



Priscila Fukumura Monteiro

**CONTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE
OXIGÊNIO PARA A HIPERREATIVIDADE
PLAQUETÁRIA EM RATOS TRATADOS COM DIETA
HIPERLIPÍDICA**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

Priscila Fukumura Monteiro

**CONTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO
PARA A HIPERREATIVIDADE PLAQUETÁRIA EM RATOS
TRATADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Edson Antunes

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestra em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
PRISCILA FUKUMURA MONTEIRO E ORIENTADA PELO
PROF. DR. EDSON ANTUNES.

Assinatura do Orientador

Campinas

2013

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

M764c

Monteiro, Priscila Fukumura, 1983-
Contribuição de espécies reativas de oxigênio para a hiperreatividade plaquetária em ratos tratados com dieta hiperlipídica / Priscila Fukumura Monteiro. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Edson Antunes.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Agregação plaquetária. 2. Obesidade. 3. Espécies de oxigênio reativas. 4. Óxido nítrico. 5. GMP cíclico. I. Sobrenome Nome do Orientador, Ano Nascimento-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Contribution of reactive –oxygen species to the platelet hiperreactivity in high-fat fed rats.

Palavras-chave em inglês:

Platelet aggregation

Obesity

Reactive oxygen species

Nitric oxide

Cyclic GMP

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestra em Farmacologia

Banca examinadora:

Edson Antunes [Orientador]

Carla Fernanda Franco Penteado

Fernanda Bruschi Marinho Priviero

Data da defesa: 28-01-2013

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

PRISCILA FUKUMURA MONTEIRO

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON ANTUNES

MEMBROS:

1. PROF. DR. EDSON ANTUNES



2. PROFA. DRA. CARLA FERNANDA FRANCO PENTEADO



3. PROFA. DRA. FERNANDA BRUSCHI MARINHO PRIVIERO



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

Data: 28 de janeiro de 2013

DEDICATÓRIA

*Primeiramente quero agradecer a Deus, por tudo de bom que ele proporciona na
minha vida.*

*Aos meus pais Antonio e Maria Veranice e minha irmã Patricia; sem o apoio deles
eu jamais teria alcançado meus objetivos. Pelo constante desejo de me ver crescer e
vencer a cada dia. A vocês meus agradecimentos mais sinceros...*

*Aos meus irmãos, Anthony e Anderson, que mesmo longe sempre me apoiando e
torcendo por mim ...*

*Ao meu querido amigo Diego Zago, pela sua presença que mesmo de longe sempre
estive torcendo por mim e por todo seu carinho...*

A todos vocês dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de inspiração, força e esperança, que me faz levantar e seguir em frente, diariamente.

Ao Professor Edson Antunes, que além de professor, orientador será sempre um grande amigo. Muito obrigada pela oportunidade de descobrir e me encantar cada vez mais pela vida acadêmica desde a iniciação científica.

Ao meu grande amigo Rafael, você foi muito mais que um amigo, foi um irmão, professor, sempre ao meu lado me ensinando com todo carinho e paciência, obrigada pela dedicação na minha vida profissional... Serei eternamente grata!

A minha querida amiga Nádia, por todos os bolos maravilhosos que você sempre preparou e levou para o departamento proporcionando a alegria de todos, pela sua amizade e todo seu carinho desde o tempo da graduação.

Ao professor Stephen por ceder os aparelhos do seu laboratório.

A todos os colegas do laboratório de Farmacologia da Unicamp, da “Casata”, “Célula”, “Edema” pelos ensinamentos e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Unicamp, Sr Miguel e Denise por todo carinho e paciência em cuidar dos meus animais.

As minhas queridas amigas Glaucia e Tatiane que sempre estiveram presentes nos momentos de alegria e tristeza! Obrigada por tudo meninas, pelos conselhos e pelas ajudas nos momentos mais difíceis!

A todos os outros amigos do Departamento, muito obrigada pelo carinho e por votarem em mim para ser a Representante Discente do Departamento de Farmacologia da Unicamp.

*Tudo é do “Pai”, toda honra e
toda glória, é Dele mais essa vitória alcançada em minha vida....*

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
LISTA DE MATERIAIS	xvii
RESUMO	19
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO	24
1.1. Plaquetas.....	24
1.2. Antioxidantes	29
1.3. Espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN).....	31
1.4. Óxido nítrico (NO)	32
1.6. Obesidade	35
2. OBJETIVOS.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1. Animais.....	42
3.2. Protocolos Experimentais	43
3.2.1. Teste de tolerância à glicose.....	44
3.2.2. Teste de tolerância à insulina.....	44
3.2.3. Medida do perfil lipídico	45
3.2.4. Obtenção de plaquetas lavadas	45
3.2.5. Ensaio de adesão plaquetária.....	46
3.2.6. Ensaio de agregação plaquetária.....	47
3.2.7. Determinação de ERO por citometria de fluxo	47
3.2.8. Determinação dos níveis de GMPc	48
3.2.9. Análise estatística	49
4. RESULTADOS.....	51

4.1. Ganho de peso e gordura epididimal	51
4.2. Perfil lipídico, curva de tolerância à glicose e resistência à insulina	53
4.3. Adesão plaquetária estimulada com ADP e trombina ao fibrinogênio imobilizado.....	56
4.4. Agregação plaquetária estimulada com colágeno, ADP e trombina	57
4.5. Efeito do antioxidante NAC na agregação plaquetária	58
4.6. Efeito do antioxidante PEG-catalase na agregação plaquetária.....	60
4.7. Efeito do antioxidante PEG-SOD na agregação plaquetária	62
4.8. Produção de ERO em plaquetas lavadas	63
4.9. Efeito do nitropussiato de sódio (SNP), S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) e BAY 41-2271 na agregação plaquetária e nos níveis intracelulares de GMPc.....	65
4.10. Efeito do iloprost na agregação plaquetária	67
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÃO	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
8. ANEXO	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina di-fosfato
AGES	<i>Advanced glycation end-products</i>
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ATP	Adenosina tri-fosfato
Ca⁺⁺	Íons cálcio
CAT	Catalase
EGTA	Ácido tetracético etileno glicol
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FVW	Fator de von Willebrand,
g	Gramma
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GPIIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
GTP	Trifosfato de guanosina
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MFI	“Mean fluorescent intensity”
Mg	Miligramma (s)
Min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)

NAC	N-acetilcisteína
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O₂⁻	Ânion superóxido
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAR	Receptor ativado por protease
PECAM-1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
PEG-catalase	Catalase polietileno glicol
PEG-SOD	Superóxido dismutase polietileno glicol
PGI₂	Prostaciclina
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
PRP	Plasma rico em plaquetas
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
SNP	Nitroprussiato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TXA₂	Tromboxano A ₂
XO	Xantina oxidase
μL	Microlitro (s)
μM	Micromolar
pmol	Picomol

LISTA DE MATERIAIS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
ADP	Sigma (EUA)
Albumina bovina	Sigma (EUA)
BAY 41-2272	Sigma (EUA)
CaCl ₂ .H ₂ O	Merck (Darmstadt, Alemanha)
cloreto de cálcio	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Colágeno	Sigma (EUA)
DCFH-DA	Sigma (EUA)
EGTA	Sigma (EUA)
Fibrinogênio (fração I)	Sigma (EUA)
Glicose	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
HCl	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
Iloprost	Schering (Alemanha)
Isoflurano	Cristália Pr. Quím. Far. (Itapira, Brasil)
KCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KH ₂ PO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Na ₂ HPO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NAC	Sigma (EUA)
NaCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaH ₂ PO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaHCO ₃	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaOH	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
ODQ	Sigma (EUA)

Óleo de imersão p/ microscopia	Merck (Darmstadt, Alemanha)
PEG-Catalase	Sigma (EUA)
p-nitrofenil fosfato	Sigma (EUA)
sacarose	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
SNAP	Sigma (EUA)
SNP	Sigma (EUA)
PEG-SOD	Sigma (EUA)
Triton-X-100	Sigma (EUA)
Trombina (plasma humano)	Sigma (EUA)

RESUMO

As plaquetas desempenham uma função fisiológica importante no sistema hemostático, em resposta a lesão vascular através da prevenção da hemorragia. A adesão ou agregação plaquetária são eficazes na contribuição sinérgica de várias interações de múltiplos receptores, que transmitem sinais de ativação que iniciam uma série de respostas bioquímicas e morfológicas, associadas a remodelação do citoesqueleto, a secreção granular e a geração e liberação de agonistas endógenos solúveis, tais como ADP e tromboxano A₂ (TXA₂). O NO derivado da célula endotelial exerce um efeito inibitório na função da plaquetária através da ativação de cGMP / PKG, a qual, por sua vez leva a uma redução na concentração de Ca^{2+} prevenindo assim a adesão e agregação de plaquetas à parede vascular. No entanto, a disfunção endotelial, presente em certas condições patológicas é caracterizada por uma diminuição da biodisponibilidade de NO que leva a ativação anormal das plaquetas conduzindo a trombose vascular. A disfunção plaquetária é considerada uma fase final de complicações cardiovasculares no diabetes mellitus tipo II, obesidade, aterosclerose, levando ao resultado clínico, tais como enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença arterial periférica. A obesidade é um importante problema de saúde pública, atingindo todas as idades e grupos socioeconômicos elevando a incidência de doenças cardiovasculares e endócrino-metabólica. Um estado crônico de stress oxidativo e inflamação são marcados pela adiposidade que desempenha um papel crucial nos eventos fisiopatológicos desta desordem. Estes efeitos pró-inflamatórios e pró-oxidante estão associados com o aumento de ERO com diminuição da biodisponibilidade, o que aumenta o risco de eventos trombóticos aterosclerose. No entanto, os mecanismos pelos quais a adiposidade induz disfunção plaquetária são pouco esclarecidos. Além

disso, a maioria dos eventos cardiovasculares fatais como consequência de complicação trombótica não estão associadas a estenose vascular completa, mas sim com as alterações de biomarcadores pró-inflamatórios e pró-oxidantes, o que pode prever futuros eventos cardiovasculares. Nossa hipótese é que a produção de ERO intraplaquetário causada pela adiposidade contribui para eventos trombóticos e distúrbios endocrinometabólico. Assim, investigou-se a reatividade plaquetária *ex-vivo* em resposta ao ADP e trombina, em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, e o envolvimento de ERO e via do NO-cGMP na modulação da reatividade de plaquetária.

