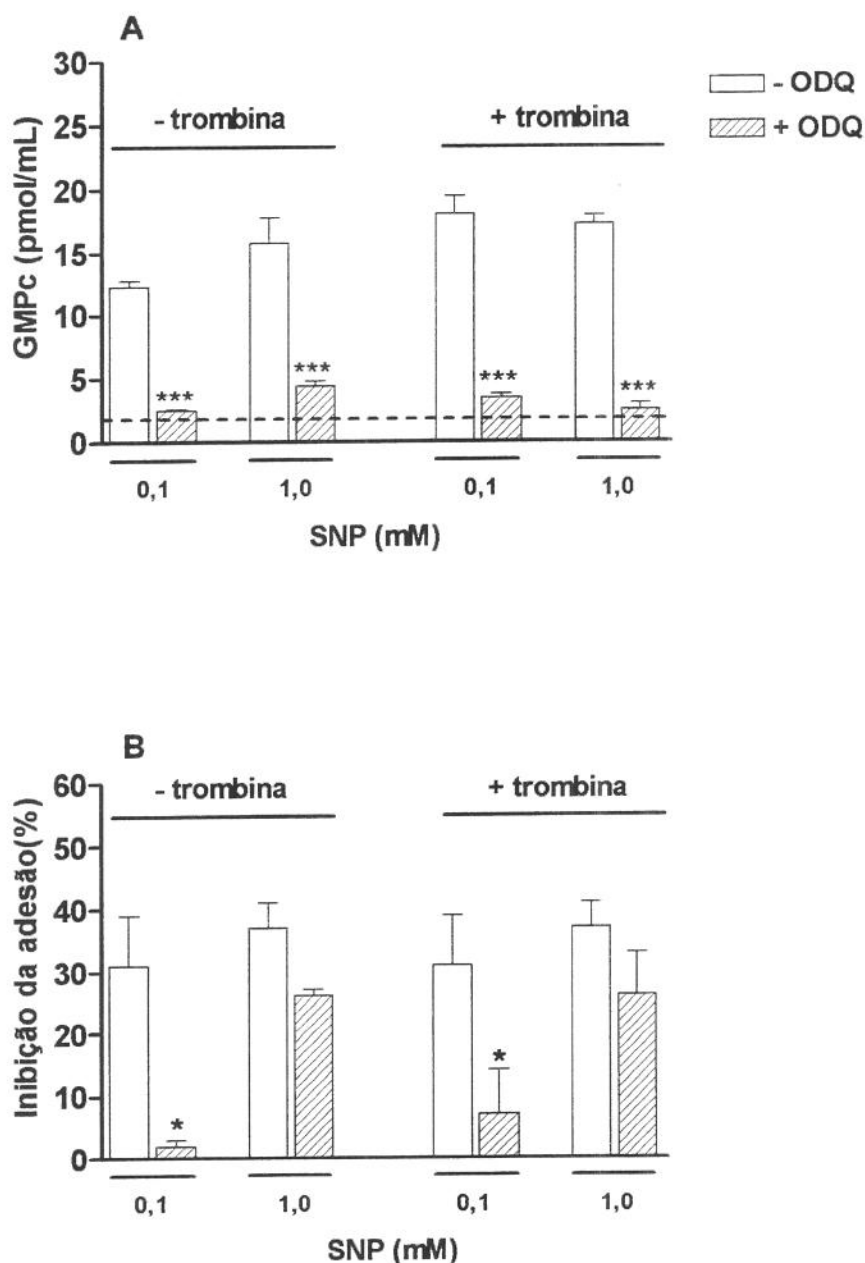


Figura 4 - Efeito do inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, nos níveis de GMPc (painel A) e na inibição da adesão plaquetária (painel B) pelo nitroprussiato de sódio (SNP) em 15 min. A linha tracejada representa os níveis basais de GMPc. Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) não ativadas ou ativadas com trombina (50 mU/mL) foram incubadas com SNP (0,1 e 1 mM) por 15 min, na presença ou na ausência de ODQ (10 μ M). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de três experimentos separados. * $p < 0,05$ comparado com experimentos na ausência de ODQ.

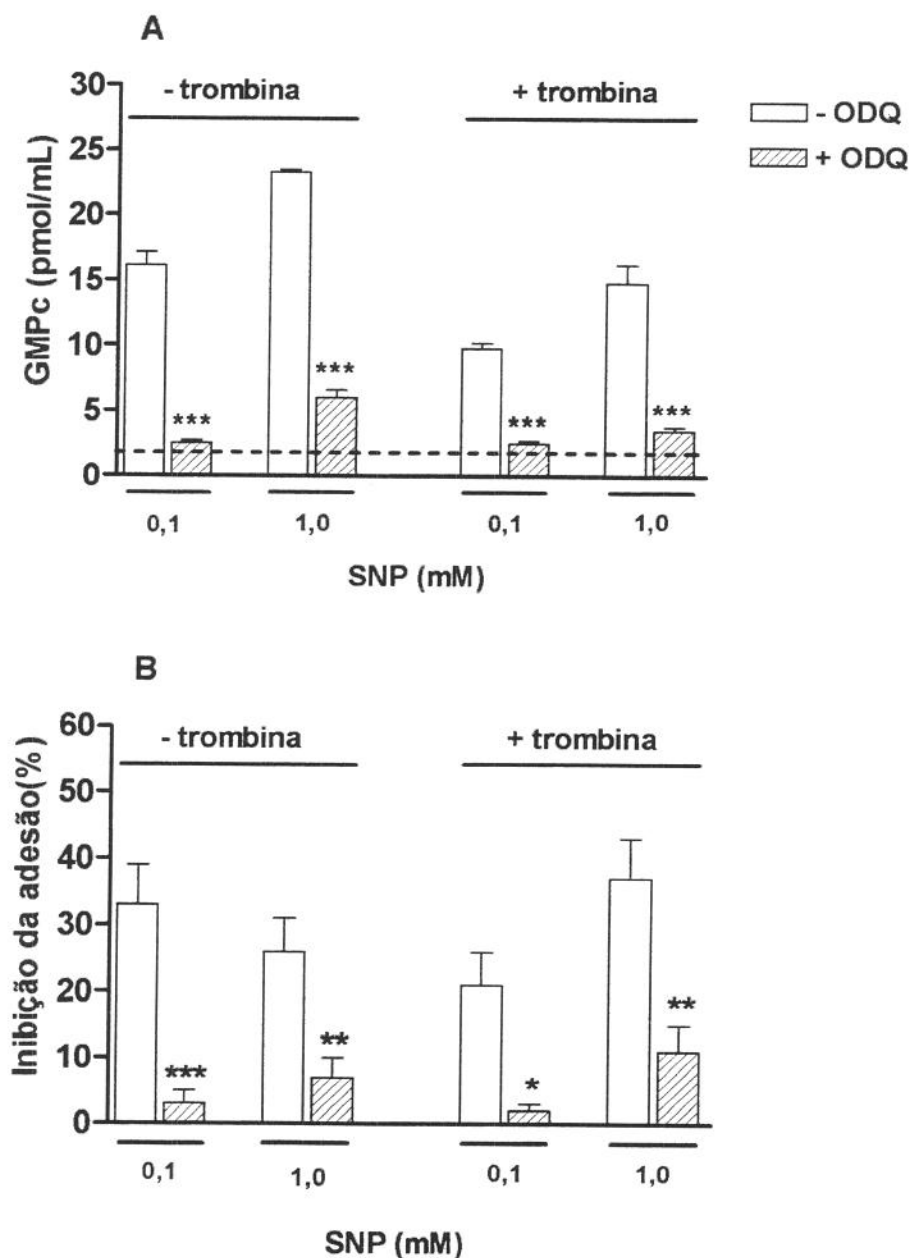


Figura 5 - Efeito do inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, nos níveis de GMPc (painel A) e na inibição da adesão plaquetária (painel B) pelo nitroprussiato de sódio (SNP) em 60 min. A linha tracejada representa os níveis de GMPc das plaquetas em repouso. Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) não ativadas ou ativadas com trombina (50 mU/mL) foram incubadas com SNP (0,1 e 1 mM) por 60 min na presença ou na ausência de ODQ (10 μ M). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de três experimentos separados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado com experimentos na ausência de ODQ.

3.2.4 - Efeito da Superóxido dismutase (SOD)

O pré-tratamento das plaquetas apenas com SOD (100 U/mL) inibiu significativamente a adesão das plaquetas em 15 minutos ($17 \pm 6\%$ e $28 \pm 4\%$, para plaqueta não ativada e ativada com trombina, respectivamente) e 60 min ($10 \pm 4\%$ e $16 \pm 5\%$) para plaqueta não ativada e ativada com trombina, (respectivamente).

Em 15 min, a SOD (100 U/mL) não modificou a resposta inibitória do SNP (0,1 mM) na adesão de plaquetas não ativadas e ativadas com trombina, ao passo que na concentração maior de SNP (1 mM), o efeito inibitório do mesmo sobre a adesão foi significativamente reduzido pela SOD (figura 6A).

Em 60 min, a SOD não afetou significativamente a inibição da adesão plaquetária pelo SNP em nenhuma das condições usadas (figura 6B).

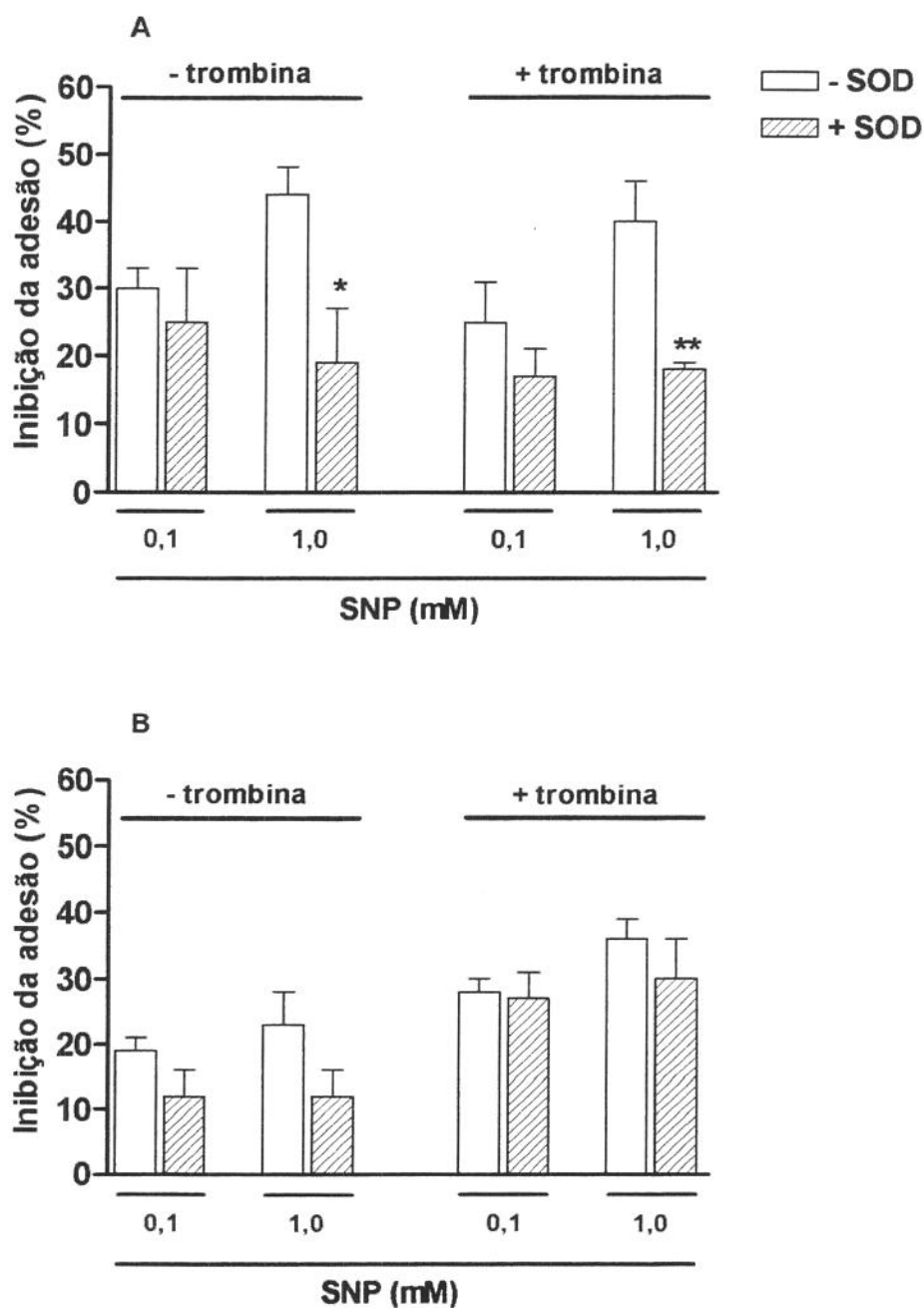


Figura 6 - Efeito da superóxido dismutase (SOD) na inibição da adesão plaquetária pelo nitroprussiato de sódio (SNP) em 15 min (painel A) e 60 min (painel B). Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL não ativadas ou ativadas com trombina (50 mU/mL) foram incubadas com SNP (0,1 e 1 mM) por 15 min ou 60 min na presença ou na ausência de SOD (100 U/mL). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de três experimentos separados. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado à adesão na ausência de SOD).

3.2.5 - Efeito do galato

O pré-tratamento das plaquetas com galato (5 μ M) causou apenas uma discreta inibição da adesão, tanto em plaqueta não ativada quanto em ativada com trombina, em ambos os tempos ($7 \pm 6\%$ e $10 \pm 3\%$ em 15 min e 60 min, respectivamente).

Em 15 min, o galato (5 μ M) não modificou a resposta inibitória do SNP (0,1 mM) nas plaquetas não ativadas e ativadas com trombina, ao passo que na concentração maior de SNP (1 mM), o efeito inibitório deste foi significativamente reduzido pelo galato (figura 7A).

Em 60 min, o galato não reduziu a inibição da adesão plaquetária pelo SNP em nenhuma das condições usadas; ao contrário, na concentração maior de SNP (1 mM), o galato promoveu um aumento significativo da inibição da adesão em plaquetas não ativadas (figura 7B).



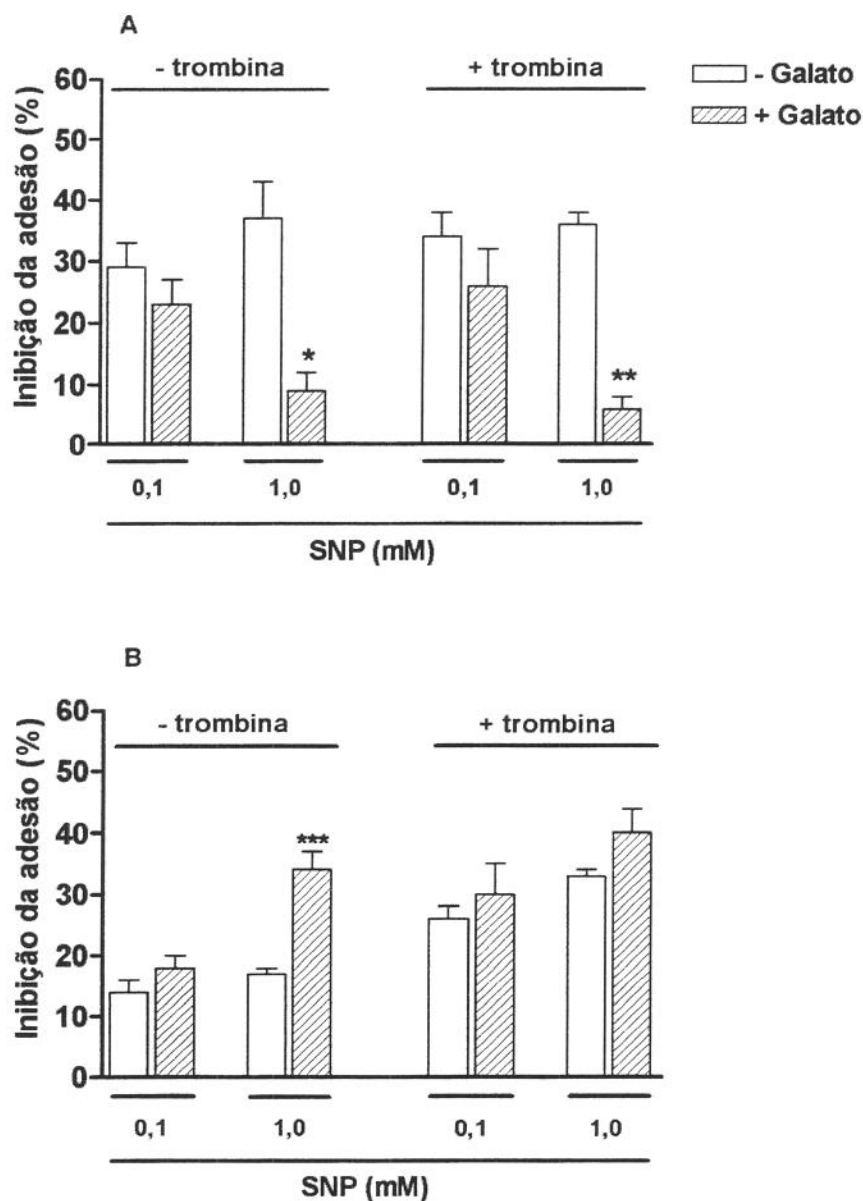


Figura 7 - Efeito do galato na inibição da adesão plaquetária pelo nitroprussiato de sódio (SNP) em 15 min (painel A) e 60 min (painel B). Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL não ativadas ou ativadas com trombina (50 mU/mL) foram incubadas com SNP (0,1 e 1 mM) por 15 min ou 60 min na presença ou na ausência de galato (5 μ M). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de três experimentos separados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado à adesão na ausência de galato.

3.2.6 - *Western blotting* para 3-nitrotirosina

Em plaquetas não ativadas (6×10^6 plaquetas/mL) não detectamos banda imunorreativa para nitrotirosina (figura 8). Além disso, a incubação de plaquetas não ativadas com SNP (0,1 mM), por 15 min, não revelou nenhuma proteína nitrada. Entretanto, quando as plaquetas foram tratadas com a concentração maior de SNP (1 mM), houve o aparecimento de nitração de proteína nos resíduos de tirosina com uma massa molecular aparente de 105 kDa, identificada como alfa-actinina-1.

Observamos também que a ativação das plaquetas com trombina determinou o aparecimento de uma banda nitrada semelhante a do SNP (1 mM) nas plaquetas não ativadas (figura 8). A exposição das plaquetas ativadas com trombina ao SNP (0,1 mM) não afetou a intensidade da banda imunorreativa. Entretanto, o tratamento com SNP (1 mM), por 15 min, aumentou a imunorreatividade da banda em 30%, como demonstrado pela análise densitométrica (figura 8). Amostras de plaquetas (não ativadas e ativadas) tratadas com SNP (0,1 e 1 mM) por 60 min não mostraram nenhuma nitração de proteína nos resíduos de tirosina.

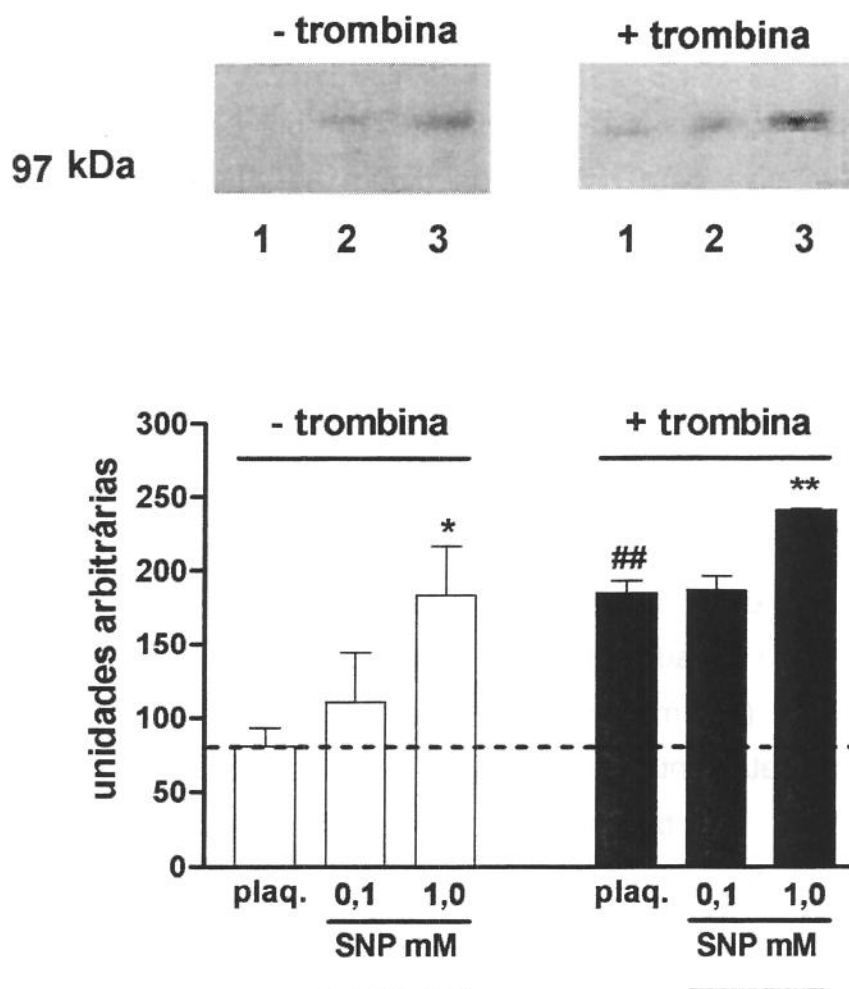


Figura 8 - Detecção de proteínas nitradas em plaquetas humanas. As plaquetas (6×10^6 plaqueta/mL) foram incubadas com nitroprussiato de sódio (SNP) (0,1 e 1 mM), na ausência ou na presença de trombina (50 mU/mL). Depois de 15 min de incubação, a suspensão de plaquetas foi centrifugada (10,000 g, 10 min) e o *pellet* ressuspensão em 40 μ L de tampão de dissociação. As amostras (40 μ L/poço) foram colocadas em SDS-PAGE 7,0%, e analisadas por *Western blot* usando-se anticorpo monoclonal anti-nitrotiosina. As linhas 1, 2 e 3 representam as plaquetas não tratadas, e plaquetas incubadas com SNP nas concentrações de 0,1 e 1 mM, respectivamente. A posição do marcador molecular (em kDa) está indicada à esquerda. O gráfico mostra a análise densitométrica de bandas de proteínas nitradas em plaquetas de três voluntários. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle. ## $p < 0,01$ comparado a plaquetas não ativadas.

3.2.7 - Purificação e identificação de proteína nitrada

A figura 9A mostra o perfil da proteína da fração obtida através da diluição em coluna *Sephacryl* S-200 HR. A análise por *Western blotting*, usando-se anticorpo anti-nitrotirosina, indicou a presença de proteína nitrada nas frações 22 e 23; portanto, essas frações foram reunidas e carregadas numa coluna de hidroxiapatita. A eluição da coluna de hidroxiapatita com 100 e 200 mM de Na_2HPO_4 resultou em uma purificação substancial da proteína nitrada no resíduo de tirosina (Figura 9B).

A proteína nitrada contida na banda do gel SDS foi identificada como alfa-actinina 1 humana, uma isoforma do citoesqueleto (P12814), com base no peso molecular e na sequência de dados dos dezoito peptídeos alquilados tripticos, resultantes da digestão do gel (Tabela 1).

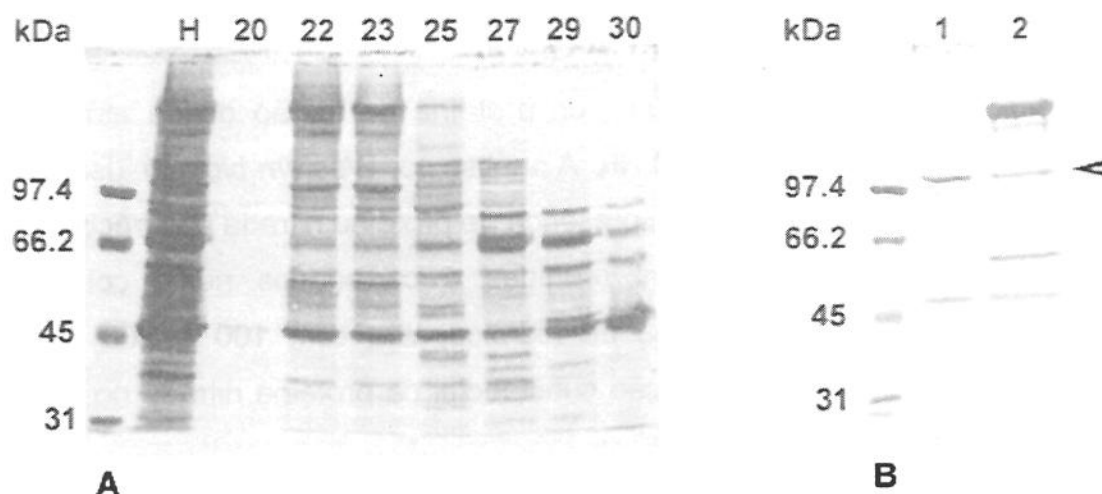


Figura 9 - Purificação da proteína nitrada em plaquetas lavadas. Gel de poliacrilamida-SDS corado com *Coomassie* de proteínas contidas nas frações de eluição das colunas Sephacryl S-200 HR (A) e hidroxiapatita (B). *Western blotting* usando-se anticorpo monoclonal anti-nitritirosina indicou a presença de uma banda nitrada nas frações 22 e 23, as quais foram reunidas e colocadas na coluna de hidroxiapatita. Número 1 e 2 representam as proteínas ligadas eluídas com 100 e 200 mM de fosfato de sódio. A flecha indica a banda de proteína cortada e analisada por LC/ESI-MS/MS. A linha H representa a proteína contida no material total antes da cromatografia (30 mg de proteína/linha). A posição do marcador (em kDa) está indicada à esquerda.

Tabela 1 - Massa e sequência dos peptídeos tripticos obtidos da digestão do gel da banda eletroforética mostrada na figura 9, comparado com a massa teórica de peptídeos tripticos da alfa actinina-1. Todas as massas moleculares estão relatadas como monoisotópicas.

Posição	Massa teórica(Da)	Medida da massa(Da)	Delta massa(Da)	Sequência
107 - 121	1541.86	1541.83	0.03	LVSIGAEIIVDGNVK
134 - 147	1536.79	1536.77	0.02	FAIQDISVEETSAK
186 - 195	1226.66	1226.64	0.02	HRPELIDYGK
221 - 236	1758.91	1758.85	0.07	MLDAEDIVGTARPDEK
237 - 254	2007.00	2006.96	0.04	AIMTYVSSFYHAFSGAQK
293 - 312	2422.23	2422.19	0.04	TIPWLENRVPENT
347 - 359	1460.76	1460.72	0.05	LSNRPAFMPSEGR
403 - 413	1213.60	1213.57	0.02	ASIHEAWTDGK
503 - 516	1710.95	1710.91	0.04	LLETIDQLYLEYAK
503 - 517	1867.05	1867.01	0.05	LLETIDQLYLEYAKR
556 - 565	1114.59	1114.56	0.02	ATLPDADKER
614 - 624	1324.68	1324.65	0.03	RDQALTEEHAR
656 - 672	1978.04	1977.99	0.05	ISIEMHGTLEDQLSHLR
677 - 684	947.58	947.54	0.03	SIVNYKPK
685 - 704	2338.22	2338.18	0.04	IDQLEGDHQLIQEALIFDNK
685 - 714	3620.83	3620.77	0.06	IDQLEGDHQLIQEALIFDNKHTNYTMEHIR
753 - 772	2290.16	2290.04	0.12	ASFNHFDRDHSGTLGPPEEFK
819 - 834	1728.78	1728.75	0.03	ETADTDTADQVMASFK

3.3 - Efeito inibitório do SIN-1 sobre a adesão de plaquetas ao fibrinogênio

Na figura 10A podemos observar que o SIN-1 (0,001 – 100 μ M) inibiu de maneira concentração-dependente a adesão de plaquetas ao fibrinogênio por 15 min. Na concentração de 1000 μ M, o SIN-1 promoveu uma inibição total da adesão plaquetária. Resultados semelhantes foram obtidos com as plaquetas estimuladas com trombina.

Em 60 min de incubação com SIN-1 (0,001 – 100 μ M), a inibição da adesão de plaquetas não estimuladas foi da mesma magnitude (10 - 20%); porém, na concentração de 1000 μ M, o SIN-1 praticamente aboliu a adesão plaquetária. Resultado semelhante foi obtido com as plaquetas estimuladas com trombina, diferindo apenas na concentração de 100 μ M, onde o SIN-1 apresentou um efeito inibitório significativamente maior nesta condição, comparado à respectiva inibição da adesão em plaquetas não ativadas (figura 10B).

Além disso, a inibição da adesão plaquetária causada pelo SIN-1 nas concentrações de 0,001 a 100 μ M foi significativamente menor em 60 min comparada a 15 min (figura 10).

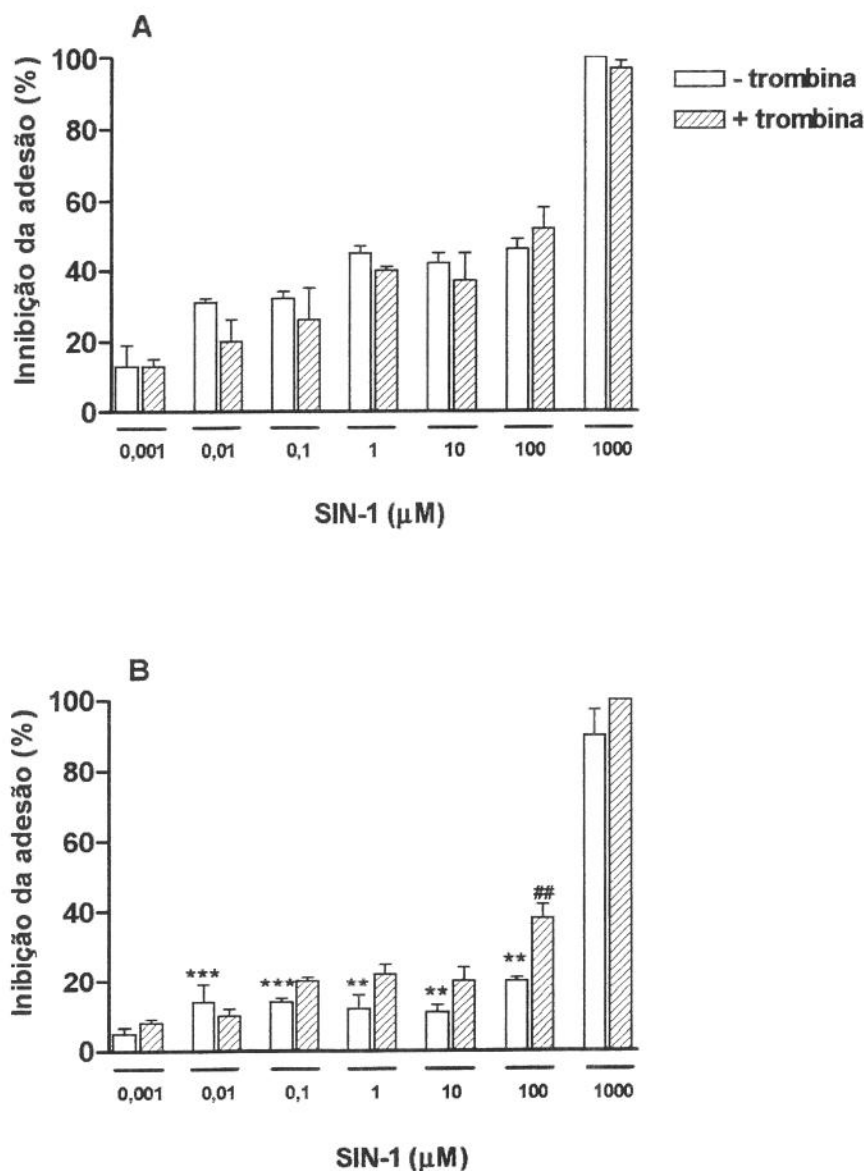


Figura 10 - Efeito inibitório do 3-morpholinosyndnomine (SIN-1) na adesão de plaquetas humanas ao fibrinogênio. Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/poço), não ativadas e ativadas com trombina (50 mU/mL) foram incubadas com SIN-1 (0,001 – 1000 µM) por 15 min (painel A) ou 60 min (painel B) antes da medida da adesão plaquetária. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de três a cinco experimentos separados, cada um em triplicata. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado à respectiva inibição da adesão em 15 min. ## $p < 0,01$ comparado à respectiva adesão na ausência de trombina.

3.3.1 - Atividade da fosfatase ácida

Plaquetas humanas ($1,2 \times 10^8$ plaqueta/mL) não ativadas ou ativadas com trombina, incubadas previamente com SIN-1 (0,1 mM), por 15 ou 60 min, não sofreram alteração na atividade da fosfatase ácida. Entretanto, a incubação com a concentração maior de SIN-1 (1 mM), em ambos os tempos, mostrou uma diminuição significativa da atividade da fosfatase ácida, tanto em plaquetas não ativadas quanto em ativadas com trombina (figura 11).

3.3.2 - Viabilidade plaquetária

Como mostra a figura 12, o SIN-1 (0,1 mM) não causou nenhum efeito tóxico em plaquetas não ativadas ou ativadas com trombina, em nenhum dos tempos de incubação estudados (15 e 60 min). Na concentração maior (1 mM), o SIN-1 reduziu significativamente a viabilidade das plaquetas não ativadas ou ativadas, tanto em 15 min quanto em 60 min.