ABSTRACT

Platelets play an important physiological function in haemostasis system in response to vascular injury by preventing hemorrhage. Effective platelet adhesion and aggregation require the synergistic contribution of multiple receptor–ligand interactions that transmit activating signals initiating a range of platelet biochemical and morphological responses, linked to cytoskeleton remodeling, granule secretion and the generation and release of endogenous soluble agonists, such as ADP and thromboxane A₂ (TXA₂). Endothelial cell-derived nitric oxide (NO) exerts an inhibitory effect in the platelet function by activation of cGMP/PKG pathway, which in turn leads to reduction in concentration of Ca²⁺, thus preventing adhesion and aggregation of platelets to the vascular wall. Nonetheless, endothelium dysfunction, present in certain pathological conditions is characterized by a decreased NO bioavailability which incites abnormal platelet activation leading to vascular thrombosis. Platelet dysfunction is considered an end stage of cardiovascular complications in type II diabetes mellitus, obesity and atherosclerosis that results in clinical outcomes such as myocardial infarction, stroke and peripheral artery disease. Obesity is an important public health problem affecting all ages and socioeconomic groups greatly elevating the incidence of cardiovascular and endocrine-metabolic disorders. A chronic state of oxidative stress and inflammation are the hallmark of adiposity that play a pivotal role in the physiopathological events in this disorder. These proinflammatory and pro-oxidant effects are associated with increased reactive-oxygen species (ROS) production and decreased NO bioavailability, which increases the risk of athero thrombotic events. Nonetheless, the exact mechanisms by which adiposity induces platelet dysfunction remain poorly investigated. In addition, most

of fatal cardiovascular events as consequence of thrombotic complication are not associated with complete vascular stenosis, but rather with alterations of pro-inflammatory and pro-oxidant biomarkers, which can predict future cardiovascular events. We hypothesized that intraplatelet ROS production in adiposity contributes to thrombotic events in endocrinometabolic disorders. Therefore, we have investigated the ex-vivo platelet reactivity in response to ADP and thrombin in high fat-fed rats, and the involvement of platelet-derived ROS and NO-cGMP pathway in modulating the platelet reactivity.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Plaquetas

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos oriundos dos megacariócitos formados na medula óssea. Estão presentes no sangue em número aproximado de $140 - 400 \times 10^3/\mu\text{L}$, com sobrevivência na circulação de 8 a 10 dias, quando então são retirados desta, principalmente pelo baço e fígado. Possuem forma de discos diminutos, sendo considerados, corpúsculos celulares e não células propriamente ditas. São anucleadas, e seu citoplasma contém numerosas organelas como mitocôndrias, sistema de Golgi, ribossomos, microtúbulos e contém ainda três tipos de grânulos, classificados como: densos, alfa e lisossomais (Harker, 1978).

Os grânulos densos contêm serotonina, ATP, ADP, cálcio e pirofosfato. 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 assim como a fosfatase ácida (Holmsen e Weiss, 1979).

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

A integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (GPIIb/IIIa) é a glicoproteína mais abundante na superfície plaquetária, (Charo *et al.*, 1998). Como outras moléculas da família das integrinas, a GPIIb-IIIa atua como um receptor na interação entre plaquetas ou na ligação das plaquetas com proteínas do subendotélio vascular, decisivo para o processo de agregação e adesão. É o principal receptor plaquetário para fibrinogênio, sendo um heterodímero dependente de cálcio que medeia a agregação, adesão firme e o espalhamento plaquetário (Calvete, 1999).

A GPIIb-IIIa é constituída por um complexo de cadeias de polipeptídeos. A GP IIb é composta pelas subunidades $\text{IIb}\alpha$ e $\text{IIb}\beta$ ligadas por pontes dissulfeto, com peso molecular de 116KD e 25KD, respectivamente. Apenas a subunidade $\text{IIb}\beta$ apresenta porção citoplasmática (Lefkovits *et al.*, 1995). O polipeptídeo IIIa ($\text{b}3$) possui peso molecular de 100KD, em sua porção citoplasmática, e está associado à GP IIb por ligação não covalente. Além de estar presente na membrana plaquetária, a GP IIb-IIIa também é encontrada no sistema canalicular aberto (SCA) e na membrana dos grânulos alfa (Cramer *et al.*, 1990; Wencel-Drake *et al.*, 1986). Estima-se que o total da GPIIb-IIIa presente na superfície plaquetária possa ser mobilizado do SCA e grânulos alfa durante o processo de ativação (Woods *et al.* 1986).

A ativação plaquetária desencadeia mudanças conformacionais na GP IIb-IIIa, que passa a funcionar como um receptor capaz de se ligar à seqüência de aminoácidos arg – gly – asp (RGD) presente na molécula do fibrinogênio, fator de von Willebrand (FVW), fibronectina e vitronectina, e à seqüência Lys – Gln – Ala – Gly– Asp – Val (LGAGAV) do fibrinogênio. O sítio principal de ligação da seqüência RGD é a porção amino terminal da subunidade $\text{b}3$ (GPIIIa) (Landi *et al.*, 2003). Quando ativadas, as plaquetas secretam várias substâncias que facilitam a interação com outras plaquetas,

leucócitos, células endoteliais e proteínas como as P-selectinas, trombospondina, fibrinogênio, fibronectina e vitronectina (Ofosu, 2002). As plaquetas sintetizam e liberam o tromboxano (TXA₂) (Hamberg *et al.*, 1975) e o fator de ativação plaquetário (PAF) (Chignard *et al.*, 1979; 1980), mediadores estes conhecidos pela capacidade de liberar o conteúdo granular para o meio externo, e amplificar a ativação plaquetária.

As plaquetas têm como função primordial manter a hemostasia, por meio da formação de tampões hemostáticos que ocluem sítios danificados do sistema vascular, além de participar em processos inflamatórios (Klinger e Yeaman, 1997). Após a transecção de vasos sangüíneos, as plaquetas aderem ao tecido conectivo às margens da lesão e formando rapidamente, um tampão hemostático plaquetário que oclui a lesão e detém a perda de sangue.

A ativação plaquetária inapropriada pode contribuir para a patogênese de doenças como aterosclerose e coagulação intravascular disseminada. A Aterosclerose é a maior causa de morte em países desenvolvidos onde cerca de 50% dos casos estão correlacionados a fatores de risco como obesidade, tabagismo, fatores genéticos e hipertensão arterial (Ward *et al.*, 2005). Plaquetas ativadas são também capazes de gerar espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido (Iuliano e col., 2001). Entretanto, o papel dessas espécies reativas de oxigênio em plaquetas ainda é bastante contraditório (Clark *et al.*, 1980; Ohyashiki *et al.*, 1991; Belisario *et al.*, 2000; Marcondes *et al.*, 2006).

1.1.2. Adesão e ativação plaquetária

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

Na adesão, o processo de ativação plaquetária começa a partir da etapa *outside-in* enquanto que na agregação, geralmente, inicia-se pela sinalização *inside-out*. Entretanto, algumas enzimas podem ser ativadas simplesmente pela ligação do fibrinogênio ao seu receptor, como a Syk (Obergefell *et al.*, 2002) ou pela ativação da proteína G, como a PI3-K δ (Lévy-Toledano, 1999); mas outras são ativadas somente quando há ativação total das plaquetas.

A ativação plaquetária geralmente gera quatro diferentes fenômenos: (1) “shape change”, que envolve a mudança da forma discóide para a forma esférica, acompanhada da emissão de pseudópodes; (2) adesão, que é um processo no qual as plaquetas se ligam a superfícies que não a de outras plaquetas; (3) agregação, que é o processo onde as plaquetas se ligam apenas à superfície de outras plaquetas; e (4) secreção, que compreende a extrusão do conteúdo granular das plaquetas durante a agregação, a adesão ou mesmo na ausência de ambas. E este processo pode ocorrer na presença ou na ausência de ativadores exógenos, dependendo das condições hemodinâmicas locais e da natureza da lesão vascular.

O processo de sinalização da ativação realiza-se em duas etapas: *inside-out* e *outside-in*. A primeira, *inside-out*, compreende a ligação de um agonista ao seu receptor específico, que, por sua vez, está ligado à proteína G, levando à ativação da fosfolipase

C (PLC) e, conseqüentemente, ao aumento de Ca^{++} intracelular e ativação de uma série de enzimas dependentes deste íon. Esta cascata de sinais intracelulares é a responsável pela conversão do receptor $\alpha\text{IIb}\beta 3$ do estado de baixa afinidade para o de alta afinidade, permitindo assim a ligação ao seu ligante (Abrams *et al.*, 1990 e Lévy-Toledano., 1999). A integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ participa dos processos tanto de agregação quanto de adesão sendo responsável pela ligação das plaquetas ao fibrinogênio, fator de Von Willebrand (FVW), vitronectina e fibronectina (Shattil *et al.*, 1994). Após a ligação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ao seu ligante, inicia-se a segunda etapa de sinalização, denominada *outside-in*, responsável pela segunda onda da agregação, reorganização do citoesqueleto, sendo esta importante para a firme adesão bem como para a estabilização dos grandes agregados de plaquetas (Peerschke, 1995).

1.1.3. Agonistas plaquetários

Uma série de substâncias é capaz 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).

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). Este agonista 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 (Grand *et al.*, 1996). 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).

O ADP é considerado um agonista fraco para plaquetas humanas, mas exerce um importante papel na potencialização da ativação mediada por outros estímulos. Este agonista ativa a plaqueta ligando-se ao receptor P2Y1 (Jin *et al*, 1998) acoplado à proteína G α_q , levando à ativação da fosfolipase C β ; e pela ligação ao receptor P2Y12 (Hollopeter *et al.*, 2001) acoplado à proteína G α_i inibindo a adenilil ciclase. Apesar de um fraco agonista de plaquetas humanas, o ADP promove uma ativação plaquetária e ligação mais intensa das plaquetas de ratos ao fibrinogênio quando comparado com a ativação resultante da trombina (Nylander *et al.*, 2005).