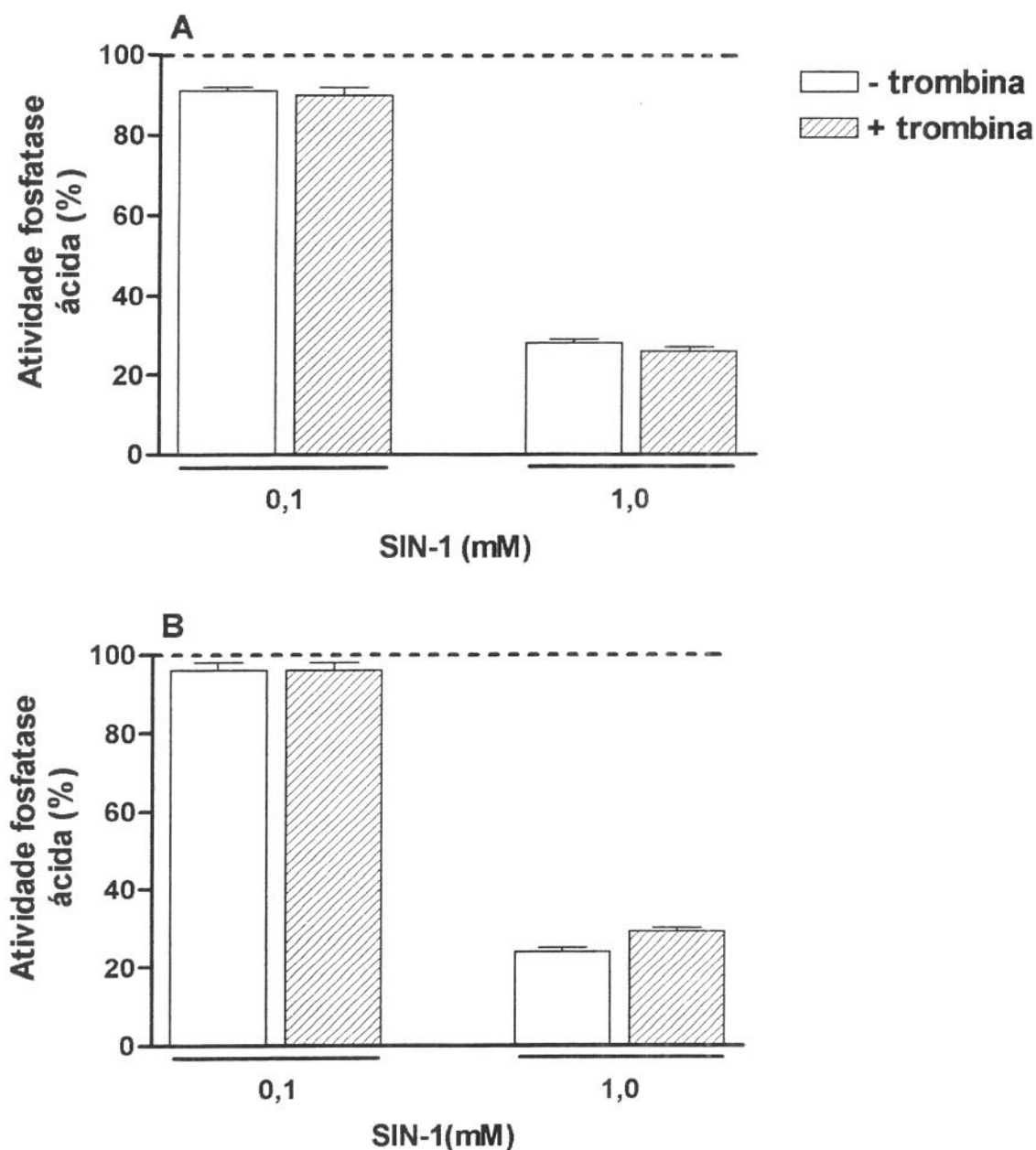


Figura 11 - Efeito do 3-morpholinosyndnomine (SIN-1) sobre a atividade da fosfatase ácida plaquetária. Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL), não ativadas com ativadas com trombina (50 mU/mL) foram incubadas com SIN-1 (0,1 e 1 mM) por 15 min (painel A) ou 60 min (painel B). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de três experimentos separados, cada um em triplicata.

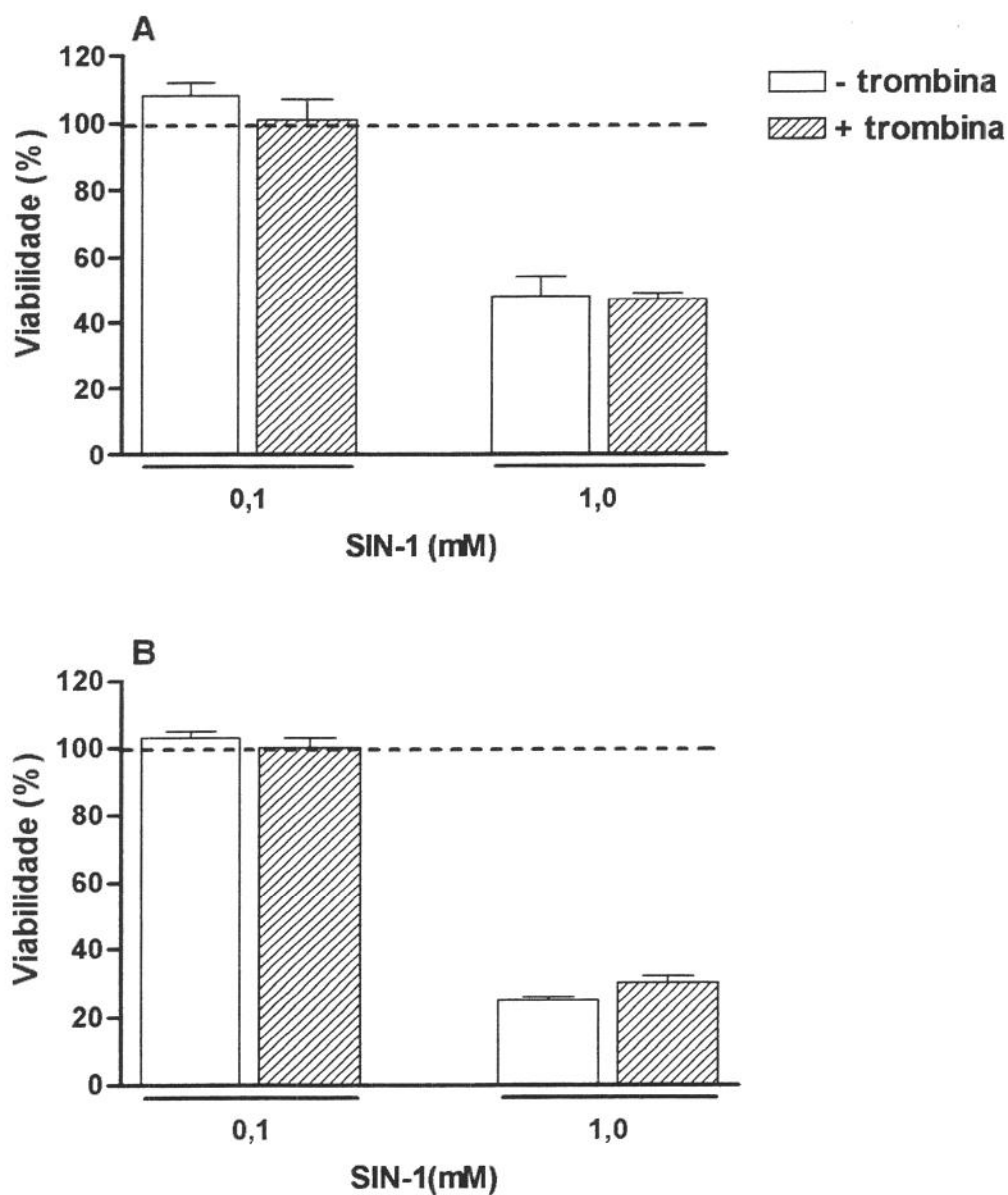


Figura 12 - Efeito do 3-morpholinosyndnomine (SIN-1) sobre a viabilidade plaquetária. Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) não ativadas ou ativadas com trombina (50 mU/mL) foram incubadas com SIN-1 (0,1 e 1 mM) por 15 min (painel A) ou 60 min (painel B). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de três experimentos separados, cada um em triplicata.

3.3.3 - Níveis de GMPc em plaquetas incubadas com SIN-1: efeito do ODQ

Na figura 13 observamos que, em 15 min, a inibição da adesão plaquetária pelo SIN-1 (0,1 mM) foi acompanhada por um marcante aumento nos níveis de GMPc, tanto em plaquetas não ativadas quanto em ativadas pela trombina. O pré-tratamento das plaquetas (não ativadas) com ODQ (10 μ M) praticamente aboliu a elevação dos níveis de GMPc induzido pelo SIN-1 (0,1 mM) (figura 13A) e reverteu a inibição da adesão plaquetária (figura 13B).

Quando as plaquetas foram ativadas com trombina, o ODQ praticamente aboliu a elevação dos níveis de GMPc induzido pelo SIN-1 (0,1 mM); porém, nesta condição, o ODQ não afetou significativamente a inibição da adesão das plaquetas (figura 13B).

O aumento nos níveis de GMPc causado pela concentração maior de SIN-1 (1 mM) foi significativamente diminuído pelo ODQ (figura 13A); porém, o ODQ não modificou significativamente no efeito inibitório do SIN-1 (1 mM) na adesão plaquetária, nem em plaquetas não ativadas nem em ativadas pela trombina (figura 13B).

No tempo de incubação de 60 min, o SIN-1 (0,1 e 1,0 mM) aumentou significativamente os níveis de GMPc, tanto em plaquetas não ativadas quanto em plaquetas ativadas pela trombina (figura 14). O pré-tratamento das plaquetas com ODQ (10 μ M) reduziu significativamente o aumento nos níveis de GMPc mediado pelo SIN-1 (0,1 e 1,0 mM), tanto em plaquetas não ativadas quanto em ativadas pela trombina. A inibição da adesão de plaquetas não ativadas causada pelo SIN-1 (0,1 mM), também foi significativamente diminuída pelo ODQ (figura 14B); porém o ODQ não afetou a inibição da adesão causada pelo SIN-1 na concentração de 1 mM. Do mesmo modo, o ODQ não alterou o efeito inibitório do SIN-1 (0,1 e 1 mM) na adesão das plaquetas ativadas pela trombina (figura 14B).

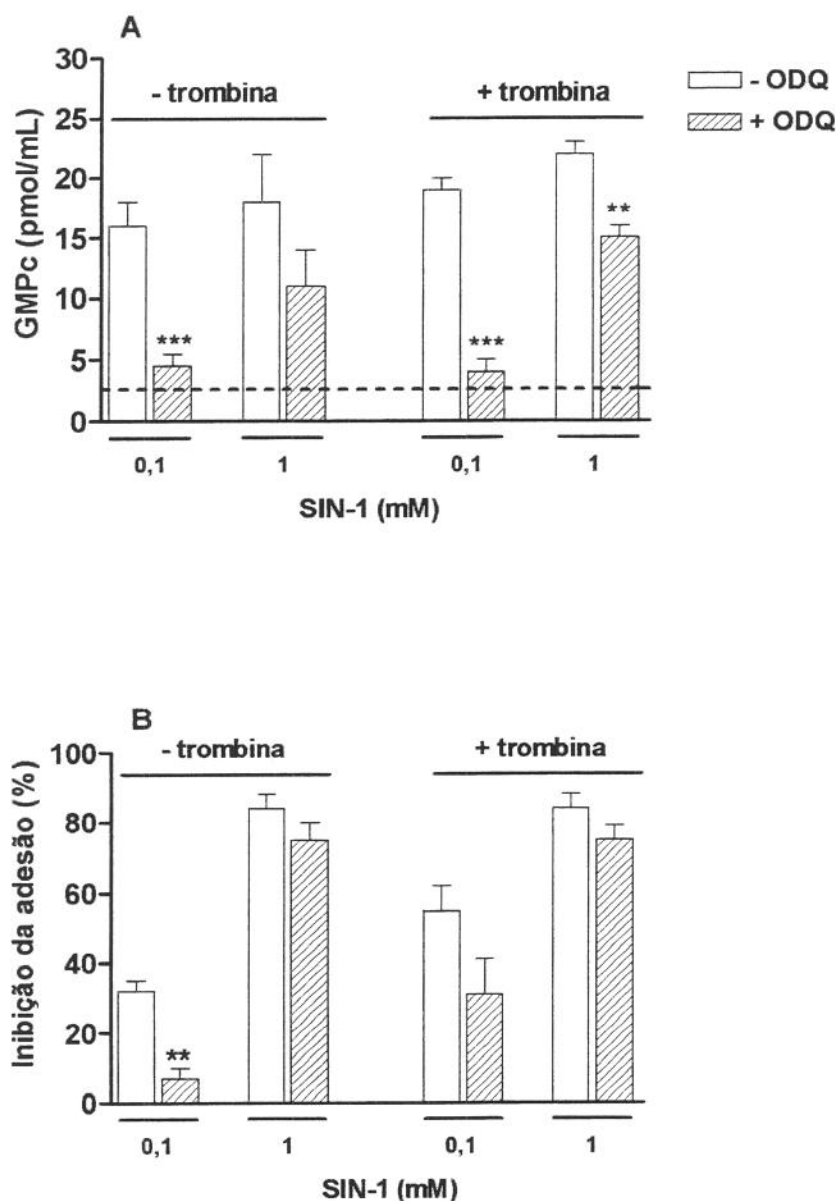


Figura 13 - Efeito do inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, nos níveis de GMPc (painel A) e na inibição da adesão plaquetária (painel B) pelo 3-morpholinosyndnomine (SIN-1) em 15 min. A linha tracejada representa os níveis de GMPc das plaquetas em repouso. Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) não ativadas ou ativadas com trombina (50 mU/mL) foram incubadas com SIN-1 (0.1 e 1mM) por 15 min na presença ou na ausência de ODQ (10 μ M). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de três experimentos separados. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado aos experimentos na ausência de ODQ.

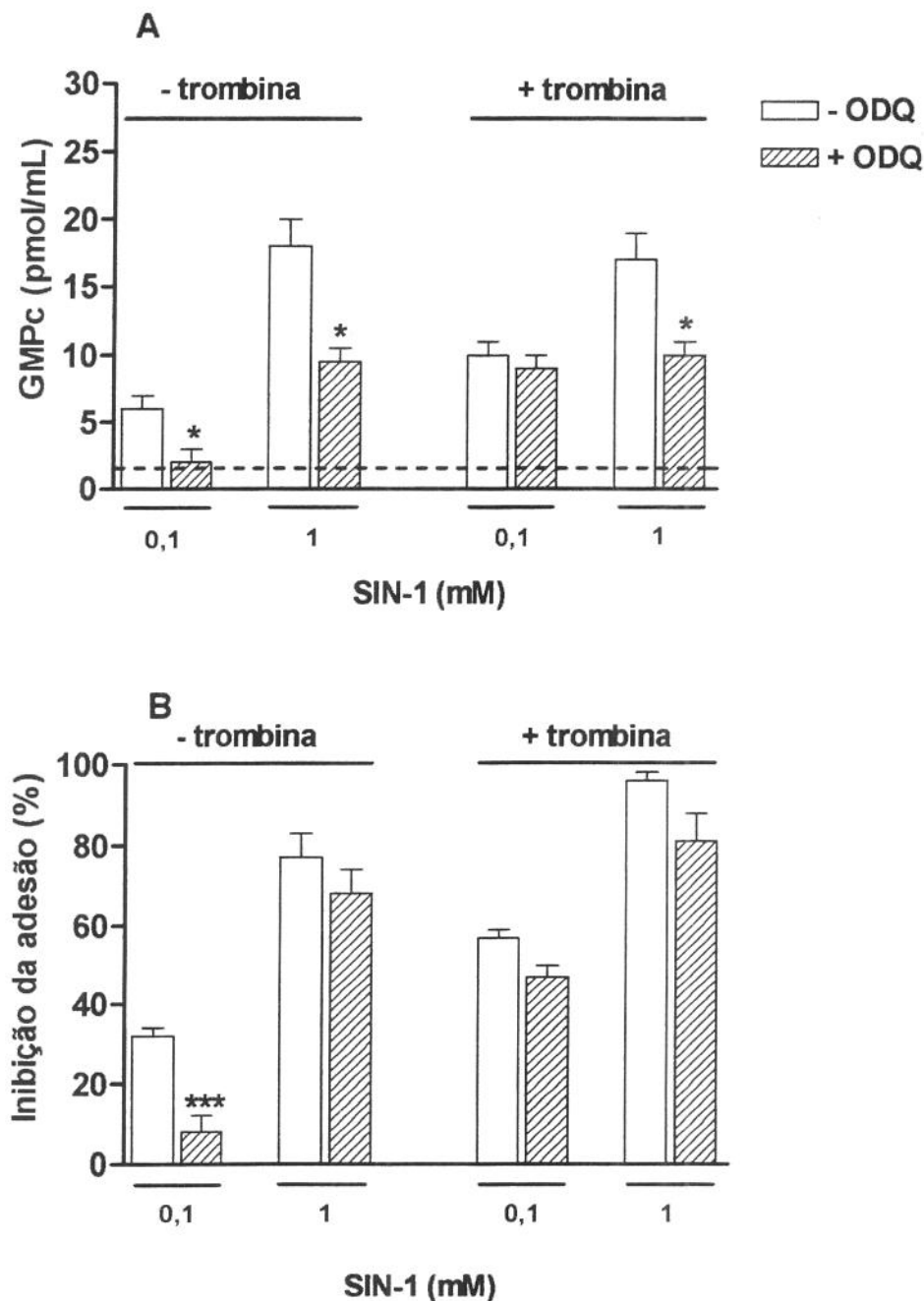


Figura 14 - Efeito do inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, nos níveis de GMPc (painel A) e na inibição da adesão plaquetária (painel B) pelo 3-morpholinosyndnomine (SIN-1) em 60 min. Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) não ativadas ou ativadas com trombina (50 mU/mL) foram incubadas com SIN-1 (0,1 e 1mM) por 60 min na presença ou na ausência de ODQ (10 μ M). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de três experimentos separados. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparado aos experimentos na ausência de ODQ.

3.3.4 - Efeito da Superóxido dismutase (SOD)

Observamos na figura 15 que, em 15 min de incubação, a SOD (100 U/mL) não modificou a resposta inibitória do SIN-1 (0,1 mM) nas plaquetas não ativadas com trombina. Resultado contrário foi encontrado com o SIN-1 na concentração maior (1 mM), onde a inibição da adesão promovida pelo SIN-1 foi significativamente revertida pela SOD. Já nas plaquetas ativadas pela trombina, o efeito inibitório do SIN-1 (0,1 e 1 mM) foi significativamente reduzido pela SOD (figura 15A).

No tempo de 60 min, a SOD reverteu de modo significativo a inibição da adesão plaquetária pelo SIN-1 em todas as condições usadas (figura 15B).

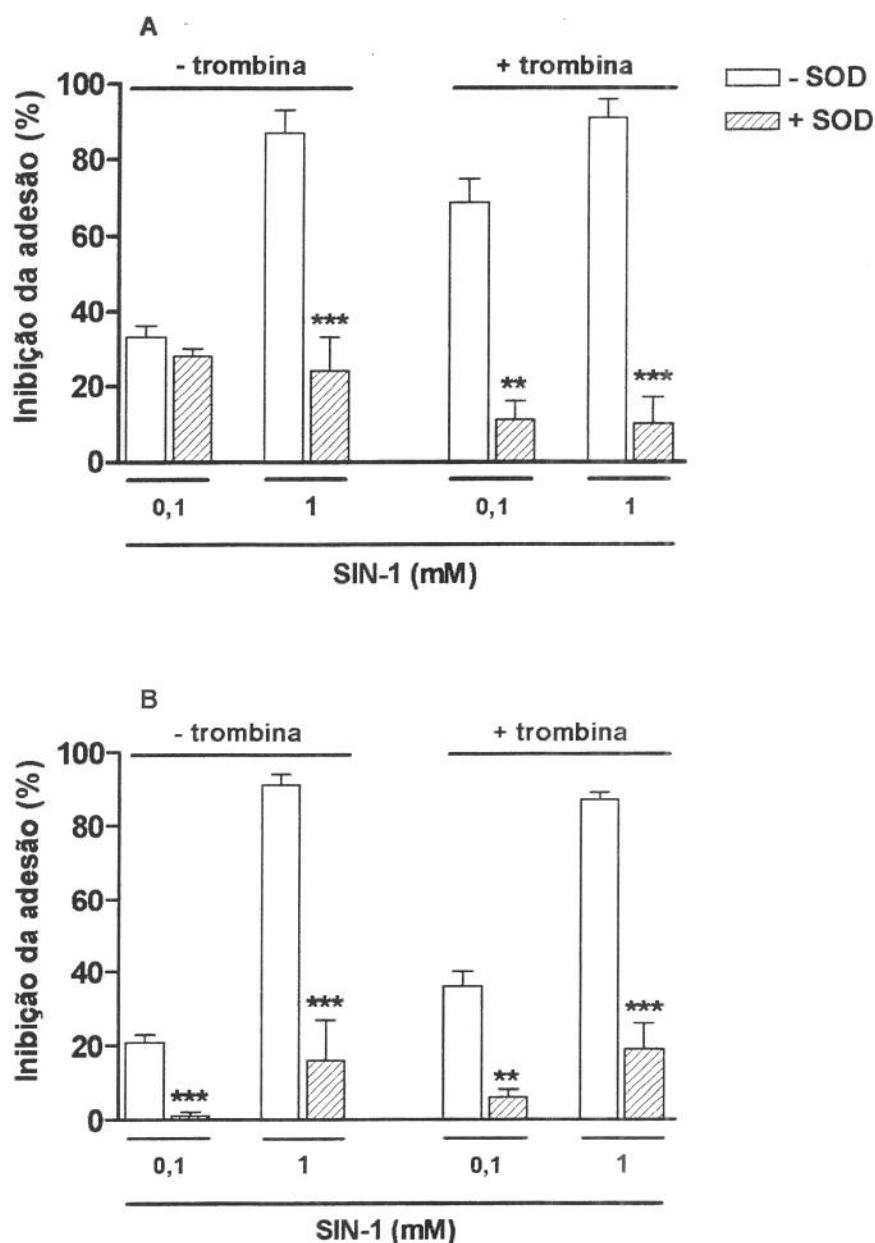


Figura 15 - Efeito da superóxido dismutase (SOD) na inibição da adesão plaquetária pelo SIN-1 em 15 min (painel A) e 60 min (painel B). Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) não ativadas ou ativadas com trombina (50 mU/mL) foram incubadas com 3-morpholinosyndnomine (SIN-1) (0,1 e 1 mM) por 15 min ou 60 min na presença ou na ausência de SOD (100 U/mL). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de três experimentos separados. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado à adesão na ausência de SOD.

3.3.5 - Efeito da SOD sobre a viabilidade e a atividade da fosfatase ácida

Os dados ilustrados nas figuras 16 e 17 mostram, respectivamente, o efeito da SOD (100 U/mL) na redução da viabilidade e da atividade da fosfatase ácida plaquetária causada pelo SIN-1 (1 mM), nos dois tempos de incubação (15 e 60 min).

Nossos resultados mostram que a SOD promoveu reversão praticamente total da inibição da viabilidade causada pelo SIN-1, tanto em plaquetas não ativadas quanto em ativadas pela trombina, em ambos os tempos de incubação (figura 16).

De maneira semelhante, a SOD reverteu significativamente a diminuição da atividade da fosfatase ácida causada pelo SIN-1 (1 mM) em todas as condições usadas (figura 17).

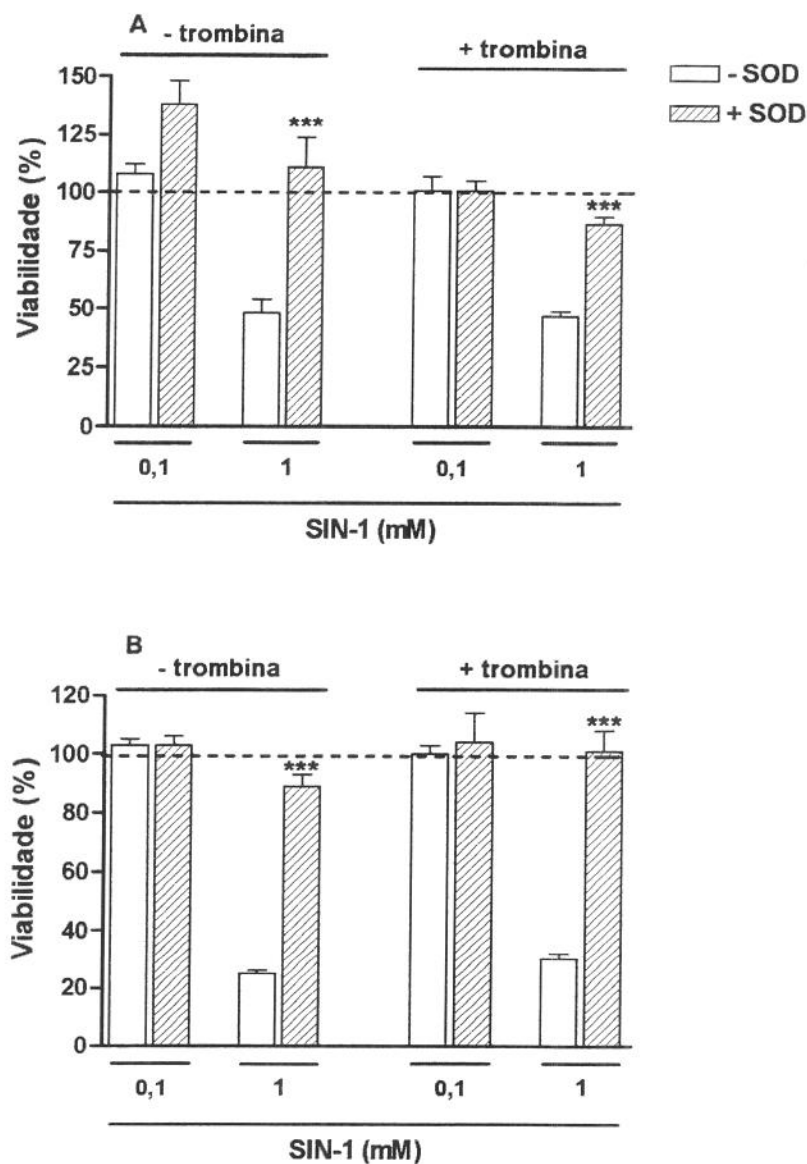


Figura 16 - Efeito da superóxido dismutase (SOD) na inibição da viabilidade plaquetária pelo 3-morpholinosyndnomine (SIN-1) em 15 min (painel A) e 60 min (painel B). Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) não ativadas ou ativadas com trombina (50 mU/mL) foram incubadas com SIN-1 (0,1 e 1 mM) por 15 min ou 60 min na presença ou na ausência de SOD (100 U/mL). Os resultados representam a média da $\pm$ E.P.M. de três experimentos separados. *** $p < 0,01$ comparado à adesão na ausência de SOD.

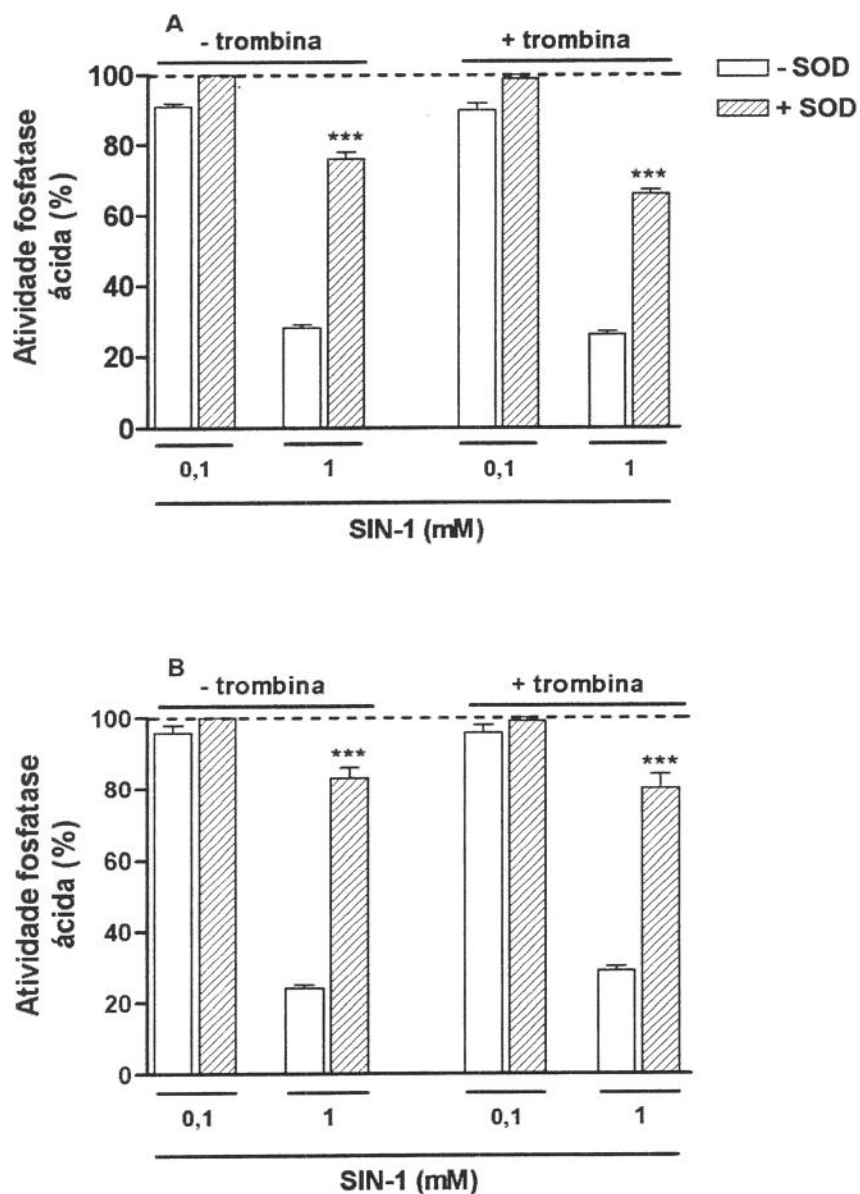


Figura 17 - Efeito da superóxido dismutase (SOD) na inibição da atividade da fosfatase ácida plaquetária pelo 3-morpholinosyndnomine (SIN-1) em 15 min (painel A) e 60 min (painel B). Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) não ativadas ou ativadas com trombina (50 mU/mL) foram incubadas com SIN-1 (0,1 e 1 mM) por 15 min ou 60 min na presença ou ausência de SOD (100 U/mL). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de três experimentos separados. ***p<0,01 comparado à adesão na ausência de SOD.

3.3.6 - Efeito do galato

A figura 18A mostra que o galato (5 μ M) não modificou a resposta inibitória do SIN-1 (0,1 e 1 mM) em nenhuma das condições apresentadas no tempo de 15 min, à exceção da concentração menor de SIN-1 (0,1 mM), onde efeito inibitório foi significativamente reduzido pelo galato em plaquetas ativadas com trombina.

Resultado semelhante foi encontrado no tempo de 60 min, onde o galato não reduziu a inibição da adesão plaquetária pelo SIN-1 em nenhuma condição usada, exceto na concentração SIN-1 (0,1 mM), onde o galato promoveu diminuição significativa da inibição da adesão das plaquetas ativadas com trombina (figura 18B).

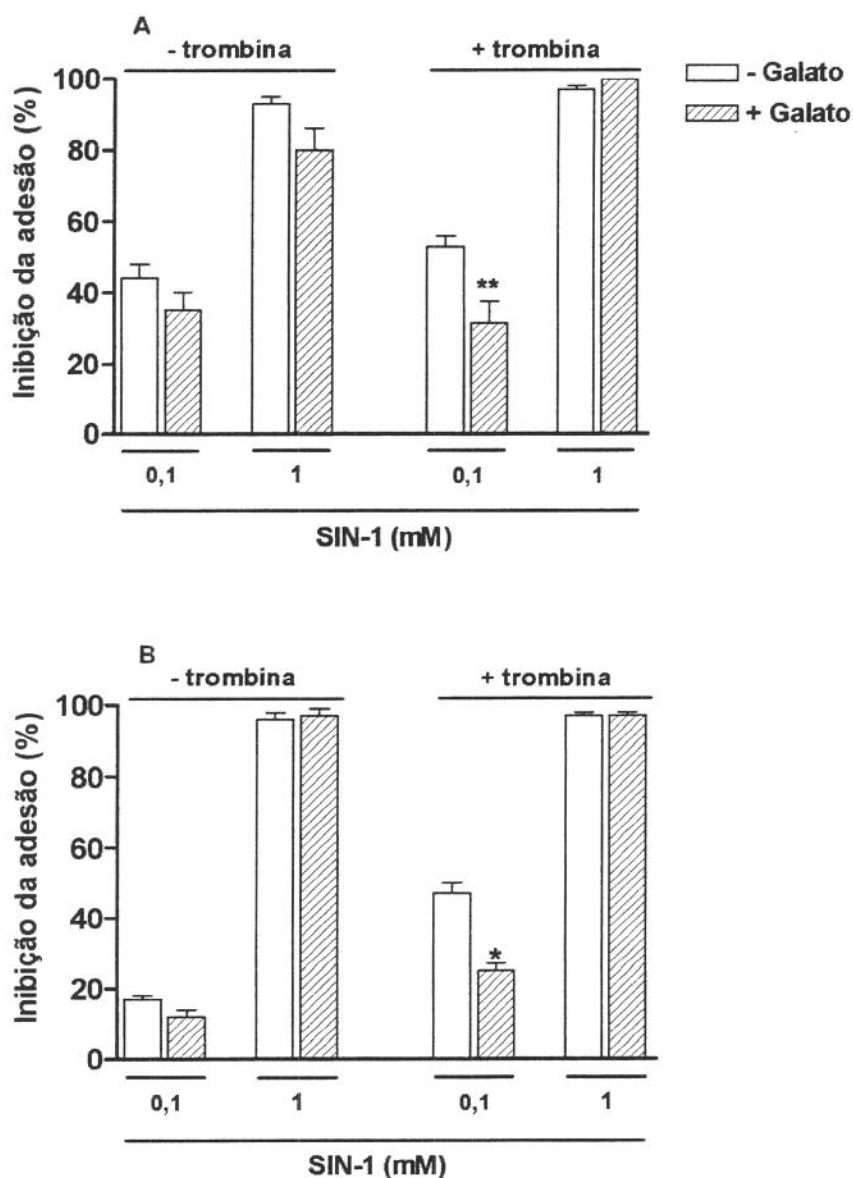


Figura 18 - Efeito do galato na inibição da adesão plaquetária pelo 3-morpholinosyndnomine (SIN-1) em 15 min (painel A) e 60 min (painel B). Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) não ativadas ou ativadas com trombina (50 mU/mL) foram incubadas com SIN-1 (0,1 e 1 mM) por 15 min ou 60 min na presença ou na ausência de galato (5 μ M). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de três experimentos separados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado à adesão na ausência de galato.