Outros agonistas promovem ativação plaquetária ligando-se aos seus respectivos receptores, como a: adrenalina a receptores α_2 -adrenérgicos, colágeno a GP-VI ($\alpha_2\beta_1$) e FVW imobilizado a GP Ib-V-IX.

1.2. Antioxidantes

Uma ampla definição para antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (Sies & Stahl, 1995). Em condições fisiológicas existe um balanço entre a produção de ERO e os mecanismos antioxidantes do nosso organismo (Cadenas, 1997; Gutteridge & Mitchell, 1999; McCord, 2000).

Dentre os maiores antioxidantes enzimáticos envolvidos na decomposição catalítica de ERO estão a catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) entre outros (McCord, 2000; Bayir, 2005). A SOD é capaz de

converter o O_2^- em peróxido (H_2O_2) o qual é reduzido a água pela catalase. Já a GPx reduz o H_2O_2 , através da glutathiona reduzida, levando à formação da glutathiona oxidada (GSSG) (Kulbacka, 2009).

Os antioxidantes não enzimáticos incluem a vitamina C (ácido ascórbico) e E (α -tocoferol), carotenóides (Bayir, 2005; Freedman, 2008), a quercetina (presente nas frutas – como maçãs e bagas, vegetais e em algumas bebidas, como vinho e chá), flavonóides, ácido lipóico, a glutathiona (GSH), levando à diminuição na quantidade de ERO (Kovacic *et.al.*, 2005).

A GSH é o principal antioxidante solúvel do citosol e desempenha papel importante na proteção do organismo contra o estresse oxidativo, sendo este um co-fator para diversas enzimas desintoxicantes (Bhattacharyya *et.al.*, 2004). A GSH reduz as vitaminas C e E para suas formas ativas e podendo ainda, através da glutathiona-S-transferase, detoxificar aldeídos reativos (como a malondialdeído) gerados durante a peroxidação lipídica. Na verdade, a razão GSH/GSSG é um índice bastante utilizado para se avaliar estresse oxidativo (Masella *et.al.*, 2005).

A N-acetilcisteína (NAC) é um antioxidante que atua como um seqüestrador de radicais livres e é um precursor da glutathiona. Por apresentar estas características, a NAC é utilizada clinicamente em pacientes com intoxicação por paracetamol, no tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica, na prevenção da insuficiência renal causada por meios de contraste, e no tratamento de algumas desordens do sistema nervoso central (SNC). Além disso, a NAC também é bastante utilizada como ferramenta em estudos de estresse oxidativo (Atkuri *et.al.*, 2007; Millea, 2009; Vanderschueren *et.al.*, 2000).

1.3. Espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN)

Vários estudos destacam as ERO e ERN como importantes contribuintes na patogênese de numerosas doenças cardiovasculares, como a hipertensão, aterosclerose e insuficiência cardíaca, entre outras. Múltiplos sistemas enzimáticos produzem ERN e seus derivados na vasculatura, incluindo ciclooxigenase, lipoxigenase, citocromo P450, xantina oxidase (XO), mieloperoxidase (MPO), óxido nítrico sintase (NOS) e NADPH oxidase, sendo esta última uma das mais importantes fontes destas substâncias, tanto em células endoteliais como musculares lisas (Cai *et al.*, 2003, Ushio-Fukai, 2006).

O aumento da produção de O_2^- e outras ERN está implicado na aterosclerose, hipertensão arterial, proliferação celular e hipertrofia (Touyz, 2004; Zhang *et al.*, 2008). Dentre as ERO mais comuns podemos citar o O_2^- , o peróxido de hidrogênio H_2O_2 e o radical hidroxila ($OH^\bullet$).

As ERO são altamente reativas e potencialmente tóxicas, podendo reagir com muitos componentes celulares como lipídeos, proteínas estruturais, enzimas e nucleotídeos, causando danos às funções celulares (Kovacic *et al.*, 2005;).

O O_2^- é mais comumente produzido na mitocôndria, onde 1-3% de todos os elétrons “escapam” da cadeia de transporte de elétrons para gerá-lo ao invés de contribuir para a redução do oxigênio para a formação de água (Miller *et al.*, 2005). Além da cadeia de transporte de elétrons, a NADPH oxidase é uma importante fonte de geração de O_2^- . O protótipo das NADPH oxidase (ou NOX2) foi originalmente descrita em leucócitos. É constituída de duas subunidades presentes na membrana citoplasmática (gp91phox e p22phox) e três subunidades citosólicas (p47phox, p67phox

e p40phox), além da trifosfatase da guanosina (GTPase) Rac1. Hoje são descritas 7 enzimas pertencentes à família das NADPH oxidases – a NOX1-5 e a Duox 1 e 2. Logo após a formação de O_2^- , este é rapidamente convertido em H_2O_2 pela SOD (Seno *et.al.*, 2001; Pignatelli *et.al.*, 2004; Stokes *et.al.*, 2007; Krotz *et.al.*, 2002; Brown & Griending, 2009).

O H_2O_2 é produzido em grandes quantidades nos peroxissomas pela ação de oxidases envolvidas no catabolismo de aminoácidos e na oxidação de ácidos graxos, sendo degradado pela catalase e glutathione peroxidase. O H_2O_2 está envolvido na produção do OH° , uma espécie altamente reativa. O OH° pode ser gerado pela mieloperoxidase ou reações catalisadas pelo ferro (Liochev & Fridovich, 2002).

1.4. Óxido nítrico (NO)

O NO é um mediador fisiológico gasoso primeiramente denominado “Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio” (Furchgott e Zawadzki, 1980). Está envolvido em diversas funções fisiológicas, incluindo relaxamento de músculo liso e neurotransmissão ao nível de sistema nervoso central e autônomo (Moncada *et al.*, 1991; Garthwaite, 1995),

A maior parte de seus efeitos é mediada pela estimulação direta da guanilil ciclase solúvel GCs (Lucas *et al.*, 2000). As enzimas responsáveis pela geração de NO são conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS) e catalisam a oxidação do nitrogênio do grupamento guanidino da L-arginina (L-Arg), formando NO e L-citrulina em duas etapas, com a formação do intermediário N^ω -hidroxi-L-arginina (Marletta, 1988, 1993;

Marletta *et al.*,1988; Feldman *et al.*,1993; Fukuto & Chaudhuri, 1995; Ignarro & Murad, 1995; Kerwin *et al.*,1995).

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, a eNOS e a nNOS são ativadas pelo influxo intracelular de cálcio (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1988).

1.5. Óxido nítrico e plaquetas

O NO desempenha um papel crucial na função plaquetária, regulando a ativação excessiva das plaquetas, prevenindo, conseqüentemente, a formação de trombos plaquetários (Radomski *et al.*, 1987; Low *et al.*, 2002). O NO exerce sua ação inibitória sobre as plaquetas mediante a ativação de vias de sinalização dependentes de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Este segundo mensageiro (GMPc), é originado a partir de 5'trifosfato de guanosina (GTP) pela ação da guanilil ciclase solúvel (GCs) no citosol estimulada pelo NO. Os mecanismos dependentes de GMPc acontecem pela redução do nível de Ca^{2+} citoplasmático, bloqueio do receptor de TXA₂, expressão de P-selectina e modulação da ligação de fibrinogênio via receptor GPIIb/IIIa (Hartwing & Italiano, 2003).

Até recentemente acreditava-se que a inibição plaquetária pelo NO era exclusivamente mediada pela via GCs/GMPc. Entretanto, tem 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 tenham sido inteiramente elucidados, 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 ocorrência de nitração de proteínas plaquetárias humanas durante a agregação de plaquetas induzida por colágeno, sugerindo que o processo de nitração pode ser parte do mecanismo inibitório do NO na ativação plaquetária.

A GCs é expressa no citoplasma de quase todas as células de mamíferos, e medeia várias funções, como inibição da agregação plaquetária, relaxamento do músculo liso, vasodilatação, transdução de sinais em neurônios e imunomodulação (Collier & Vallance, 1989). Esta enzima heterodímera é constituída por subunidades α e β , com massas moleculares de 77 e 70 kDa, respectivamente (Koesling *et al.*, 1991; Schulz *et al.*, 1991; Hobbs, 1997), onde cada subunidade apresenta um domínio regulatório N-terminal (grupo prostético heme e região de dimerização) e um domínio catalítico C-terminal, sendo a expressão das duas subunidades necessária para atividade catalítica (Harteneck *et al.*, 1990; Buechler *et al.*, 1991).

A presença do grupo prostético *heme* é fundamental para ativação da GCs pelo NO (Gerzer *et al.*, 1982; Ignarro *et al.*, 1982; Ohlstein *et al.*, 1982). O grupo *heme* corresponde a um anel de cinco membros, contendo quatro átomos de nitrogênio que circundam um átomo de ferro na posição central, o qual pode encontrar-se como forma reduzida Fe^{2+} ou forma oxidada Fe^{3+} . O quinto membro do anel na GCs é um ligante axial imidazólico na posição His105 (Stone & Marletta, 1994). A mutação deste aminoácido, localizado próximo ao N-terminal da subunidade β 1, determina a

incapacidade da GCs de se ligar ao grupo *heme*, resultando em uma enzima insensível ao NO (Wedel *et al.*, 1994).

O NO ativa a GCs por ligar-se diretamente ao grupo *heme* formando um complexo heme-ferrosonitrosil. A ligação do NO promove a quebra da ligação entre a His105 axial e o ferro, resultando em um anel onde o NO está presente na quinta posição, criando assim uma mudança conformacional capaz de ativar a GCs (Traylor & Sharma, 1992; Stone *et al.*, 1995; Lucas *et al.*, 2000). Esta ativação causa elevação nos níveis de GMPc, o qual é clivado a partir do GTP pela GCs (Rapoport & Murad, 1983; Lucas *et al.*, 2000).