3.3.7 - Nitração de proteínas pelo SIN-1

A figura 19 mostra que quando plaquetas não ativadas foram incubadas com SIN-1 (0,1 e 1 mM), por 15 min, houve o aparecimento de nitração de proteína nos resíduos de tirosina com massa molecular aparente de 105 kDa, identificada como alfa-actinina-1. A intensidade da banda foi maior com 1 mM de SIN-1.

A ativação das plaquetas com trombina levou ao aparecimento de uma banda nitrada semelhante à produzida pelo SIN-1 (0,1 e 1 mM) nas plaquetas não ativadas. A exposição dessas plaquetas ao SIN-1 (0,1 mM) determinou o aparecimento de uma banda semelhante à produzida nas plaquetas estimuladas, com um pequeno aumento na intensidade da banda imunorreativa. O tratamento com SIN-1 (1 mM), por 15 min, aumentou a imunorreatividade da banda em 55% (figura 19).

Por outro lado, amostras de plaquetas tratadas com SIN-1 (0,1 e 1 mM), por 60 min, não mostraram nitração de proteína nos resíduos de tirosina em nenhuma condição experimental.

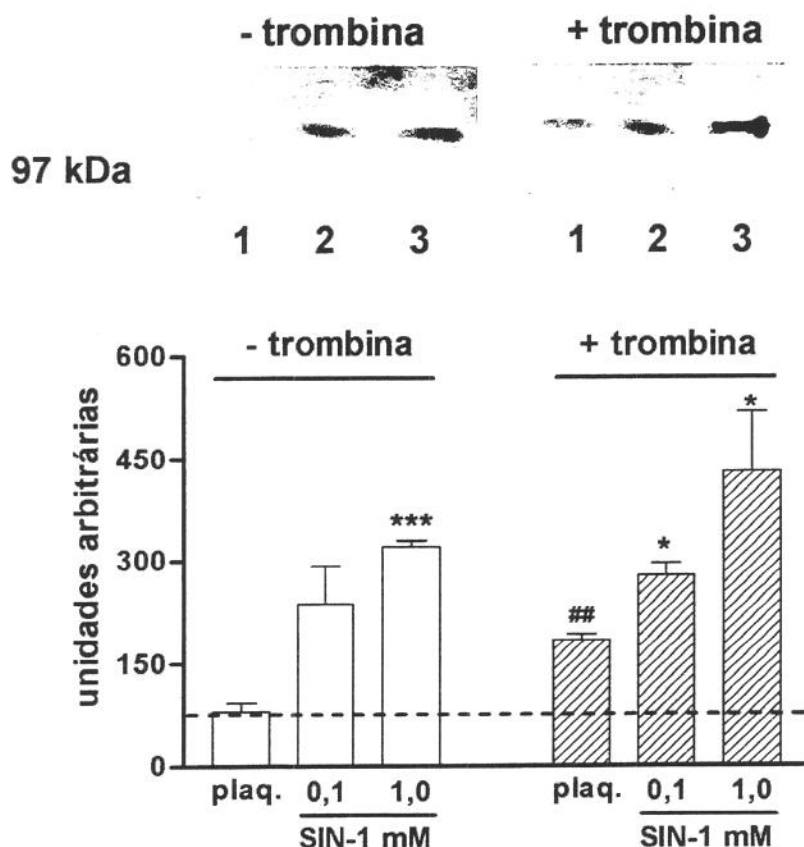


Figura 19 - Detecção de proteínas nitradas em plaquetas humanas. As plaquetas (6×10^6 plaqueta/mL) foram incubadas com 3-morpholinosyndnomine (SIN-1) (0,1 e 1 mM), na ausência ou na presença de trombina (50 mU/mL). Depois de 15 min de incubação, a suspensão de plaquetas foi centrifugada (10,000 g, 10 min) e o *pellet* foi ressuspenso em 40 μ L de tampão de dissociação. As amostras (40 μ L/poço) foram colocadas em SDS-PAGE 7.0% e analisadas por *Western blot* usando anticorpo monoclonal anti-nitrotiosina. As linhas 1, 2 e 3 representam as plaquetas não tratadas, e plaquetas incubadas com SIN-1 nas concentrações de 0,1 e 1 mM, respectivamente. A posição do marcador molecular (em kDa) está indicada à esquerda. O gráfico mostra a análise densitométrica de bandas de proteínas nitradas nas plaquetas de três voluntários diferentes. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle. ## $p < 0,01$ comparado a plaquetas não ativadas.



4 - DISCUSSÃO

Diversos estudos têm sido publicados acerca da capacidade de doadores de NO de modularem a agregação plaquetária. Entretanto, existem poucas publicações sobre o papel modulador do NO na adesão plaquetária. A adesão plaquetária é considerada o passo mais importante para o processo hemostático. Defeitos genéticos (ou adquiridos) da adesão plaquetária podem comprometer seriamente o processo hemostático, levando a aumento no risco de desordens vasculares. Desta forma, o estudo da adesão plaquetária é de grande importância no diagnóstico diferencial de síndromes trombóticas.

Neste trabalho, nos preocupamos em aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos que medeiam o efeito inibitório do NO no processo de adesão plaquetária, utilizando-se, para tanto, doadores de NO (SNP e SIN-1) em experimentos *in vitro* de adesão. Este modelo de medida de adesão de plaquetas humanas em microplacas recobertas com fibrinogênio é baseado na determinação da atividade da fosfatase ácida, enzima presente nas plaquetas (BELLAVITE, 1994). Utilizamos o fibrinogênio como proteína de revestimento das microplacas para mimetizar o processo de adesão à matriz vascular, uma vez que, sabidamente, o fibrinogênio, *in vivo*, está imobilizado na superfície da plaqueta ativada e depositado na parede vascular no local do dano (SIXMA e WESTER, 1977; JEN e HU, 1987; BELISARIO, 2000).

A glicoproteína GPIIb/IIIa é o receptor que medeia a adesão plaquetária seletiva e irreversível ao fibrinogênio imobilizado, sendo que esta ligação não requer ativação da plaqueta. Normalmente, o complexo GPIIb/IIIa está no estado de baixa afinidade, incapaz de se ligar a ligantes solúveis, mas pode se ligar ao fibrinogênio e ao fator de von Willebrand imobilizados (SAVAGE et al., 1992). De fato, trabalho prévio mostrou que, em plaquetas ativadas e não ativadas, a glicoproteína GPIIb/IIIa apresenta afinidades específicas para diferentes porções do fibrinogênio, mas em ambos os estados de ativação, a interação do fibrinogênio com seu receptor leva à adesão plaquetária irreversível (SAVAGE e RUGGERI, 1991).

Primeiramente, no sentido de validar o método de adesão aqui empregado, trabalhamos com plaquetas inativas, ou seja, lavadas 24 h antes do início do protocolo experimental. Como esperado, verificamos que nesta condição não há adesão das plaquetas às placas revestidas com fibrinogênio, nem na ausência e nem na presença de trombina.

Em seguida, investigamos a capacidade de adesão das plaquetas frescas em placas recobertas com fibrinogênio. Nossos dados mostraram que as plaquetas (não ativadas ou ativadas com trombina) foram capazes de aderir ao fibrinogênio, sendo que nas plaquetas não estimuladas, este aumento se mostrou dependente do tempo. As plaquetas ativadas com trombina apresentaram uma adesão significativamente maior do que as não ativadas, sendo este aumento de mesma magnitude, independentemente do tempo de incubação.

Doadores de NO como o SNP e o SIN-1 têm sido largamente empregados em algumas desordens clínicas, como hipertensão arterial (ROBIN, 1992; FRIEDERICH, 1995; NAPOLI e IGNARRO, 2003) e insuficiência cardíaca congestiva (HINES e BARASH, 1989), além de serem ferramentas importantes para se investigar processos fisiológicos mediados pelo NO. Estudos anteriores *in vivo* mostraram que estes doadores de NO inibem a adesão plaquetária em modelos animais (GROVES et al., 1993; CHINTALA et al., 1994; PROVOST et al., 1997). Da mesma maneira, estudos *in vitro* demonstraram que a redução da adesão pelo SNP é acompanhada por aumento nos níveis de GMPc (POLANOWSKA-GRABOWSKA e GEAR, 1994), sendo potencializada pelo inibidor de fosfodiesterase, dipiridamol (WU et al., 1997). Entretanto, os mecanismos que medeiam este efeito ainda não estão bem esclarecidos.

Utilizando o SNP como doador de NO, mostramos que a incubação das plaquetas com este agente promove inibição significativa da adesão ao fibrinogênio. O SNP inibiu a adesão plaquetária de maneira dependente da concentração, mas independente do estado de ativação das plaquetas (repouso ou ativadas com trombina) e do tempo de incubação (15 ou 60 min). Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que sugerem que o SNP

libera NO continuamente, durante períodos prolongados de tempo (até 90 min), sem necessidade de ativação enzimática (NOACK e FEELISCH, 1991; ANFOSSI et al., 2001).

Demonstramos também que o SNP inibe a adesão plaquetária ao fibrinogênio por mecanismos dependentes e independentes de GMPc, sendo os mecanismos independentes de GMPc vigentes em condições de tempo curto de incubação (15 min), como discutido em seguida. em GMPc

O NO se liga ao sítio heme da GCs, ativando a enzima e catalisando a conversão do GTP em GMPc (FEELISCH, 1998; LUCAS et al., 2000). O ODQ inibe a atividade GCs estimulada pelo NO, resultando em diminuição dos níveis de GMPc (GARTHWAITE et al., 1995). A inibição da GCs se faz devido a mudanças no estado de oxidação do grupo heme ferroso para a forma férrica, levando à inativação da enzima (ZHAO et al., 2000). O ODQ tem sido extensamente utilizado para se estudar a função da via NO-GMPc. Portanto, usamos o ODQ para explorar os mecanismos dependentes de GMPc que medeiam o efeito inibitório dos doadores de NO na adesão de plaquetas às placas recobertas com fibrinogênio. Na concentração usada em nosso estudo, o ODQ reduziu significativamente o aumento nos níveis de GMPc induzido pelo SNP, independentemente da concentração usada deste composto (0,1 e 1 mM) e do estado funcional da plaqueta (não ativada ou ativada com trombina). Além disso, o ODQ reverteu marcadamente a inibição da adesão plaquetária causada pelo SNP na maioria das condições experimentais empregadas, reforçando que os achados que o GMPc tem papel importante como inibidor da função plaquetária. Entretanto, quando o SNP foi usado na concentração de 1 mM, o ODQ não modificou a inibição da adesão plaquetária em 15 min em plaquetas não ativadas e ativadas. Portanto, nossos achados indicam que o efeito inibitório do SNP (em concentrações elevadas, 15 min) é mediado por mecanismos independentes de GMPc. Em outros tipos celulares, como leucócitos polimorfonucleares, sugere-se também que a resposta funcional aos doadores de NO é mediada por mecanismos dependentes e independentes de GMPc (WANIKIAT et al., 1997;

SETHI et al., 1999). Recentemente, mostrou-se que a incubação das plaquetas com SIN-1 leva à inibição da agregação plaquetária por mecanismo independente de GMPc, sugerindo que estes efeitos antiplaquetários estão relacionados com geração de NO no compartimento extracelular (CRANE et al., 2005).

Em nossos estudos, nos preocupamos particularmente em elucidar os mecanismos independentes de GMPc vigentes nas plaquetas tratadas com os doadores de NO, averiguando primeiramente um possível papel para o O_2^- como responsável por este mecanismo. Para tanto, utilizamos a SOD, enzima contida em células aeróbias, que catalisa a reação $O_2^- + O_2^- + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$, funcionando como um seqüestrador do O_2^- (MARCUS et al., 1977; AMBROSIO et al., 1994; PIGNATELLI et al., 1998).

Trabalhos anteriores mostraram que o O_2^- induz ativação plaquetária (HANDIN et al., 1977; SALVEMINI et al., 1989). O O_2^- também inibe a atividade da guanilato ciclase solúvel isolada de plaquetas humanas (BRUNE et al., 1990). Adicionalmente, KROTZ et al (2002) verificaram que o O_2^- aumenta a liberação de ADP de plaquetas ativadas com colágeno, resultando em aumento do recrutamento de plaquetas. Concordando com estes estudos, nossos resultados mostraram que, na ausência de doadores de NO, a SOD preveniu significativamente a adesão das plaquetas (não ativadas ou ativadas com trombina) ao fibrinogênio, confirmando um importante papel para o O_2^- como ativador plaquetário. Contrariamente, na presença de SNP, a SOD atenuou marcadamente o efeito inibitório destes doadores em 15 min. Estes resultados sugerem que as plaquetas tratadas com altas concentrações de SNP (15 min), independentemente da concentração e do tempo de incubação, geram O_2^- , que, por sua vez, passa a prevenir a adesão plaquetária ao fibrinogênio.

Como já citamos anteriormente, na presença da SOD, o O_2^- é convertido a H_2O_2 , cujo papel na função plaquetária é bastante controverso (AMBROSIO et al., 1994; PIGNATELLI et al., 1998). Um estudo prévio mostrou que o H_2O_2 por si (0,01-1 mM) não modifica a adesão de plaquetas ao fibrinogênio

imobilizado, após 30 ou 60 min de incubação (BELISARIO et al., 2000). Assumindo este resultado para o nosso estudo, podemos sugerir que o H_2O_2 não medeia a inibição da adesão independente de GMPc. Por outro lado, é sabido que o H_2O_2 pode interagir com o O_2^- , formando o radical hidroxila ($OH^\bullet$), que é altamente reativo com uma variedade de componentes celulares, podendo ser tóxico para a célula. Para verificar a presença de efeito citotóxico dos doadores de NO, utilizamos o método do MTT. Para o SNP, não se revelou nenhum efeito tóxico, independentemente da concentração, do tempo de incubação e do estado de ativação das plaquetas. Desta forma, excluimos a possibilidade que a inibição da adesão por este doador reflète morte celular.

O O_2^- é relativamente não reativo em comparação a muitos outros radicais, mas o sistema biológico pode convertê-lo em outras espécies mais reativas, como o $ONOO^-$, derivado de uma reação extremamente rápida com o NO (WINTERBOURN e KETTLE, 2003).

O $ONOO^-$ é um agente oxidante forte capaz de modificar a maioria das moléculas e compostos, incluindo aminoácidos como a tirosina, triptofano, cisteína e metionina (RADI et al., 1991, ALVARES et al., 1996,1999). O $ONOO^-$ é considerado danoso em uma série de condições patológicas, sendo sua ação citotóxica relacionada a certas reações como peroxidação lipídica, oxidação de radical sulfidríla e dano no DNA (BECKMAN e KOPPENOL, 1996). O $ONOO^-$ também é um potente agente nitrante, sendo a nitração um processo que afeta a função de proteínas (GOW et al., 2004). Existem poucos trabalhos mostrando a existência de proteínas nitradas em plaquetas (JIANG e BALAZY, 1998; NASEEM et al., 2000). Nestes estudos, resíduos de 3-nitrotirosina foram detectados em plaquetas não estimuladas, através de cromatografia gasosa/espectrofotometria de massa (JIANG e BALAZY, 1998). Adicionalmente, NASEEM et al. (2000) demonstraram que as formas “fosfo” (peso molecular 50 kDa) e “de-fosfo” (peso molecular 46 kDa) da VASP (*vasodilatador-stimulated phosphoprotein*) apresentam discreta nitração em plaquetas não estimuladas, que foi significativamente potencializada após a ativação das mesmas com colágeno.

Em nosso trabalho, não detectamos proteína nitrada nas plaquetas não ativadas, mas a ativação das mesmas com trombina levou ao aparecimento de proteína nitrada. Isto pode ser explicado pelo aumento do cálcio intracelular e conseqüente síntese de NO, e também pelo aumento da produção do O_2^- através de oxidação mitocondrial ou NADPH oxidase, que ocorre após a ativação plaquetária (RADOMSKI et al., 1990; LEONCINI et al., 1991; WACHOWICZ et al., 2002). Além disso, significativa nitração de proteínas, com peso molecular aparente em torno de 105 kDa, foi revelada nas plaquetas não estimuladas, depois de serem incubadas com alta concentração de SNP (1 mM) em 15 min. Quando as plaquetas foram ativadas com trombina, o SNP (1 mM) promoveu o aparecimento de uma banda semelhante, porém de maior intensidade.

Realizamos então experimentos de adesão, utilizando o *epigallocatechin gallate* (ECG), para verificar a hipótese de que estaria sendo formado $ONOO^-$ durante a incubação das plaquetas com os doadores de NO. O ECG é um composto polifenólico antioxidante e potente seqüestrador de $ONOO^-$, sendo capaz de prevenir a nitração dos resíduos de tirosina (FIALA et al., 1996). Estudos recentes em ratos mostraram que o ECG tem ação protetora contra danos neuronais produzidos pelo aumento do NO em isquemia cerebral, devido à sua propriedade anti-oxidante (NAGAI et al., 2002). YOKOZAWA et al. (2003) mostraram que o ECG atenua o dano renal induzido pelo $ONOO^-$, observado em experimentos com células e em modelo animal *in vivo*, sugerindo que este composto age como um inibidor de $ONOO^-$. Estes mesmos autores (2004) demonstraram também que o ECG é um seqüestrador direto de $ONOO^-$, mas não seqüestra seus precursores NO e O_2^- .

Nossos resultados mostraram que, em 15 min de incubação, o ECG reverteu significativamente o efeito inibitório da adesão plaquetária promovido pelo SNP (1 mM). Isto sugere que a formação de $ONOO^-$ e subsequente nitração de tirosina tem um papel importante reduzindo a ativação plaquetária.

Além do SNP, utilizamos o SIN-1 como doador de NO. Nossos resultados mostraram que, em 15 min de incubação, o SIN-1 apresentou uma curva concentração-resposta semelhante a do SNP, com exceção da

concentração maior (1 mM), onde houve inibição total da adesão plaquetária. Em 60 min, o SIN-1 promoveu uma inibição de mesma magnitude em todas as concentrações usadas, independentemente do estado de ativação plaquetária com exceção da concentração maior (1 mM), onde houve inibição total da adesão plaquetária. Além disso nossos experimentos mostraram que o ODQ reduziu significativamente o aumento nos níveis de GMPc induzido pelo SIN-1, independentemente da concentração usada destes compostos (0,1 e 1 mM) e do estado da funcional da plaqueta (não ativada ou ativada com trombina). O ODQ também reverteu a inibição da adesão de plaquetas não ativadas pelo SIN-1, na menor concentração, independentemente do tempo de incubação. Entretanto, o ODQ não reverteu a inibição da adesão pelo SIN-1 nas outras condições experimentadas.

Observamos também que a SOD atenuou marcadamente o efeito inibitório do SIN-1 (1 mM) em 15 min, assim como reverteu o efeito do SIN-1 em 60 min, independentemente do estado da plaqueta. Estes resultados sugerem que, de modo semelhante ao SNP em concentração elevada (15 min), o SIN-1, independentemente da concentração e do tempo de incubação, gera O_2^- , que, por sua vez, previne a adesão plaquetária ao fibrinogênio. Este resultado não foi observado quando as plaquetas não ativadas foram tratadas com SIN-1 na menor concentração (15 min).

Utilizamos, em seguida, o método do MTT para averiguar a hipótese de efeito citotóxico do SIN-1 sobre as plaquetas, e verificamos que, na concentração menor (0,1 mM), não se detectou efeito tóxico. Entretanto, na concentração maior de SIN-1 (1mM), houve ação citotóxica. Paralelamente, o SIN-1 (1 mM) promoveu redução significativa na atividade da fosfatase ácida das plaquetas (não ativada ou ativadas com trombina), independentemente do tempo de incubação.

Para tentarmos elucidar o efeito tóxico da concentração elevada do SIN-1 sobre as plaquetas, repetimos os ensaios de viabilidade pelo MTT e da atividade da fosfatase ácida, na presença da SOD. Os resultados mostraram que

a SOD reverteu, quase totalmente, a diminuição da viabilidade e da atividade da fosfatase ácida. Embora o efeito protetor da SOD contra danos celulares induzidos pela geração de NO e O_2^- esteja bem documentado (LIPTON et al., 1993; BONFOCO et al., 1995), existem trabalhos mostrando que a SOD pode potencializar a toxicidade do SIN-1 (GERGEL et al., 1995; VOLK et al., 1995; MORO et al., 1998). MORO et al. (1998) sugeriram que o efeito da SOD depende da identidade do agente responsável; ou seja, se o $ONOO^-$ e/ou O_2^- são a causa da toxicidade, a SOD pode revertê-la; se o NO ou H_2O_2 são os agentes tóxicos, a SOD pode potencializá-la.

Já está bem definido que o SIN-1 libera O_2^- juntamente com o NO (FEELISCH et al., 1989; FEELISCH, 1991; SINGH et al., 1999). Estudos prévios revelaram que a decomposição não enzimática de 0,1 mM de SIN-1 produz 1,24 $\mu M/min$ e 1,12 $\mu M/min$ de NO e O_2^- , respectivamente (KELM et al., 1997). Entretanto, outros pesquisadores demonstraram que o SIN-1 pode levar a um balanço desigual entre o NO e O_2^- . Por exemplo, na concentração de 1 mM, o SIN-1 produziu 3,68 $\mu M/min$ e 7,02 $\mu M/min$ de NO e O_2^- , respectivamente (FEELISCH et al., 1989, HOGG et al., 1992). Além disso, o uso de doadores de NO como geradores e seqüestradores do O_2^- , mostrou que a liberação de O_2^- ocorre apenas em altas concentrações de SIN-1, na faixa de 0,3 a 5 mM (ROBAK e GRYGLEWSKI, 1993). Portanto, é provável que a quantidade de O_2^- gerada pelo SIN-1 (1 mM) é maior do que a de NO, diferentemente da concentração menor de SIN-1 (0,1 mM), que produz NO e O_2^- na proporção de 1:1. Em nossos experimentos podemos sugerir então que, o SIN-1, na concentração de 1 mM, diminui a viabilidade e a atividade da fosfatase ácida devido ao acúmulo de O_2^- .

De maneira semelhante ao SNP, revelou-se a existência de nitração de proteínas, com peso molecular aparente em torno de 105 kDa, tanto nas plaquetas não ativadas quanto nas ativadas com trombina, depois de serem incubadas com SIN-1 (0,1 e 1 mM) em 15 min. Nas plaquetas ativadas e tratadas com SIN-1 (1 mM) houve uma maior intensidade da banda, quando comparada às plaquetas não estimuladas.

Realizamos os experimentos com ECG, e nossos resultados mostraram que, em 15 min de incubação, o ECG reverteu significativamente o efeito inibitório da adesão de plaquetas ativadas com trombina promovido pelo SIN-1 (0,1 mM), resultado este semelhante àquele obtido com o SNP (1 mM). Isto confirma que a formação de ONOO⁻ e subsequente nitração de tirosina tem um papel importante na redução da ativação plaquetária.

Em conclusão, nossos resultados mostraram que o SIN-1, em baixa concentração, inibe a adesão plaquetária por mecanismo independente de GMPc, envolvendo geração de O₂⁻ e nitração de proteína.

Em uma outra etapa deste trabalho, resolvemos purificar e identificar a proteína nitrada nas plaquetas, com o propósito de complementar os resultados obtidos com os doadores de NO.

Nossos ensaios analíticos revelaram que a proteína nitrada é a α -actinina 1. Esta proteína é uma isoforma da família de proteínas do citoesqueleto, que se liga à actina, e membro do citoesqueleto plaquetário. É um homodímero que contém em suas porções terminais amino e carboxila, domínios ligantes de actina e dois ligantes de cálcio, respectivamente (MATSUDAIRA, 1991; IMAMURA et al., 1994; TANAKA e ITOH, 1998; TANG et al., 2001). A alfa-actinina está associada a uma trama de actina que se reorganiza nas plaquetas durante sua ativação (TANAKA e ITOH, 1998). Adicionalmente, a alfa-actinina forma uma ponte entre a actina e o domínio citoplasmático da integrina (proteína que age como receptor para a matriz extracelular) no contato focal (OTEY et al., 1990).

Em nossos estudos, em 60 minutos, nenhuma banda nitrada foi detectada nas plaquetas, em nenhuma das condições experimentais usadas. Portanto, nossos dados mostraram que a nitração das plaquetas pelos SNP e SIN-1 é detectada apenas em condições onde a inibição da adesão plaquetária é revertida pela SOD ou ECG, e não afetada pelo ODQ.

O mecanismo determinante da ausência de nitração em 60 min de incubação não é claro, mas estudo prévio relatou que a nitração de proteínas em plaquetas não estimuladas pode diminuir com o tempo (SABETKAR et al., 2002). Outros estudos mostraram que processo de desnitração pode ocorrer em vários tecidos, por reações enzimáticas ou químicas (KAMISAKI et al., 1998; KUO et al., 1999; IRIE et al., 2003; KOECK et al., 2004). KAMISAKI et al. (1998) demonstraram, através de *Western blotting* de extratos de vários tecidos de ratos, um decréscimo da nitração de albumina de soro bovino, dependente do tempo. Recentemente, IRIE et al. (2003) sugeriram que enzimas denominadas desnitrases reduzem a nitração da proteína histona. Estudo recente demonstrou também um declínio dos resíduos de nitrotirosina em mitocôndrias, em 20 min de ausência de O₂ (KOECK et al., 2004).

Em conclusão, nossos resultados demonstraram que o SNP, em alta concentração e curto período de incubação, assim como o SIN-1, em baixa concentração, inibem a adesão plaquetária por mecanismo independente de GMPc, envolvendo geração de O₂⁻ e nitração da α -actinina. A nitração é descrita como uma modificação pós-translacional de uma proteína, um processo seletivo, onde nem todas as proteínas são marcadas para a nitração e nem todos os resíduos de tirosina são nitrados. A nitração dos resíduos de tirosina pode afetar a estrutura e a função das proteínas e, geralmente, a inibição da função é sua consequência mais comum (ISCHIROPOULOS, 1998; SOUZA et al., 1999; GREENACRE e ISCHIROPOULOS, 2001). Alguns autores discutiram a relevância e função regulatória de nitração de tirosina em processos fisiológicos e patológicos, e evidências indicam que a nitração previne a fosforilação de resíduos específicos de tirosina (GOW et al., 1996; KONG et al., 1996; NEWMAN et al., 2002; MONTEIRO, 2002; SABETKAR et al., 2002; CASONI et al., 2005).

A alfa-actinina está intimamente associada tanto com os receptores de adesão transmembrana quanto com as proteínas do citoesqueleto, e isto pode ser um marcador regulatório, uma vez que esta proteína é importante para a ativação plaquetária. A alfa-actinina é fosforilada na posição 12 pela quinase de adesão

focal (FAK) e está estritamente ligada à plaqueta espalhada (IZAGUIRRE et al., 1999, 2001). Podemos especular que a nitração desta proteína pode interferir com sua fosforilação e conseqüentemente contribuir para o papel inibitório do NO na adesão plaquetária.

5 - CONCLUSÕES



- Em concentrações baixas (0,1 mM, 15 min), o SNP inibe a adesão plaquetária por mecanismo dependente de GMPc, mas não relacionado ao estado da ativação plaquetária;
- Em concentrações elevadas (1,0 mM, 15 min), o SNP inibe a adesão plaquetária por mecanismo independente de GMPc e do estado de ativação plaquetário. Nessa condição, identificamos a α -actinina-1 como proteína nitrada pelo SNP;
- Em 60 min, o SNP inibe a adesão plaquetária por mecanismo dependente de GMPc, mas não relacionado à concentração e ao estado de ativação das plaquetas;
- Em concentrações baixas (15 min) o SIN-1 inibe a adesão de plaquetas não ativadas por mecanismo parcialmente dependente de GMPc, ao passo que em plaquetas ativadas, a inibição se dá por mecanismo independente de GMPc;
- Em 60 min, concentrações baixas de SIN-1 inibem a adesão de plaquetas ativadas por mecanismo independente de GMPc, envolvendo provavelmente formação de ânion superóxido;
- Em concentrações elevadas, o SIN-1 diminui a viabilidade e a atividade da fosfatase ácida devido à formação de ânion superóxido.



6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, B.; RUBBO, H.; KIRK, M.; BARNES, S.; FREEMAN, B.A.; RADF, R.; Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. **Chem. Res. Toxicol.**, **9**: 390-6, 1996.

ALVAREZ, B.; FERRER-SUETA, G.; FREEMAN, B.A.; RADF, R. Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. **J. Biol. Chem.**, **8**: 842-8, 1999.

AMBROSIO, G.; G OLINO, P.; PASCUCCI, I.; ROSOLOWSKY, M.; CAMPBELL, W.B.; DECLERCK, F.; TRITTO, I. & CHIARIELLO, M. Modulation of platelet function by reactive oxygen metabolites. **Am. J. Physiol.**, **267**: 308-318, 1994.

ANFOSSI, G.; RUSSO, I.; MASSUCCO, P.; MATTIELLO, L.; BALBO, A.; CAVALOT, F. & TROVATI, M. Studiens on inhibition of human platelet function by sodiun nitroprusside. Kinetic evaluation of the effect on aggregation and cyclic nucleotide content. **Thromb. Res.**, **102**: 319-330, 2001.

ARNOLD, W.P.; MITTAL, C.K.; KATSUKI, S. & MURAD, F. Nitric oxide activates guanylate cylase and increases guanosine 3',5'-cyclic monophosphste levels in various tissue preparations. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **74**: 3203-3207, 1077.

BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.A. & FREEMAN, B.A. apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **87**: 1620-16-24, 1990.

BECKMAN, J.S.; ISCHIROPOULOS, H.; ZHU, L.; van der WOERD, M.; SMITH, C.D.; HARRISON, J.; MARTIN, J.C. & TSAÍ J-H.M. Kintcs of superoxide dismutase and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. **Arch. Biochem. Biophys.**, **298**: 438-445, 1992.

BECKMAN, J.S.; CHEN, J.; ISCHIROPOULOS, H.; CROW, J.P. Oxidative chemistry of peroxynitrite. **Methods Enzymol.**, **233**: 229-40, 1994.

BECKMAN, J.S. & KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am. J. Physiol.**, **271**: C1424-37, 1996.

BELISARIO, M.A.; Di DOMENICO, C.; PELAGALLI, A.; DELLA MORTE, R. & STAIANO, N. Metal-ion catalyzed oxidation affects fibrinogen activity on platelet aggregation and adhesion. **Biochimie**, **79**: 449-55, 1997.

BELISARIO, M.A.; TAFURI, S.; DOMENICO, C.; SQUILLACIOTI, C.; MORTE, R.D.; LUCISANO, A. & STAIANO, N. H₂O₂ activity on platelet adhesion to fibrinogen and protein tyrosine phosphorylation. **Biochim. Biophys. Acta**, **1495**: 183-193, 2000.

BELL, R.L. & MAJERUS, P.W. Thrombin-induced hydrolysis of phosphatidylinositol in human platelets. **J. Biol. Chem.**, **255**: 1790-2, 1980.

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.**, **216**: 444-450, 1994.

BENTFELD, M.E. & BAINTON, D.F. Cytochemical localization of lysosomal enzymes in rat megakaryocytes and platelets. **J. Clin. Invest.**, **56**: 1635-49, 1975.

BERKELS, R.; STOCKKLAUSER, K.; ROSEN, P. & ROSEN, R. Current status of platelet NO synthases. **Thromb. Res.**, **87**: 51-5, 1997.

BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J & COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature Lond.**, **368**: 850-853, 1994.

BONFOCO, E.; KRAINIC, D.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P. & LIPTON, S.A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **92**: 7162-6, 1995.

BOULOS, C.; JIANG, H. & BALAZY M. Diffusion of peroxynitrite into the human platelet inhibits cyclooxygenase via nitration of tyrosine residues. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **293**: 222-9, 2000.

BRASS, L.F. & JOSEPH, S.K. A role for inositol triphosphate in intracellular Ca^{2+} mobilization and granule secretion in platelets. **J. Biol. Chem.**, **260**: 15172-9, 1985.

BRASS, L.F. & MOLINO, M. Protocase-activated G protein coupled receptors on human platelets and endothelial cells. **Tromb. Haemost.**, **78**: 234-241, 1987.