Drogas doadoras de NO (nitrovasodilatadores) têm sido utilizada no tratamento de doenças coronarianas, hipertensão e insuficiência cardíaca (Dusting *et.al.*, 2004). Trabalhos anteriores mostraram que o nitroprussiato de sódio (SNP) produz 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). Estudos *in vivo* mostraram que o SNP, em baixas doses, inibe de 20 a 40% a agregação plaquetária induzida pela adrenalina e pelo ADP (Metha *et al.* 1979).

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

1.6. Obesidade

A obesidade é caracterizada pelo excesso de tecido adiposo no organismo, e tem sido considerada um dos principais problemas de saúde pública, atingindo tanto países desenvolvidos como aqueles em desenvolvimento. Durante as últimas décadas, a incidência de obesidade bem como de doenças metabólicas a ela associadas como cardiopatias, dislipidemia, hipertensão arterial e em especial diabetes mellitus tipo 2 (DM2) têm alcançado proporções epidêmicas em várias partes do mundo, sobretudo em países da civilização ocidental, onde elevados índices de sedentarismo são predominantes e os hábitos alimentares caracterizam-se pelo consumo de dieta rica em calorias, provenientes principalmente de lipídios (Kopelman 2000; Wing, Goldstein *et al.*, 2001; Weisberg, McCann *et al.*, 2003). Além disso, a predisposição genética parece ser fator determinante na suscetibilidade à obesidade (Oswal & Yeo, 2007).

Estudos epidemiológicos estimam que mais de 300 milhões de pessoas no mundo são classificadas como obesas. Nos Estados Unidos, 65% dos adultos estão acima do peso ou estão obesos (Melnikova & Wages, 2006). Este fenômeno não se restringe aos adultos, visto que entre as crianças a incidência global da obesidade vem crescendo de forma alarmante (Schwarzenberg, 2005). Na América Latina, o total de obesos supera o de desnutridos. No Brasil, o número de pessoas acima do peso dobrou nas últimas três décadas e já afeta 70 milhões de habitantes. Desses, 18 milhões estão até 45 quilos acima do peso ideal, sendo assim considerados obesos mórbidos. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em conjunto com o Ministério da Saúde estimaram em 38,6 milhões de pessoas, aproximadamente 40% da população adulta, a população de obesos em 2005 (Who, 2008). Segundo a *Sociedade Brasileira de Cardiologia*, aproximadamente 80% da população brasileira adulta é considerada sedentária, e aproximadamente 32% dos adultos são obesos. Estudos demonstram que

a expectativa de vida para os próximos anos deverá diminuir devido ao acelerado aumento da incidência de obesidade (Olshansky *et al.*, 2005).

De acordo com a projeção de um grupo de estudos estratégicos da OMS, caso nenhuma modificação importante das tendências atuais ocorra, as prevalências de obesidade e diabetes mellitus deverão atingir níveis próximos a 25 e 15%, respectivamente, até o ano 2020 (Friedman 2000; Kopelman 2000).

A obesidade pode ser detectada através do índice da massa corporal (IMC) acima ou igual a 30 quilogramas por m², calculado pela razão do peso em quilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros (Bjorntorp, 1997).

A fisiopatologia da obesidade não está completamente elucidada, e muito do que se sabe hoje foi possível devido aos avanços da biologia molecular. A existência de camundongos *knockouts* para determinados genes possibilitou a identificação de novas vias de sinalização celular associada à obesidade (Sanchez, 1997).

Acompanhada por inflamação sistêmica, a obesidade é caracterizada por aumento plasmático de proteína C reativa e de um desbalanço na produção de citocinas pelos monócitos, linfócitos e outras células imunes (Ouchi *et al.*, 2003). Simultaneamente, ocorre a disfunção endotelial e remodelamento vascular (Matsuzawa, 2006).

A alimentação prolongada com dieta hiperlipídica promove um aumento no peso corporal, em animais suscetíveis, na proporção de 10 a 20% acima dos controles alimentados com dieta padrão para roedores. A indução da obesidade torna-se mais efetiva quando a dieta tem início nos animais jovens e perdura por diversas semanas (Peckham, 1962). O ganho de peso durante o período de alimentação com a dieta é gradual, porém, já pode ser observado após duas semanas, tornando-se mais evidente

quando o tratamento é realizado com dieta hiperlipídica por mais de quatro semanas (Buettner *et al.*, 2007).

Sendo assim, a obesidade é uma condição complexa considerada como importante fator de risco para doenças cardiovasculares, dislipidemia, diabetes tipo 2, hipertensão arterial, asma brônquica, osteoartrite e certos tipos de câncer (Field *et al.*, 2001). O estado crônico de estresse oxidativo e inflamação parece desempenhar um papel fundamental nestes eventos fisiopatológicos (Packard e Libby, 2008; De Caterina *et al.*, 2010). Estes efeitos pró-inflamatórios e pró-oxidantes estão associados com o aumento de ERO e a diminuição da biodisponibilidade de NO, aumentando o risco de eventos atero-trombóticos (Anfossi *et al.*, 2009). No entanto, os mecanismos pontuais pelos quais a adiposidade induz a disfunção plaquetária permanecem insuficientemente investigados. Além disso, a maioria dos eventos cardiovasculares fatais secundários à complicação trombótica não está associada à estenose vascular, mas sim a alterações de biomarcadores pró-inflamatórios e pró-oxidantes. Nossa hipótese é que a produção de ERO intraplaquetária na obesidade contribui para eventos trombóticos decorrentes das desordens endócrino-metabólicas. Por essa razão, decidimos investigar a reatividade plaquetária *ex vivo* em resposta ao ADP e trombina em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, avaliando-se a contribuição de ERO oriundas de plaquetas e via de sinalização da NO-GMPc na modulação desta reatividade.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho é investigar a participação das ERO intraplaquetária e da via NO-GMPc na reatividade plaquetária de ratos tratados com dieta hiperlipídica por 10 semanas.

Estratégias experimentais

- Investigar a influência da dieta hiperlipídica nos parâmetros morfométricos e bioquímicos;
- Investigar a adesão plaquetária ao fibrinogênio imobilizado em ratos tratados com a dieta padrão e dieta hiperlipídica;
- Investigar a agregação plaquetária induzida por ADP, trombina e colágeno em ratos tratados com a dieta padrão e dieta hiperlipídica;
- Avaliar os efeitos dos antioxidantes (NAC), sequestradores de O_2^- (PEG-SOD) e de H_2O_2 (PEG-catalase) na agregação de plaquetas de ratos tratados com a dieta padrão e dieta hiperlipídica;
- Avaliar a via de sinalização NO-GMPc na agregação plaquetária de ratos tratadas com dieta padrão e dieta hiperlipídica, usando-se doador de NO (SNP e SNAP) e estimulador da GCs (BAY 41-2272), assim como quantificando-se os níveis intraplaquetários de GMPc;
- Avaliar a via de sinalização do AMPc na agregação plaquetária de ratos tratados com dieta padrão e dieta hiperlipídica, usando o análogo da prostaciclina (iloprost).

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos Wistar machos (peso inicial de 250-270 g) foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-UNICAMP) e mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas. Os animais foram mantidos em ciclos de claro/escuro (12/12 h). O grupo controle, denominado grupo dieta padrão, recebeu ração e água *ad libidum*. A obesidade foi induzida pela substituição da dieta padrão pela dieta AIN93G (Reeves *et al.*, 1993), modificada para hiperlipídica, a qual consiste em 35% do peso de lipídeos (Tabela 1), durante 10 semanas. Tal grupo foi denominado grupo dieta hiperlipídica. Todos os animais foram mantidos em estantes apropriadas, 2 animais por caixa, com temperatura controlada de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP, protocolo n.º2409-1.

Tabela 1 – Composição da dieta experimental

<i>Ingredientes</i>	<i>AIN-93</i>	<i>AIN-93 modificada</i>
	g/100g	g/100g
Amido de milho	39,8	11,8
Caseína	20,0	20,0
Dextrina	13,2	13,2
Sacarose	10,0	10,0
Óleo de soja	7,0	4,0
Banha de porco	0,0	31,0
Celulose microfina (fibra)	5,0	5,0
Mix de Minerais	3,5	3,5
Mis de Vitaminas	1,0	1,0
L-cistina	0,30	0,30
Bitartarato de co- lina	0,25	0,25
TOTAL	100,0	100,0

Reeves, 1993. American Institution of Nutrition-93 G

3.2. Protocolos Experimentais

Ratos controles e alimentados com dieta hiperlipídica por 10 semanas foram inicialmente avaliados quanto à (i) tolerância à glicose, (ii) tolerância à insulina, (iii) perfil glicêmico, (iv) perfil lipídico, (v) ganho ponderal e (vi) gordura epididimal.

Plaquetas lavadas de ambos os grupos experimentais (controles e dieta hiperlipídica) foram submetidas aos seguintes protocolos experimentais:

- (i) Adesão plaquetária frente ao ADP e trombina.
- (ii) Agregação plaquetária frente ao ADP, colágeno e/ou trombina na ausência e na presença de N-acetilcisteína (NAC), PEG-catalase, PEG-

SOD, nitroprussiato de sódio (SNP), S-nitroso-N-acetil-D,L, penicilamina (SNAP), BAY 41-2272 e iloprost.

- (iii) Determinação de ERO em plaquetas não ativadas e ativadas com ADP, na ausência e na presença de N-acetilcisteína (NAC), PEG-catalase ou PEG-SOD.
- (iv) Determinação dos níveis de GMPc em plaquetas estimuladas com ADP, na ausência e na presença de SNP, SNAP ou BAY 41-2272..

3.2.1. Teste de tolerância à glicose

Após 6 h de jejum, os animais receberam solução concentrada de glicose (2 g/Kg) por gavagem. A concentração de glicose foi medida no sangue coletado da cauda dos animais e a glicemia foi determinada através de um glicosímetro (Accu-Chek Performa, Roche Diagnostics, EUA) em diferentes tempos após a administração da solução de glicose (0, 30, 60 e 120 minutos).

3.2.2. Teste de tolerância à insulina

Após 12 h de jejum, os animais receberam injeção intraperitonal de insulina (0,75 U/mL). A concentração de glicose foi medida no sangue coletado da cauda dos animais e a glicemia foi determinada através de um glicosímetro (Accu-Chek Performa, Roche Diagnostics, EUA) em diferentes tempos após a administração da solução de glicose (0, 30, 60 e 120 minutos)

3.2.3. Medida do perfil lipídico

As dosagens de colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos foram realizadas ao final da décima semana de tratamento com dieta padrão ou hiperlipídica através de kits comerciais (Laborlab Produtos para Laboratório LTDA, Guarulhos, SP, Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

3.2.4. Obtenção de plaquetas lavadas

O sangue foi coletado de animais alimentados com a dieta padrão e dieta hiperlipídica da artéria abdominal na presença de anticoagulante ACD-C (citrato de sódio 12,4 mM, ácido cítrico 13 mM e glicose 11 mM) (9:1 v/v). As amostras foram centrifugadas a 600 × g por 13 minutos para obtenção do plasma rico plaquetas (PRP). 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 foi centrifugado novamente à 800 × g por 12 minutos. O sobrenadante foi desprezado. O resíduo plaquetário foi cuidadosamente ressuspenso em tampão de lavagem e novamente centrifugado à 800 × g por 12 minutos. 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 1,2x10⁸ plaquetas/mL. Ao final, foi adicionado e ajustada a concentração final de 1 mM de cloreto de cálcio à suspensão plaquetária.

3.2.5. Ensaio de adesão plaquetária

Os ensaios de adesão foram realizados como descrito previamente por BELLAVITE *et al.* (1994), com algumas modificações. Foram utilizadas placas de 96 poços de alta ligação, sendo as mesmas previamente tratadas com 50 µL de fibrinogênio (50 µg/mL em Krebs-Ringer), *overnight* à 4°C. Após 12 h, os poços foram lavados com 200 µL de solução Krebs-Ringer por duas vezes, e as ligações não específicas foram bloqueadas pela adição de 100 µL/poço de albumina de soro bovino (BSA 0,1% (p/v), 1h, à 37°C. Após esta incubação, as placas foram novamente lavadas duas vezes com 200 µL de Krebs-Ringer e secas à 37°C. Em seguida, adicionou-se aos poços 50 µL da suspensão plaquetária (com concentração de 6×10^6 plaqueta/mL) e trombina (100 mU/mL) ou ADP (50 µM) e incubados por 30 minutos à 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas por 2 vezes com 200 µL de Krebs-Ringer para que as plaquetas não aderidas fossem removidas. Os poços utilizados para a adesão das plaquetas receberam 50 µL de Krebs-Ringer e os poços reservados a curva padrão também receberam 50 µL (de concentrações crescentes da suspensão plaquetária inicial). Em seguida, foi adicionado 150 µL de fosfato de p-nitrofenil (5 mM), dissolvido em tampão citrato 0,1M pH 5,4 e Triton X-100 0,1%, e incubado à temperatura ambiente por 1h. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de NaOH 2N. A leitura da absorbância foi realizada no leitor de ELISA à 405 nm. A adesão plaquetária foi calculada pela medida da atividade da fosfatase ácida das plaquetas aderidas ao fibrinogênio, comparando-as com a curva padrão, em duplicata.

3.2.6. Ensaio de agregação plaquetária

A suspensão plaquetária de concentração ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi transferida para a cubeta de agregação contendo 400 μ L e levada ao agregômetro de 2 canais (Chrono-log Lumi-Aggregometer model 560-Ca, Havertown, PA, EUA). O aparelho foi calibrado para 0% usando a suspensão plaquetária e 100% com solução Krebs-Ringer.

Em seguida, a agregação plaquetária foi induzida utilizando-se os agonistas trombina (100 mU/mL), ADP (50 μ M) e colágeno (3 μ g/mL) em concentrações capazes de promover 100% de agregação (obtida após a obtenção de uma curva concentração-resposta).

3.2.7. Determinação de ERO por citômetria de fluxo

A determinação dos níveis de ERO em plaquetas foi realizada como descrito por Swith e Weidemann, (1993). A suspensão de plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaq/mL) foi incubada com NAC, (1 mM), PEG-catalase (1000 U/mL) ou PEG-SOD (30 μ M) por 15 minutos; logo após foi adicionado 5 μ M de 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA). A suspensão plaquetária (500 μ l) foi transferida para os tubos de citometria. As amostras foram incubados na presença e na ausência do ADP (10 μ M) por 20 min. Em seguida, a suspensão plaquetária foi centrifugada a 800 g em temperatura ambiente por 10 min. Os sobrenadantes foram desprezados e o *pellet* plaquetário ressuspenso em 500 μ L de solução de Krebs-Ringer. Uma amostra contendo somente a suspensão plaquetária, na ausência de DCFH-DA, foi utilizada como controle negativo, enquanto que o controle positivo foi realizado adicionando-se H_2O_2 (8 mM) à suspensão. A liberação de ERO foi quantificada usando um citômetro de fluxo (FACSCalibur Becton Dickinson, NJ, EUA). As plaquetas foram identificadas pelos sinais *forward and side*

scatter. Dez mil eventos específicos plaquetários foram analisados pelo citômetro. Plaquetas ativadas (ou não) foram selecionadas para não analisar os agregados plaquetários ou micropartículas.

3.2.8. Determinação dos níveis de GMPc

A determinação dos níveis de GMPc foi realizada da seguinte maneira. As plaquetas foram isoladas como descrito anteriormente e ressuspensas em Krebs-Ringer a uma concentração final de $1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL. Em seguida, as plaquetas foram incubadas à temperatura ambiente com 2 mM de IBMX (inibidor inespecífico de fosfodiesterase). Após 30 minutos, as plaquetas foram incubadas com SNP (10 μ M), SNAP (10 μ M), BAY 41-2272 (10 μ M) por 15 minutos à 37°C, incubando-se as plaquetas com solução de Krebs-Ringer (10 μ L). A incubação foi interrompida adicionando-se duas partes de etanol acidificado gelado (99%) para uma parte de suspensão plaquetária, e as amostras agitadas manualmente, com vigor, por aproximadamente 30 segundos. Em seguida, as amostras foram incubadas em gelo por 30 minutos e centrifugadas à 4000 *g*, 4°C, por 30 minutos. Os sobrenadantes das amostras foram recolhidos e guardados, sendo os precipitados lavados com 0,5 mL de etanol acidificado gelado (67%), centrifugados novamente à 14000 *g* à temperatura ambiente por 5 minutos. As amostras foram secas à 55-60°C em banho-maria, sob fluxo de nitrogênio, e estocadas à -20°C. Os níveis de GMPc foram quantificados utilizando-se Kit Cayman (Michigan, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Cada amostra, proveniente de 6×10^6 plaquetas, foi quantificada em duplicata e os resultados expressos em pmol/mL.

3.2.9. Análise estatística

Os resultados dos testes de adesão e de agregação plaquetária foram expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (E.P.M) para n (número de animais) por experimentos. Diferenças estatisticamente 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.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Ganho de peso e gordura epididimal

A Figura 1 apresenta os dados de peso corpóreo dos animais que receberam dieta hiperlipídica durante 10 semanas e seus respectivos controles alimentados com dieta padrão para roedores. Os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram um aumento de 20% no peso corporal e de 135% no peso do tecido epididimal, confirmando aumento de adiposidade visceral.

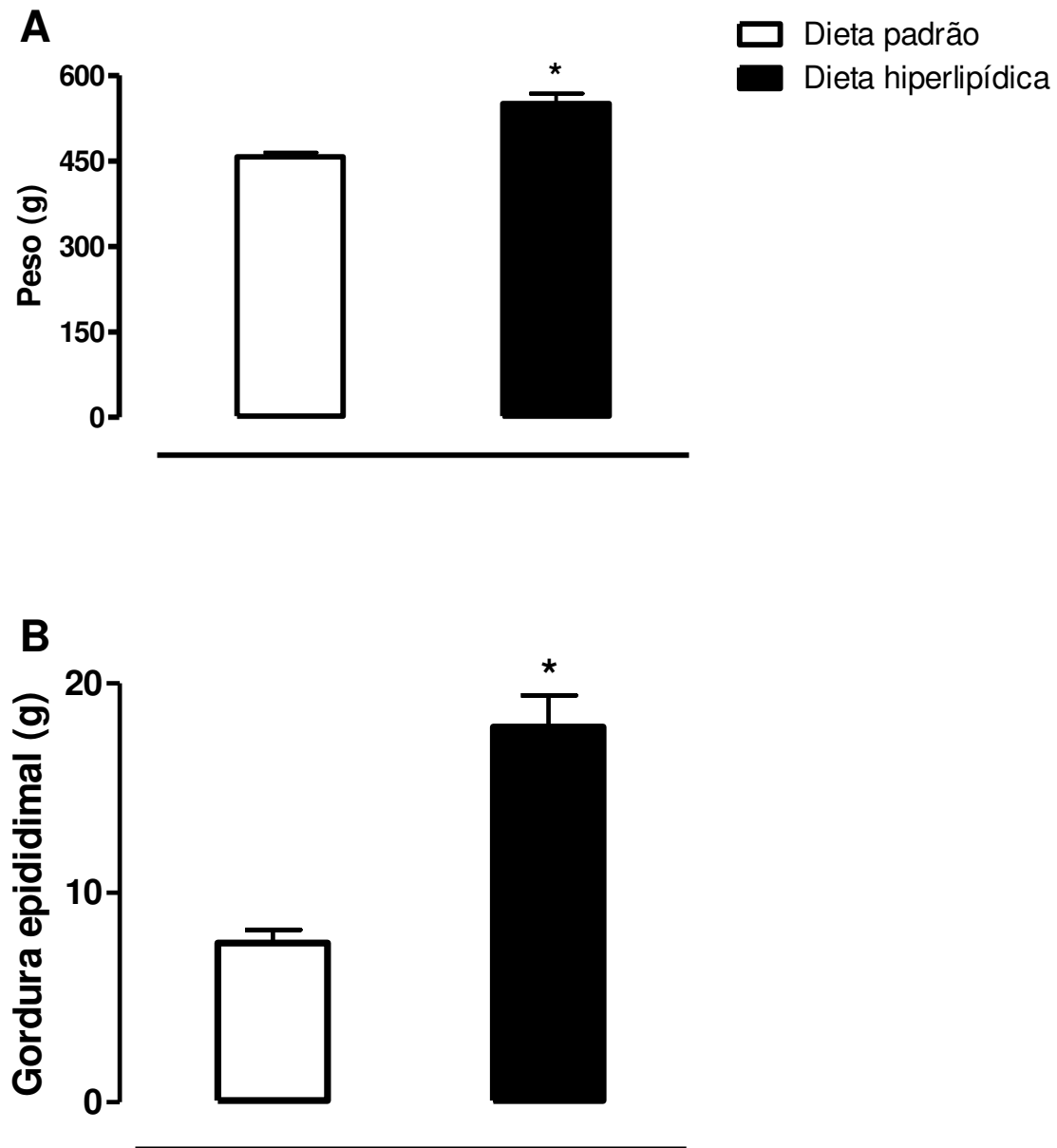


Figura 1 - Efeito da dieta hiperlipídica no peso (g) corporal (A) e gordura epididimal (B) dos ratos após 10 semanas de tratamento. Os valores representam as médias $\pm$ E.P.M de 10 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com a dieta padrão.