BROWN, A.S.; MORO, M.A.; MASSE, J.M.; CRAMER, E.M.; RADOMSKI, M. & DARLEY-USMAR, V. Nitric oxide-dependent and independent effects on human platelets treated with peroxynitrite. **Cardiovasc. Res.**, **40**: 380-8, 1998.

BRUCKDORFER, K.R. The nitration of proteins in platelets. **C. R. Acad. Sci.**, **324**: 611-5, 2001.

BRUNE, B.; SCHMIDT, K.U. & ULLRICH, V. Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. **Eur. J. Biochem.**, **192**: 683-688, 1990.

CALVETE, J.J. On the structure and function of platelet integrin α IIb β 3, the fibrinogen receptor. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **208**: 346-60, 1995.

CALVETE, J.J. Platelet integrin GPIIb/IIIa: structure-function correlations. An update and lessons from other integrins. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **222**: 29-38, 1999.

CASONI, F.; BASSO, M.; MASSIGNAN, T.; GIANAZZA, E.; CHERONI, C.; SALMONA, M.; BENDOTTI, C. & BONETTO, V. Protein nitration in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis: possible multifunctional role in the pathogenesis. **J. Biol. Chem.**, **280**: 16295-304, 2005.

CHARO, I.F.; RICHARD D. FEINMAN R.D. & DETWILER, T.C. Interrelations of Platelet Aggregation and Secretion. **J. Clin. Invest.**, **60**: 866-873, 1977.

CHEN, L.Y. & MEHTA, J.L. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **27**: 154-8, 1996.

CHIGNARD, M.; LE COUEDIC, J.P.; TENCE, M.; VARGAFTIG, B.B. & BENVENISTE, J. The role of platelet-activating factor in platelet aggregation. **Nature**, **279**: 799-800, 1979.

CHIGNARD, M.; VARGAFTIG, B.B.; BENVENISTE, J. & LE COUEDIC, J.P. Platelet aggregation and platelet activating factor. **J. Pharmacol.**, **11**: 371-7, 1980.

CHINTALA, M.S.; BERNARDINO, V. & CHIU, P.J. Cyclic GMP but not cyclic AMP prevents renal platelet accumulation after ischemia-reperfusion in anesthetized rats.. **Exp. J. Pharmacol. Ther.**, **271**: 1203-1208, 1994.

CLARK, E.A. & BRUGGE, J.S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. **Science**, **268**: 233-9, 1995.

CLEMENTS, M.K.; SIEMSEN, D.W.; SWAIN, S.D.; HANSON, A.J.; NELSON -OVERTON, L.K.; ROHN, T.T. & QUINN, M.T. Inhibition of actin polymerization by peroxynitrite modulates neutrophil functional responses. **J. Leukoc. Biol.**, **73**: 344-55, 2003.

COUGHLIN, S.R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. **Nature**, **407**: 258-64, 2000.

CRANE, M.S.; ROSSI, A.G.; MEGSON, I.L.A potential role for extracellular nitric oxide generation in cGMP-independent inhibition of human platelet aggregation: biochemical and pharmacological considerations. **Br. J. Pharmacol.**, **144**: 849-59, 2005.

CROW, J.P. & ISCHIROPOULOS, H. Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: in vivo marker of peroxynitrite. **Meth. Enzymol.**, **269**: 185-194, 1996.

DUDZINSKI, D.M.; IGARASHI, J.; GREIF, D.; MICHEL, T.M. The Regulation and Pharmacology of Endothelial Nitric Oxide Synthases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **7**: 2005.

EISERICH, J.P.; PATEL, R.P. & O'DONNELL, V.B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Mol. Aspects Med.**, **19**: 221-357, 1998.

FEELISCH, M. & NOACK, E. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. **Eur. J. Pharmacol.**, **139**: 19-30, 1987.

FEELISCH, M.; OSTROWSKI, J. & NOACK, E. On the mechanism of NO release from sydnonimines. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **14**: 13-22, 1989.

FEELISCH, M. & KELM, M. Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **180**: 286-93, 1991.

FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn. Schmied. Arch. Pharmacol.**, **358**: 113-122, 1998.

FIALA, E.S.; SODUM, R.S.; BHATTACHARYA, M. & LI, H. (-)-Epigallocatechin gallate, a polyphenolic tea antioxidant, inhibits peroxynitrite-mediated formation of 8-oxodeoxyguanosine and 3-nitrotyrosine. **Experientia**, **52**: 922-926, 1996.

FITZGERALD, D.J. Vascular biology of thrombosis: the role of platelet-vessel wall adhesion. **Neurology**, **57**: 1-4, 2001.

FRIEDERICH, J.A. & BUTTERWORTH, J.F. Sodium nitroprusside: twenty years and counting. **Anesth. Analg.**, **81**: 152-162, 1995.

FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V.. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, **27**: 373-6, 1980.

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C.L.; NIELSEN, E.B.; SCHMIDT, K. & MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one **Mol. Pharmacol.**, **48**: 184-188, 1995.

GERGEL, D.; MISIK, V.; ONDRIAS, K. & CEDERBAUM, A. Increased cytotoxicity of 3-morpholinosydnonimine to HepG2 cells in the presence of superoxide dismutase. Role of hydrogen peroxide and iron. **J. Biol. Chem.**, **270**: 20922-9, 1995.

GLUSA, E.; MARKWARDT, F. & STURZEBECKER J. Effects of sodium nitroprusside and other pentacyanonitrosyl complexes on platelet aggregation. **Haemostasis**, **3**: 249-56, 1974.

GORDGE, M.P.; HOTHERSALL, J.S. & NORONHA-DUTRA, A.A. Evidence for a cyclic GMP-independent mechanism in the anti-platelet action of S-nitrosoglutathione. **Br. J. Pharmacol.**, **124**: 141-148, 1998.

GOW, A.J.; DURAN, D.; MALCOLM, S. & ISCHIROPOULOS, H. Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. **F.E.B.S. Lett.**, **385**: 63-66, 1996.

GOW, A.J.; FARKOUH, C.R.; MUNSON, D.A.; POSENCEG, M.A. & ISCHIROPOULOS, H. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, **287**: L262-L268, 2004.

GRAND, R.; TURNELL, A.S. & GRABHAM, P.W. Cellular consequences of thrombin-receptor activation. **Biochem. J.**, **313**: 353-68, 1996.

GREENACRE, S.A.B. & ISCHIROPOULOS, H. Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. **Free Rad. Res.**, **34**: 541-581, 2001.

GROVES, P.H.; LEWIS, M.J.; CHEADLE, H.A. & PENNY, W.J. SIN-1 reduces platelet adhesion and platelet thrombus formation in a porcine model of balloon angioplasty. **Circulation**, **87**: 590-7, 1993.

GROVES, J.T. & WANG, C.C. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, **4**: 687-95, 2000.

GRZELAK, A.; BALCERCZYK, A.; MATEJA, A. & BARTOSZ, G. Hemoglobin can nitrate itself and other proteins. **Biochim. Biophys. Acta.**, **1528**: 97-100, 2001.

HALBRUGGE, M.; EIGENTHALER, M.; POLKE, C. & WALTER, U. Protein phosphorylation regulated by cyclic nucleotide-dependent protein kinases in cell extracts and in intact human lymphocytes. **Cell Signal.**, **4**: 189-99, 1992.

HAMBERG, M.; SVENSSON, J. & SAMUELSSON, B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **72**: 2994-8, 1975.

HANDIN, R.I.; KARABIN, R. & BOXER, G.J. Enhancement of platelet function by superoxide anion. **J. Clin. Invest.**, **59**: 959-65, 1977.

HARKER, L.A. Platelet survival time: its measurement and use. **Prog. Hemost. Thromb.**, **4**: 321-47, 1978.

HASHIMOTO, K.; IM, T.; TATSUMI, N.; OKUDA, K. & YUKIOKA, M. Modulation of actin polymerization by 47,000-dalton protein of human platelets. **Biochem. Int.**, **14**: 759-67, 1987.

HAUSER, W.; KNOBELOCH, K.P.; EIGENTHALER, M.; GAMBARYAN, S.; KRENN, V.; GEIGER, J.; GLAZOVA, M.; ROHDE, E.; HORAK, I.; WALTER, U. & ZIMMER, M. Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **96**: 8120-5, 1999.

HERRICK, S.; BLANC-BRUDE, O.; GRAY, A. & LAURENT, G. Fibrinogen. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, **31**: 741-6, 1999.

HELLMAN, U.; WERNSTEDT, C.; GONEZ, J.; HELDIN, C.H. Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. **Anal. Biochem.**, **224**: 451-5, 1995.

HINES, R. & BARASH, P. Infusion of sodium nitroprusside induces platelet dysfunction in vitro. **Anesthesiology**, **70**: 611-615, 1989.

HOGG, N.; DARLEY-USMAR, V.M.; WILSON, M.T. & MONCADA, S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. **Biochem. J.**, **281**: 419-24, 1992.

HOLMSEN, H. & WEISS, H.J. Secretable storage pools in platelets. **Annu. Rev. Med.**, **30**: 119-34, 1979.

HORSTRUP, K.; JABLONKA, B.; HONIG-LIEDL, P.; JUST, M.; KOCHSIEK, K. & WALTER, U. PHosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. **Eur. J. Biochem.**, **225**: 21-7, 1994.

HUIE, R.E. & PADMAJA, S. The reaction of NO with superoxide. **Free Radic. Res. Commun.**, **18**: 195:199, 1993.

IGNARRO, L.J. & KADOWITZ, P.J. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **25**:171-91,1985.

IGNARRO, L.J.; BYRNS, R.; BUGA, G.M.; WOOD, R.S. & CHADHRI, G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study the endothelium-dependent and nitric oxide elicited vascular smooth muscle relaxation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **244**: 181-1189, 1987.

IGNARRO, L.J Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide: regulation of enzyme activity by porphyrins and metalloporphyrins. **Semin. Hematol.**, **26**: 63-76, 1989.

IMAMURA, M.; SAKURAI, T.; OGAWA, Y.; ISHIKAWA, T.; GOTO, K. & MASAKI, T. Molecular cloning of low-Ca(2+)-sensitive-type non-muscle alpha-actinin. **Eur. J. Biochem.**, **223**: 395-401, 1994.

IRIE, Y.; SAEKI, M.; KAMISAKI, Y.; MARTÍN, E. & MURAD, F. Histone H1.2 is a substrate for denitrase, an activity that reduces nitrotyrosine immunoreactivity in proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **100**: 5634-5639, 2003.

ISCHIROPOULOS, H.; ZHU, L.; CHEN, J.; TSAI, M.; MARTIN, J.C.; SMITH, C.D. & BECKMAN, J.S. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. **Arch. Biochem. Biophys.**, **298**: 431-7, 1992.

ISCHIROPOULOS, H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. **Arch. Biochem. Biophys.**, **356**:1-11, 1998.

ISCHIROPOULOS, H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration.. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **305**: 776-83, 2003.

IZAGUIRRE, G.; AGUIRRE, L.; JI, P.; ANESKIEVICH, B. & HAIMOVICH, B. Tyrosine phosphorylation of alpha-actinin in activated platelets. **J. Biol. Chem.**, **274**: 37012-37020, 1999.

IZAGUIRRE, G.; AGUIRRE, L.; HU, Y-P.; LEE, H.Y.; SCHLAEPFER, D.D.; ANESKIEVICH, B.J. & HAIMOVICH, B. The cytoskeletal/non-muscle isoform of alpha-actinin is phosphorylated on its actin-binding domain by the focal adhesion kinase. **J. Biol. Chem.**, **276**: 28676-28685, 2001.

JEN, C.J. & HU, S.J. Direct platelet-fibrin interaction that does not require platelet activation. **Am. J. Physiol.**, **253**:H745-50, 1987.

JIANG, H. & BALAZY, M. Detection of 3-nitrotyrosine in human platelets exposed to peroxynitrite by a new gas chromatography/mass spectrometry assay. **Nitric Oxide**, **2**: 350-359, 1998.

KAHN, M.L.; ZHENG, Y.W.; HUANG, W.; BIGORNIA, V.; ZENG, D.; MOFF, S.; FARESE, R.V. JR.; TAM, C. & COUGHLIN, S.R. A dual thrombin receptor system for platelet activation. **Nature**, **394**: 690-4, 1998.

KAMISAKI, Y.; WADA, K.; BIAN, K.; BALABANLI, B.; DAVIS, K.; MARTIN, E.; BEHBOD, F.; LEE, Y.C. & MURAD, F. An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **95**: 11584-11589, 1998.

KAWABATA, A.; KURODA, R.; NISHIKAWA, H. & KAWAI, K. Modulation by protease-activated receptors of the rat duodenal motility in vitro: possible mechanisms underlying the evoked contraction and relaxation. **Br. J. Pharmacol.**, **128**: 865-72, 1999.

KELM, M.; DAHMANN, R.; WINK, D. & FEELISCH, M. The nitric oxide/superoxide assay. Insights into the biological chemistry of the NO/O₂⁻ interaction. **J. Biol. Chem.**, **272**: 9922-32, 1997.

KILINC, K.; KILINC, A.; WOLF, R.E. & GRISHAM, M.B. Myoglobin-catalyzed tyrosine nitration: no need for peroxynitrite. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **285**: 273-6, 2001.

KOECK, T.; FU, X.; HAZEN, S.L.; CRABB, J.W.; STUEHR, D.J. & AULAK, K.S. Rapid and selective oxygen-regulated protein tyrosine denitration and nitration in mitochondria. **J. Biol. Chem.**, **279**: 27257-27262, 2004.

KONG, S-K.; YIM, M.B.; STADTMAN, E.R. & CHOCK, P.B. Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH₂ peptide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **93**: 3377-3382, 1996.

KROTZ, 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**, **100**: 917-924, 2002.

KUO, W.N.; KANADIA, R.N.; SHANBBAG, V.P. & TORO, R. Denitration of peroxynitrite-treated proteins by "proteins nitrates" from rat brain and heart. **Mol. Cell. Biochem.**, **201**: 11-16, 1999.

LELCHUK, R.; RADOMSKI, M.W.; MARTIN, J.F. & MONCADA, S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases in human megakaryoblastic cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **262**: 1220-4, 1992.

LEONCINI, G.; MARESCA, M. & COLAO, C. Oxidative metabolism of human platelets. **Biochem. Int.**, **25**: 647-655, 1991.

LÉVI-TOLEDANO, S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a "hierarchy"? **Haemostasis**, **29**: 4-15, 1999.

LIPTON, S.A.; CHOI, Y.B.; PAN, Z.H.; LEI, S.Z.; CHEN, H.S.; SUCHER, N.J.; LOSCALZO, J.; SINGEL, D.J. TAMLER, J.S. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. **Nature**, **364**: 626-32, 1993.

LOW, S.Y.; SABETKAR, M.; BRUCKDORFER, R. & NASEEN, K.M. THE role of protein nitration in the inhibition of platelet activation by peroxynitrite. **FEBS Letters**, **511**: 59-64, 2002.

LUCAS, K.A.; PITARI, G.M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S.; CHEPENIK, K.P. & WALDMAN, S.A. Guanylyl ciclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol. Rev.**, **52**: 375-414, 2000.

LUFRANO, M. & BALAZY, M. Interaction of peroxynitrite and other nitrating substances with human platelets: the role of glutathione and peroxynitrite permeability. **Bioch. Pharmacol.**, **65**: 515-523, 2003.

MARCONDES, S.; TURKO, I.V. & MURAD, F. Nitration of succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase in rats after endotoxin administration. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **98**: 7146-7151, 2001.

MARCUS, A.J.; SILK, S.T.; SAFIER, L.B. & ULLMAN, H.L. Superoxide production and reducing activity in human platelets. **J. Clin. Invest.**, **59**: 149-158, 1977.

MASSBERG, S.; GRUNER, S.; KONRAD, I.; GARCIA ARGUINZONIS, M.I.; EIGENTHALER, M.; HEMLER, K.; KERSTING, J.; SCHULZ, C.; MULLER, I.; BESTA, F.; NIESWANDT, B.; HEINZMANN, U. & WALTER, U.; GAWAZ M. Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. **Blood**, **103**: 136-42, 2004.

MATSUDAIRA, P. Modular organization of actin crosslinking proteins. **Trends Biochem. Sci.**, **16**: 87-92, 1991.

MAXEY, K.M.; MADDIPATI, K.R. & BIRKMEIER, J. Interference in immunoassay. **J. Clin. Immunoassay**, **15**: 116-120, 1992.

MEGSON, I.L.; SOGO, N.; MAZZEI, F.A.; BUTLER, A.R.; WALTON, J.C. & WEBB, D.J. Inhibition of human platelet aggregation by a novel S-nitrosothiol is abolished by haemoglobin and red blood cells in vitro: implications for anti-thrombotic therapy. **Br. J. Pharmacol.**, **131**: 1391-1398, 2000.

MEHTA, J. & MEHTA, P. Platelet function studies in heart disease. VI. Enhanced platelet aggregate formation activity in congestive heart failure: inhibition by sodium nitroprusside. **Circulation**, **60**: 497-503, 1979.