4.2. Perfil lipídico, curva de tolerância à glicose e resistência à insulina

A figura 2 mostra as concentrações de colesterol total, triglicerídeos (TG), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) circulantes dos dois grupos experimentais após 10 semanas de alimentação com dieta hiperlipídica e dieta padrão para roedores. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para nenhum destes parâmetros.

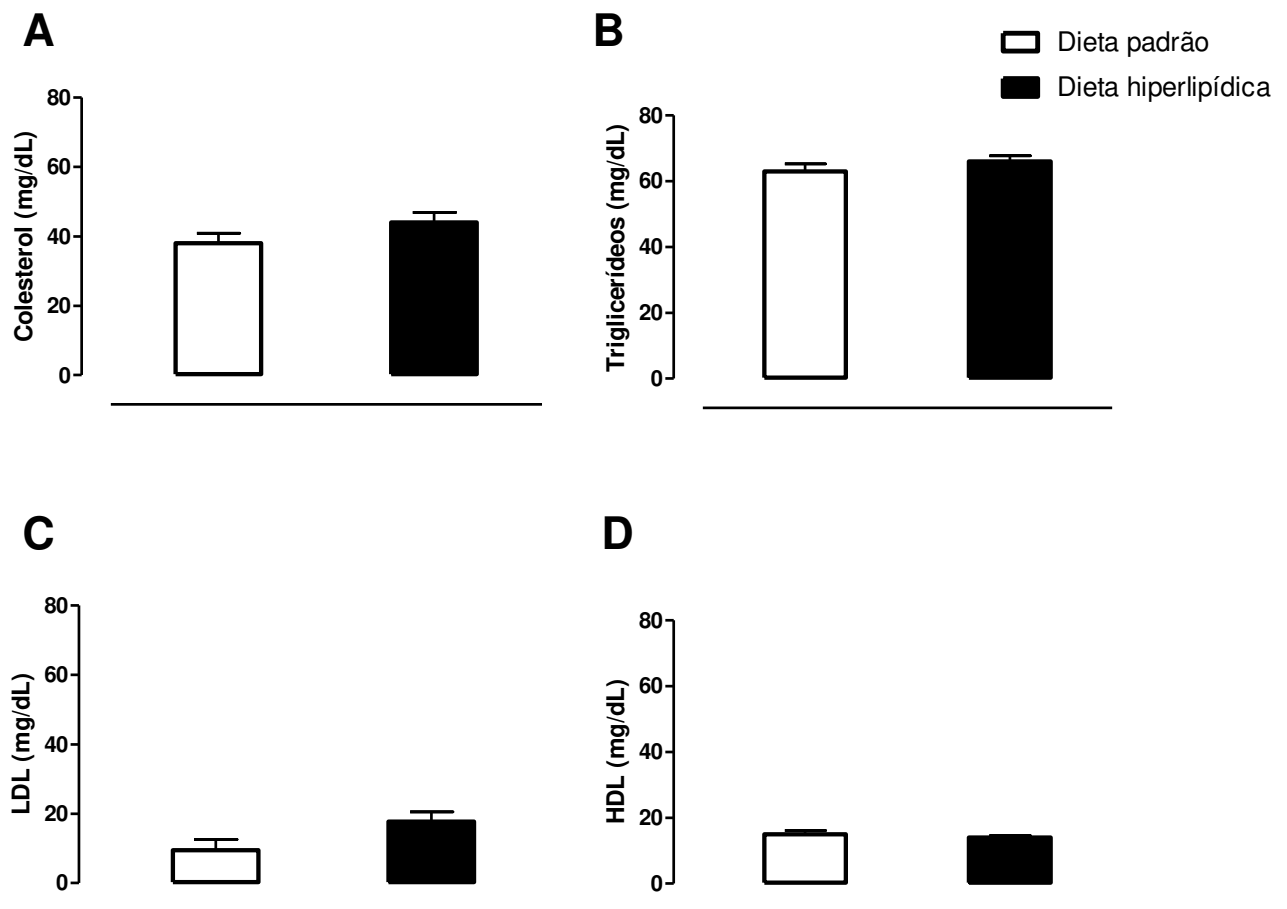


Figura 2 - Efeito da dieta hiperlipídica sobre o perfil lipídico. Os dados foram obtidos de animais dieta padrão e dieta hiperlipídica por 10 semanas. Os valores representam as médias $\pm$ E.P.M de 5 animais. Não foram observadas diferenças significativas para nenhum dos parâmetros avaliados.

Em seguida, foi realizado o teste de glicemia de jejum (Figura 3A), tolerância à glicose (Figura 3B) e de tolerância à insulina (Figura 3C). Observamos aumento significativo dos níveis de glicose de jejum no grupo dieta hiperlipídica. Após administração de glucose por gavagem, os níveis de glucose sanguínea mantiveram-se maiores no grupo dieta hiperlipídica nos tempos de 30, 60 e 120 minutos. Além, após a administração de insulina, os níveis de glicose foram maiores no grupo dieta hiperlipídica em todos os tempos analisados.

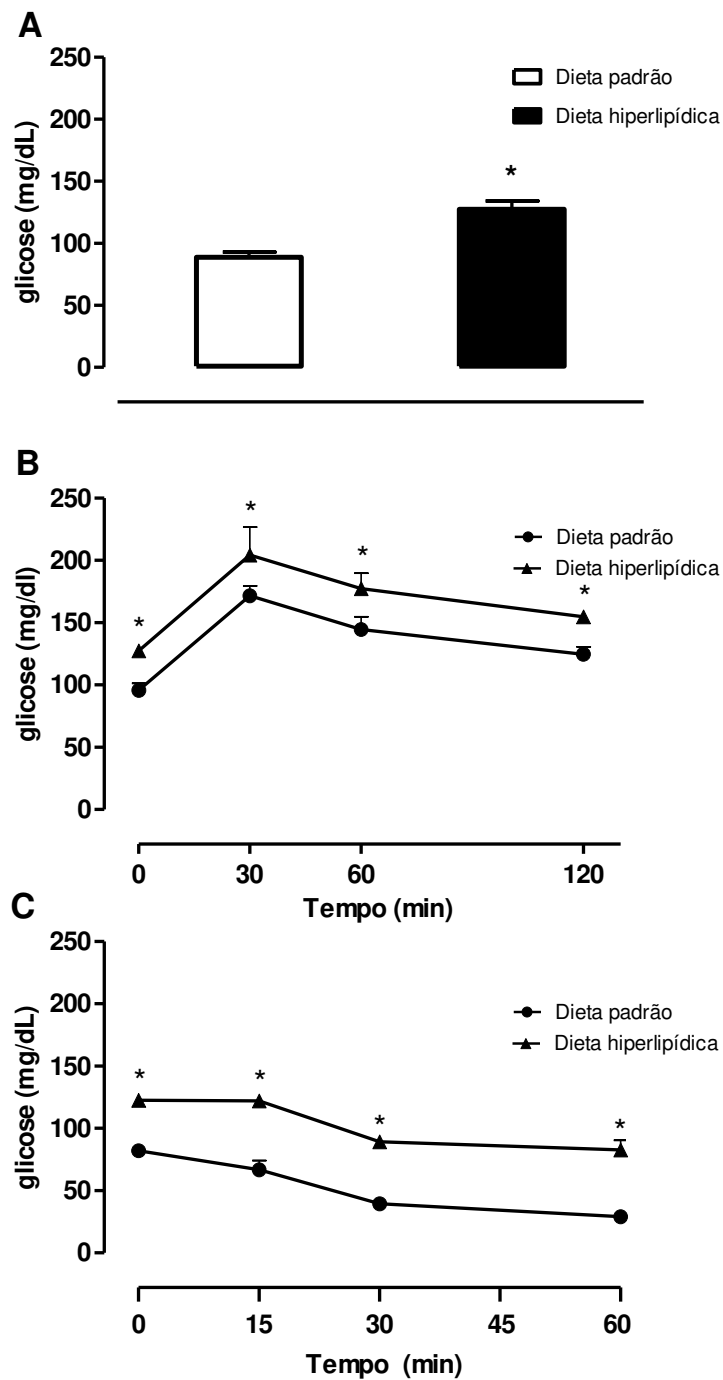


Figura 3 – Glicemia de jejum (A), curva de tolerância à glicose (B) e teste de tolerância à insulina (C) após 10 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica. Os valores representam as médias $\pm$ E.P.M de 8-10 animais. * $p < 0,05$ comparado com o respectivo tempo do grupo dieta padrão.

4.3. Adesão plaquetária estimulada com ADP e trombina ao fibrinogênio imobilizado

A Figura 4 mostra que a adesão basal não foi afetada pela dieta hiperlipídica; porém, quando as plaquetas foram estimuladas com ADP ou trombina, notou-se adesão significativamente maior no grupo dieta hiperlipídica em relação à dieta padrão.