MEHTA, J.L.; CHEN, L.Y.; KONE, B.C.; MEHTA, P. & TURNER, P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. **J. Lab. Clin. Med.**, **125**: 370-7, 1995.

MILLER, M.R.; HANSPAL, I.S.; HADOKÉ, P.W.; NEWBY, D.E.; ROSSI, A.G.; WEBB, D.J. & MEGSON, I.L. A novel S-nitrosothiol causes prolonged and selective inhibition of platelet adhesion at sites of vascular injury. **Cardiovasc. Res.**, **57**: 853-860, 2003.

MOLINO, M.; WOOLKALIS, M.J.; REAVEY-CANTWELL, J.; PRATICO, D.; ANDRADE-GORDON, P.; BARNATHAN, E.S. & BRASS, L.F. Endothelial cell thrombin receptors and PAR-2. Two protease-activated receptors located in a single cellular environment. **J. Biol. Chem.**, **272**: 11133-41, 1997.

MOLLACE, V.; SALVEMINI, D.; SESSA, W.C. & VANE, J.R. Inhibition of human platelet aggregation by endothelium-derived relaxing factor, sodium nitroprusside or iloprost is potentiated by captopril and reduced thiols. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **258**: 820-823, 1991.

MONCADA, S.; RADOMSKI, M.W. & PALMER, R.M.J. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochem. Pharmacol.**, **37**: 2495-2501, 1988b.

MONCADA, S.; PALMER, M.J. & HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, **43**: 109-142, 1991.

MONDORO, T.H.; SHAFER, B.B. & VOSTAL, J.G. Peroxynitrite-induced tyrosine nitration and phosphorylation in human platelets. **Free Rad. Med. Biol.**, **22**: 1055-1063, 1997.

MONTEIRO, H. Signal transduction by protein tyrosine nitration: competition or cooperation with tyrosine phosphorylation-dependent signaling events? **Free Radic. Biol. Med.**, **33**: 765-773, 2002.

MORO, M.A.; DARLEY-USMAR, V.M.; GOODWIN, D.A.; READ, N.G.; AMORA-PINO, R.; FEELISCH, M.; RADOMSKI, M.W. & MONCADA, S. Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **91**: 6702-6, 1994.

MORO, M.A.; RUSSEL, R.J.; CELLEK, S.; LIZASOAIN, I.; SU, Y.; DARLEY-USMAR, V.M.; RADOMSKI, M.W. & MONCADA, S. cGMP mediates the vascular and platelet action of nitric oxide: Confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **93**: 1480-1485, 1996.

MORO, M.A.; FERNANDEZ-TOME, P.; LEZA, J.C.; LORENZO, P. & LIZASOAIN, I. Neuronal death induced by SIN-1 in the presence of superoxide dismutase: protection by cyclic GMP. **Neuropharmacology**, **37**: 1071-9, 1998.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, **65**: 55-63, 1983.

NAGAI, K.; JIANG, M.H.; HADA, J.; NAGATA, T.; YAJIMA, Y.; YAMAMOTO, S. & NISHIZAKI, T. (-)-Epigallocatechin gallate protects against NO stress-induced neuronal damage after ischemia by acting as an anti-oxidant. **Brain Res.**, **956**: 319-22, 2002.

- NAPOLI, C. & IGNARRO, L.J. Nitric oxide-releasing drugs. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **43**: 97-123, 2003.
- NASEEM, K.M.; LOW, S.Y.; SABETKAR, M.; BRADLEY, N.J.; KHAN, J.; JACOBS, M. & BRUCKDORFER, K.R. The nitration of platelet cytosolic proteins during agonist-induced activation of platelets. **FEBS Lett.**, **473**: 119-122, 2000.
- NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.**, **6**: 3051-3064, 1992.
- NEWMAN, D.K.; HOFFMAN, S.; KOTAMRAJU, S.; ZHAO, T.; WAKIM, B.; KALYANARAMAN, B. & NEWMAN, P.J. Nitration of PECAM-1 ITIM tyrosines abrogates phosphorylation and SHP-2 binding. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **296**: 1171-1179, 2002.
- NIIYA, K.; HODSON, E.; BADER, R.; BYERS-WARD, V.; KOZIOL, J.A.; PLOW, E.F. & RUGGERI, Z.M. Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. **Blood**, **70**: 475-483, 1987.
- NOACK, E. & FEELISCH, M. Molecular mechanisms of nitrovasodilator bioactivation. Molecular mechanisms of nitrovasodilator bioactivation. **Basic Res. Cardiol.**, **2**: 37-50, 1991.
- NOLTE, C.; EIGENTALER, M.; HORSTRUP, K.; HONIG-LIEDL, P. & WALTER, U. Synergistic phosphorylation of the focal adhesion associated vasodilator-stimulated phosphoprotein in intact human platelet in response to cGMP-and cAMP elevating platelet inhibitors. **Biochem. Pharmacol.**, **48**: 1569-1575, 1994.
- NYSTEDT, S.; EMILSSON, K.; WAHLESTEDT, C. & SUNDELIN, J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **91**: 9208-9212, 1994.
- OBERGFELL, A.; ETO, K.; MOCSAI, A.; BUENSUCESO, C.; MOORES, S.L.; BRUGGE, J.S.; LOWELL, C.A. & SHATTIL SJ. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with [alpha]IIb[beta]3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. **J. Cell. Biol.**, **157**: 265-75, 2002.

ODA, A.; DRUKER, B.J.; SMITH, M. & SALZMAN, E.W. Inhibition by sodium nitroprusside or PGE1 of tyrosine phosphorylation induced in platelets by thrombin or ADP. **Am. J. Physiol.**, **262**: C701-C707, 1992.

OFOSU, F.A. The blood platelet as a model for regulating blood coagulation on cell surfaces and its consequences. **Biochemistry**, **67**: 47-55, 2002.

OGINO, K.; KODAMA, N.; NAKAJIMA, M.; YAMADA, A.; NAKAMURA, H.; NAGASE, H.; SADAMITSU, D. & MAEKAWA, T. Catalase catalyzes nitrotyrosine formation from sodium azide and hydrogen peroxide. **Free Radic. Res.**, **35**: 735-47, 2001.

OTEY, C.A.; PAVALKO, F.M. & BURRIDGE, K. An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. **J. Cell Biol.**, **111**: 721-9, 1990.

PALMER, R.M.J.; REES, D.D.; ASHTON, D.S. & MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium – dependent relaxation. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, **135**: 1251-1256, 1988.

PEERSCHKE, E.I. Related Articles, Links Bound fibrinogen distribution on stimulated platelets. Examination by confocal scanning laser microscopy. **Am. J. Pathol.**, **147**: 678-87, 1995.

PIGNATELLI, P.; PULCINELLI, F.M.; LENTI, L.; GAZZANIGA, P.P. & VIOLI, F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. **Blood**, **91**: 484-490, 1998.

POLANOWSKA-GRABOWSKA, R. & GEAR, A.R. Role of cyclic nucleotides in rapid platelet adhesion to collagen. **Blood**, **83**: 2508-2515, 1994.

PRADELLES, P. & GRASSI, J. Enzyme immunoassay of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate using acetylcholinesterase. **Anal. Chem.**, **61**: 447, 1989.

PROVOST, P.; TREMBLAY, J. & MERHI, Y. The antiadhesive and antithrombotic effects of the nitric oxide donor SIN-1 are combined with a decreased vasoconstriction in a porcine model of balloon angioplasty. **Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.**, **17**: 1806-12, 1997.

PRYOR, W.A. & SQUADRITO, G.L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. **Am. J. Physiol.**, **268**: 699-722, 1995.

RADI, R.; PELLUFO, G.; ALVAREZ, M.N.; NAVILIAT, M. & CAYOTA, A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. **Free Radic. Biol. Med.**, **30**: 463-488, 1991.

RADI, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **101**: 4003-4008, 2004.

RADOMSKI, M.W.; PALMER, M.J. & MONCADA, S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. **Lancet**, **2**: 1057-1058, 1987.

RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.J. & MONCADA, S. Characterization of the L-arginine: nitric oxide pathway in human platelets. **Br. J. Pharmacol.**, **101**: 325-328, 1990_a.

RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M. & MONCADA, S. Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets. **Br. J. Pharmacol.**, **101**: 325-328, 1990.

RASMUSSEN, U.B.; VOURET-CRAVIARI, V.; JALLAT, S.; SCHLESINGER, Y.; PAGES, G.; PAVIRANI, A.; LECOCQ, J.P.; POUYSSEGUR, J. & VAN OBBERGHEN-SCHILLING, E. cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization. **FEBS Lett.**, **288**: 123-8, 1991.

ROBAK, J. & GRYGLEWSKI, R.J. Nitric oxid donors as generators and scavenger of superoxide anions. **Pol. J. Pharmacol.**, **45**: 51-58, 1993

- ROBIN, E.D. & MCCAULEY, R. Nitroprusside-related cyanide poisoning. Time (long past due) for urgent, effective interventions. **Chest.**, **102**: 1842-1845, 1992.
- ROSS, R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. **N. Engl. J. Med.**, **340**: 115-26, 1999.
- RUBBO, H.; DENICOLA, A. & RADI R. Peroxynitrite inactivates thiol-containing enzymes of *Trypanosoma cruzi* energetic metabolism and inhibits cell respiration. **Arch. Biochem. Biophys.**, **308**: 96-102, 1994.
- RUDOLPH, W. & DIRSCHINGER, J. Effectiveness of molsidomine in the long-term treatment of exertional angina pectoris and chronic congestive heart failure. **Am. Heart J.**, **109**: 670-4, 1985.
- SABETKAR, M.; LOW, S.Y.; NASEEM, K.M. & BRUCKDORFER, K.R. The nitration of proteins in platelets: significance in platelet function **Free Radic. Biol. Med.**, **33**: 728-736, 2002.
- SALVEMINI, D.; DE NUCCI, G.; SNEDDON, J.M. & VANE, J.R. Superoxide anions enhance platelet adhesion and aggregation. **Br. J. Pharmacol.**, **97**: 1145-1150, 1989.
- SAVAGE, B. & RUGGERI, Z.M. Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets. **J. Biol. Chem.**, **266**: 11227-11233, 1991.
- SAVAGE, B.; SHATTIL, S.J. & RUGGERI, Z.M. Modulation of platelet function through adhesion receptors. 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.**, **267**: 11300-11306, 1992.
- SCHOPFER, F.J.; BAKER, P.R.S. & FREEMAN, B.A. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? **TRENDS in Biochemical Sciences**, **28**: 646-653, 2003.

- SCHRAMMEL, A.; BEHREND, S.; SCHMIDT, K.; KOESLING, D. & MAYER, B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Mol. Pharmacol.**, **50**: 1-5, 1996.
- SETHI, S.; SINGH, M.P. & DIKSHIT, M. Nitric oxide mediated augmentation of polymorphonuclear free radical generation after hypoxia-reoxygenation. **Blood**, **93**: 333-340, 1999.
- SHATTIL, S.J.; GINSBERG, M.H. & BRUGGE, J.S. Adhesive signaling in platelets. **Curr. Op. Cell Biol**, **6**: 695-704, 1994.
- SHATTIL, S.J.; HAIMOVICH, B.; CUNNINGHAM, M.; LIPFERT, L.; PARSONS, J.T.; GINSBERG, M.H. & BRUGGE, J.S. Tyrosine phosphorylation of pp125FAK in platelets requires coordinated signaling through integrin and agonist receptors. **J. Biol. Chem.**, **269**: 14738-45, 1994.
- SHATTIL, S.J.; KASHIWAGI, H. & PAMPORI, N. Integrin signaling: the platelet paradigm. **Blood**, **91**: 2645-2657, 1998.
- SHATTIL, S.J. Signaling through platelet integrin : inside-out, outside-in, and sideways. **Thrombosis and Haemostasis**, **82**: 318-325, 1999.
- SINGH, R.J.; HOGG, N.; JOSEPH, J.; KONOREV, E. & KALYANARAMAN, B. The peroxynitrite generator, SIN-1, becomes a nitric oxide donor in the presence of electron acceptors. **Arch. Biochem. Biophys.**, **361**: 331-9, 1999.
- SIXMA, J.J. & WESTER, J. The hemostatic plug. **Semin. Hematol.**, **14**: 265-299, 1977.
- SOUZA, J.M.; DAIKHIN, E.; YUDKOFF, M.; RAMAN, C.S. & ISCHIROPOULOS, H. **Arch. Biochem. Biophys.**, **371**: 169-178, 1999.
- STUEHR, D.J. & NATHAN, C.F. Nitric oxide: A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J. Exp. Med.**, **174**: 1009-1021, 1989.

SZABÓ, C. & THIEMERMANN, C. Regulation of the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase. **Adv. Pharmacol.**, **34**: 113-153, 1995.

TANAKA, K. & ITOH, K. (Reorganization of stress fiber-like structures in spreading platelets during surface activation. **J. Struct. Biol.**, **124**: 13-41, 1998.

TANAYAMA, S.; NAKAI, Y.; FUJITA, T.; SUKUOKI, Z.; IMASHIRO, Y., & MASUDA, K. Biotransformation of molsidomine (N-ethoxycarbonyl-3-morpholinosyndonimine), a new antianginal agent in rats. **Xenobiotica**, **4**: 175-191, 1974.

TANG, J.; TAYLOR, D.W. & TAYLOR, K.A. The three-dimensional structure of alpha-actinin obtained by cryoelectron microscopy suggests a model for Ca(2+)-dependent actin binding. **J. Mol. Biol.**, **310**: 845-858, 2001.

TOLLEFSEN, D.M.; FEAGLER, J.R. & MAJERUS, P.W. The binding of thrombin to the surface of human platelets. **J. Biol. Chem.**, **249**: 2646-51, 1974.

TSIKAS, D.; IKIE, M.; TEWES, K.S.; RAID, M. & FRÖLICH, J.C. Inhibition of platelet aggregation by S-nitroso-cysteine via cGMP-independent mechanisms: evidence of inhibition of thromboxane A₂ synthesis in human blood platelets. **FEBS Lett.**, **442**: 162-166.

VOLK, T.; IOANNIDIS, I.; HENSEL, M.; DEGROOT, H. & KOX, W.J. Endothelial damage induced by nitric oxide: synergism with reactive oxygen species. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **213**: 196-203, 1995.

VU, T.K.; HUNG, D.; WHEATON, V. & COUGLIN, S. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. **Cell**, **64**: 1957-1068, 1991.

WACHOWICZ, B.; OLAS, B.; ZBIKOWSKA, H.M. & BUCZYNSKI, A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. **Platelets**, **13**: 175-182, 2002.

- WALLERATH, T.; GATH, I.; AULITZKY, W.E.; POLLOCK, J.S.; KLEINERT, H. & FORSTERMANN U. Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets. **Thromb. Haemost.**, **77**: 163-7, 1997.
- WANG, Y. & MARSDEN, P.A. Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. **Adv. Pharmacol.**, **34**: 71-90, 1995.
- WANIKIAT, P.; WOODWARD, D.F. & ARMSTRONG, R.A. Investigation of the role of nitric oxide and cyclic GMP in both the activation and inhibition of human neutrophils. **Br. J. Pharmacol.**, **122**: 1135-1145, 1997.
- WINTERBOURN, C.C. & KETTLE, A.J. Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**: 729-736, 2003.
- WU, C.C.; KO, F-N. & TENG, C.M. Inhibition of platelet adhesion to collagen by cGMP-elevating agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **231**: 412-416, 1997.
- XIA, Y., LI, J.; BERTINO, A. & KUTER, D.J. Thrombopoietin and the TPO receptor during platelet storage. **Transfusion**, **40**: 796, 2000.
- XU, W.F.; ANDERSEN, H.; WHITMORE, T.E.; PRESNELL, S.R.; YEE, D.P.; CHING, A.; GILBERT, T.; DAVIE, E.W. & FOSTER, D.C. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **95**: 6642-6, 1998.
- YIM, M.B.; CHOCK, P.B. & STADTMAN, E.R. Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. **J. Biol. Chem.**, **268**: 4099-105, 1993.
- YIN, K.; LAI, P.S.; RODRIGUEZ, A.; SPUR, B.W. & WONG, P.Y. Antithrombotic effects of peroxynitrite: inhibition and reversal of aggregation in human platelets. **Prostaglandins**, **50**: 169-78, 1995.

YOKOZAWA, T.; RHYU, D.Y.; CHO, E.J. & AOYAGI, K. Protective activity of (-)-epicatechin 3-O-gallate against peroxynitrite-mediated renal damage. **Free Radic. Res.**, **37**: 561-71, 2003.

ZHAO, K.S.; LIU, J.; YANG, G.Y.; JIN, C.; HUANG, Q. & HUANG, X. Peroxynitrite leads to arteriolar smooth muscle cell membrane hyperpolarization and low vasoreactivity in severe shock. **Clin. Hemorheol, Microcirc.**, **23**: 259-67, 2000.

ZOU, M.; MARTIN, C. & ULLRICH, V. Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. **Biol. Chem.**, **378**:707-13, 1997.