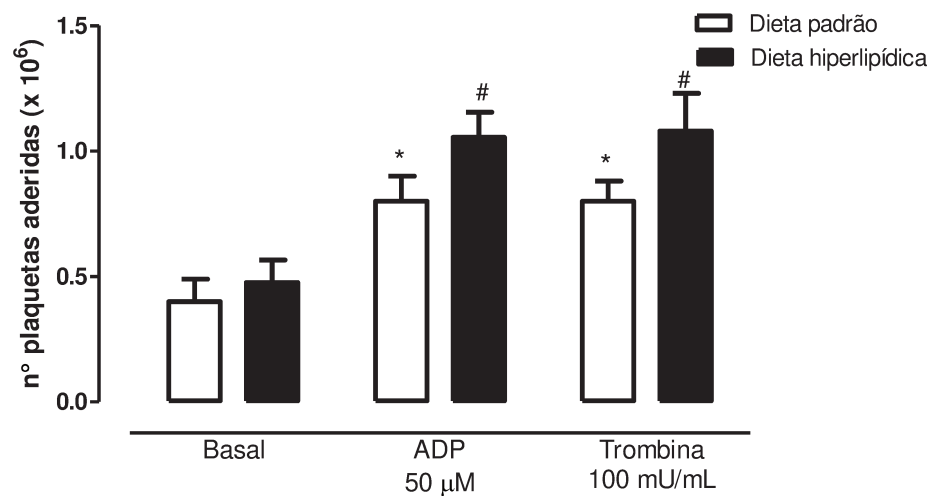


Figura 4 – Adesão plaquetária ao fibrinogênio imobilizado (basal) e estimulada por ADP (10 μ M) ou trombina (100 U/ml) para os animais tratados com dieta padrão e dieta hiperlipídica por 10 semanas. Plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foram submetidas ao ensaio de adesão *ex vivo*. Os valores representam as médias $\pm$ EPM de 4-5 animais. * $p < 0,05$ comparado com o respectivo basal; # $p < 0,05$ comparado com dieta padrão.

4.4. Agregação plaquetária estimulada com colágeno, ADP e trombina

A Figura 5 mostra um aumento significativo da agregação plaquetária induzida pelo colágeno, trombina e ADP nos animais tratados com dieta hiperlipídica quando comparados com o grupo dieta padrão.

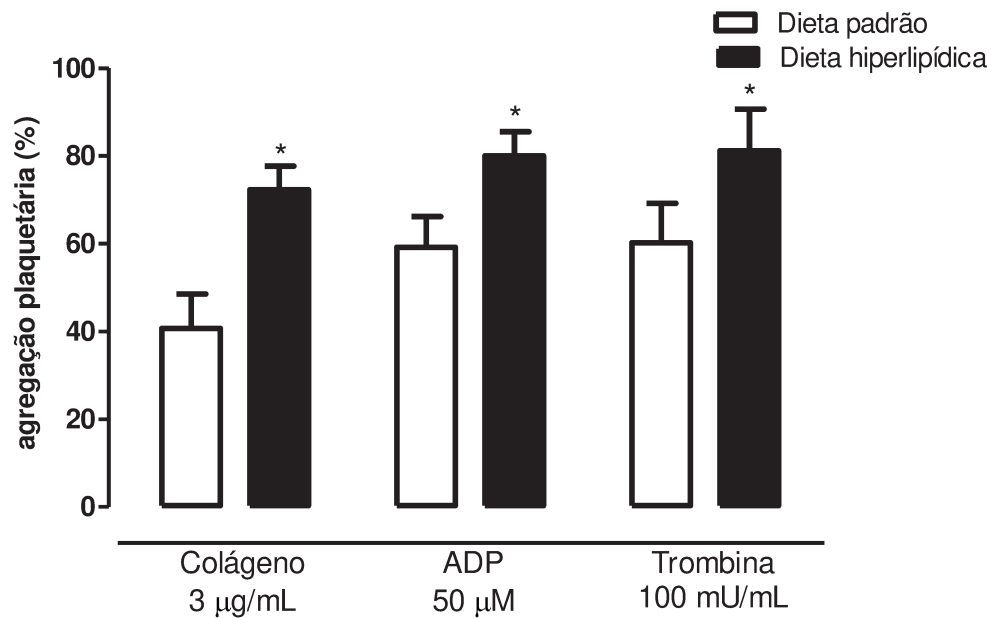


Figura 5 – Agregação plaquetária de plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) estimuladas com colágeno (n=5), ADP (n=15) ou trombina (n=15) em ratos tratados por 10 semanas com dieta padrão ou dieta hiperlipídica. Os valores representam as médias $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ comparado com o grupo dieta padrão.

4.5. Efeito do antioxidante NAC na agregação plaquetária

A Figura 6 mostra os dados obtidos da pré-incubação das plaquetas com o antioxidante NAC (1 mM, 3 minutos). Não houve diferença significativa da agregação plaquetária na presença da trombina ou ADP nos animais do grupo dieta padrão. Entretanto, o NAC foi capaz de prevenir a hiperagregabilidade plaquetária da trombina e ADP para os animais do grupo dieta hiperlipídica.

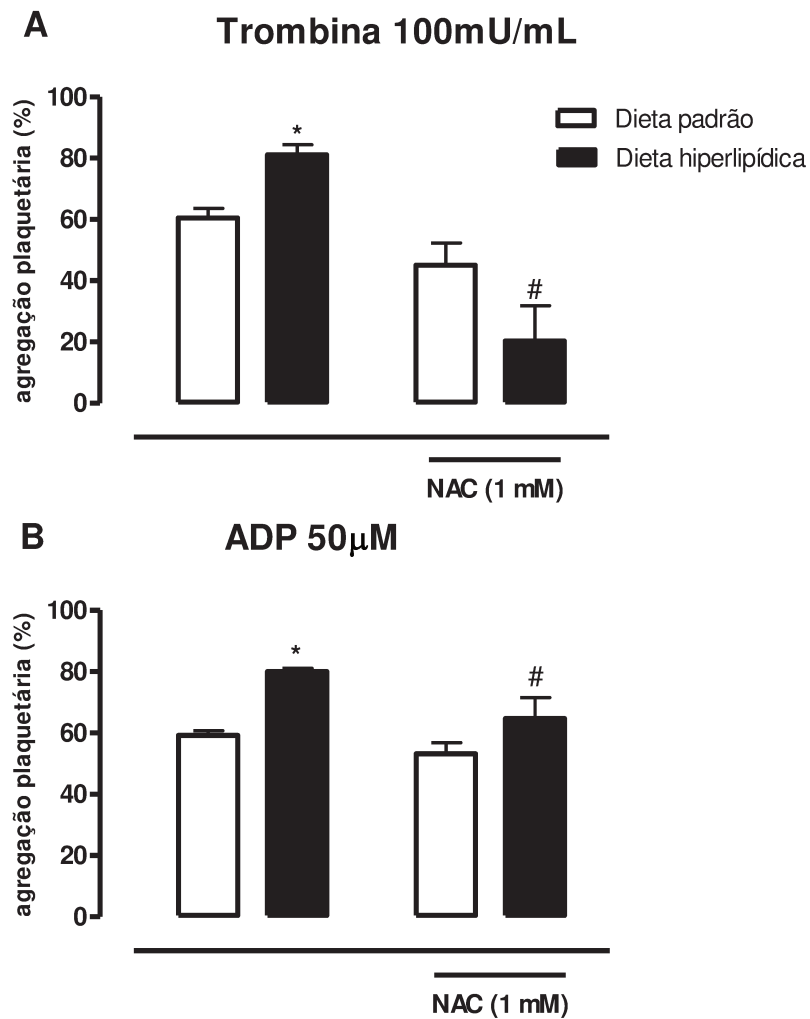


Figura 6 – Efeito do antioxidante N-acetilcisteína (NAC; 1 mM) na agregação plaquetária induzida por trombina (100 mU/mL; A) e ADP (50 µM; B). Plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foram obtidas de ratos após 10 semanas de tratamento com dieta padrão ou dieta hiperlipídica. Os valores representam as médias $\pm$ EPM de 4-7 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo dieta padrão, # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo dieta hiperlipídica na ausência de NAC.

4.6. Efeito do antioxidante PEG-catalase na agregação plaquetária

A pré-incubação das plaquetas com PEG-Catalase (1000 U/mL, 3 minutos) não alterou de modo significativo a agregação plaquetária induzida por trombina ou ADP nos animais tratados com a dieta padrão. No grupo dieta hiperlipídica, este antioxidante foi capaz de prevenir a hiperagregabilidade plaquetária (Figura 7).

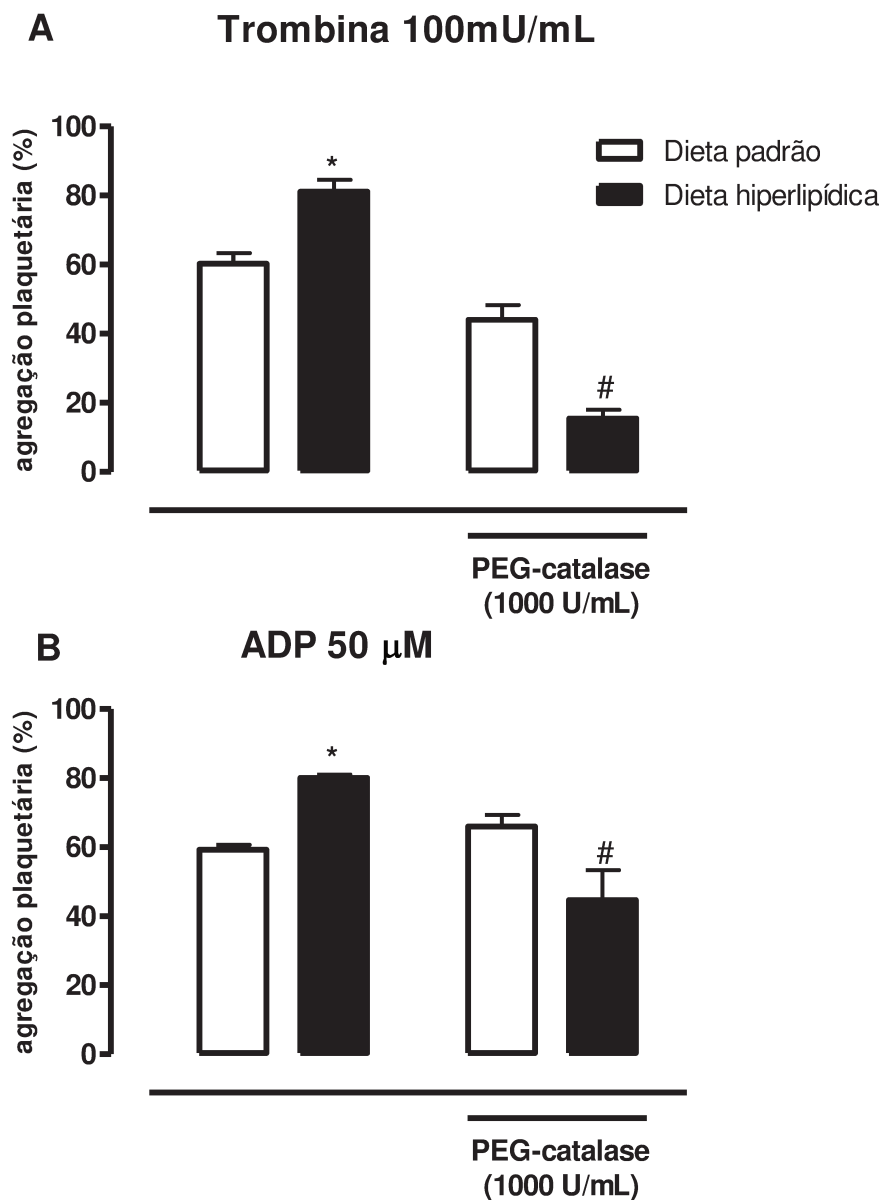


Figura 7 – Efeito da PEG-catalase (1000 U/mL) na agregação plaquetária induzida por trombina (100 μ m/mL; A) e ADP (50 μ M; B). Plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foram obtidas de ratos após 10 semanas de tratamento com dieta padrão ou dieta hiperlipídica. Os valores representam as médias $\pm$ EPM de 4-7 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo dieta padrão; # $p < 0,05$ quando comparado com dieta hiperlipídica na ausência de PEG-catalase.

4.7. Efeito do antioxidante PEG-SOD na agregação plaquetária

O antioxidante PEG-SOD (30 U/mL, 3 minutos) não alterou a agregação plaquetária induzida por ADP nos animais tratados com a dieta padrão, mas reduziu significativamente a hiperagregabilidade plaquetária nos animais do grupo dieta hiperlipídica (Figura 8).

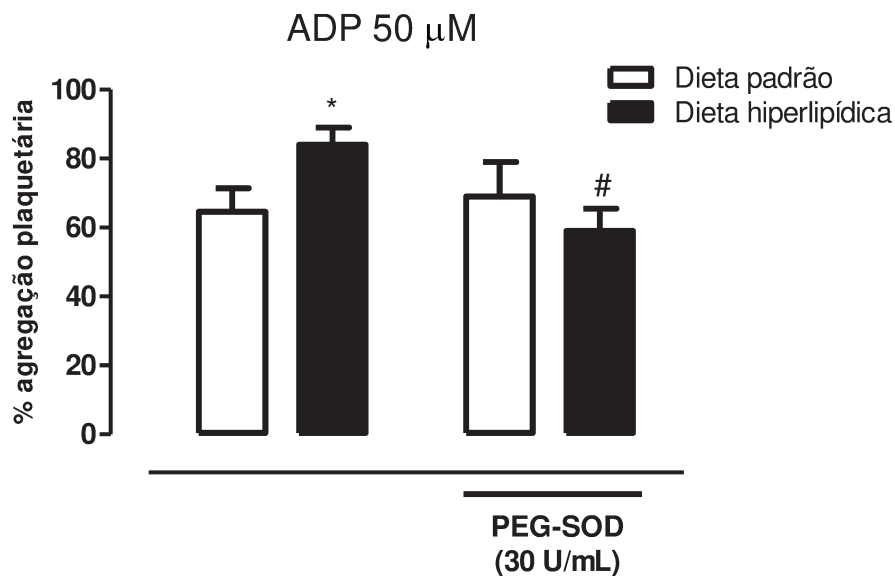


Figura 8 – Efeito da PEG-SOD (30 U/mL) na agregação plaquetária induzida por ADP (50 µM). Plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foram obtidas de ratos após 10 semanas de tratamento com dieta padrão ou dieta hiperlipídica. Os valores representam as médias $\pm$ EPM (n=6). * $p < 0,05$ comparado com o grupo dieta padrão; # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo dieta hiperlipídica na ausência de PEG-SOD.

4.8. Produção de ERO em plaquetas lavadas

A Figura 9 mostra os dados da produção de ERO em plaquetas lavadas de animais tratados com as dietas padrão e hiperlipídica, o qual está representada pelo índice de fluorescência média (MFI). A produção basal de ERO não foi afetada entre os grupos dieta padrão e dieta hiperlipídica. No grupo tratado com a dieta padrão, a ativação das plaquetas por ADP (10 μ M) não alterou significativamente a produção de ERO. No grupo da dieta hiperlipídica, houve um aumento de 54%, ($p<0.001$) na produção de ERO após a ativação com ADP. Neste mesmo grupo, a pré-incubação das plaquetas com NAC (1 mM), PEG-catalase (1000 U/mL) e PEG-SOD (30 U/mL) por 15 minutos reverteu o aumento da produção de ERO.

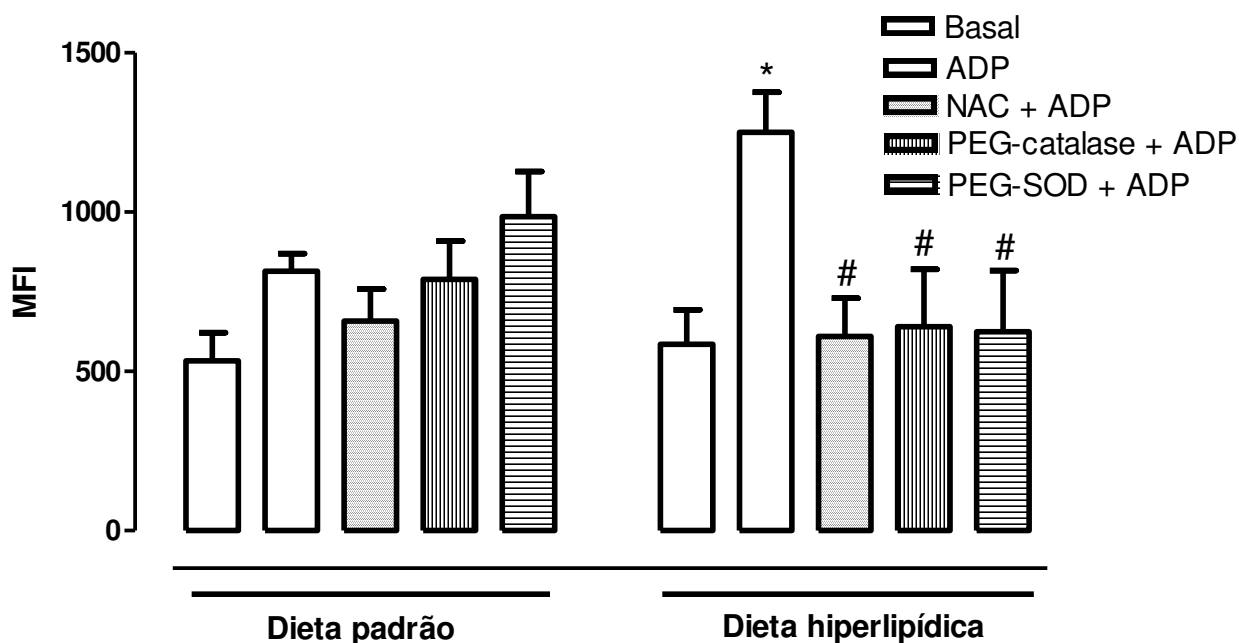


Figura 9 – Efeito da dieta hiperlipídica na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) intraplaquetárias. Os animais foram alimentados com a dieta padrão ou hiperlipídica durante 10 semanas. Plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foram pré-incubadas com N-acetilcisteína (NAC, 1 mM, 15 minutos), PEG-catalase (1000 U/mL, 15 minutos) ou PEG-SOD (30 U/mL, 15 minutos). Em seguida, foram estimuladas com ADP (10 μ M). A produção de ERO foi quantificada através da citometria de fluxo utilizando-se DCFH-DA. Os resultados estão apresentados como médias $\pm$ EPM ($n = 6$). * $p < 0,05$ comparado com o grupo dieta padrão; # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo dieta hiperlipídica não tratado.

4.9. Efeito do nitropussiato de sódio (SNP), S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) e BAY 41-2271 na agregação plaquetária e nos níveis intracelulares de GMPc

A agregação plaquetária induzida por ADP dos animais alimentados com dieta padrão foi reduzida marcadamente após a pré-incubação com os doadores de NO (SNP e SNAP) e com o estimulador de GCs independente de NO, o BAY 41-2272 (Figura 10A). A redução da agregação causada pelo SNP, SNAP e o BAY 41-2272 foi acompanhada por aumento de 7, 7,6 e 12,3 vezes nos níveis de GMPc intracelular, respectivamente (Figura 10B).

No grupo de animais alimentados com a dieta hiperlipídica, a inibição da agregação plaquetária por SNP, SNAP e BAY 41-2272 foi significativamente menor quando comparamos com a dieta padrão. A pré-incubação com SNP e SNAP não aumentou significativamente os níveis de GMPc. O BAY41-2272 promoveu um aumento significativo de GMPc, mas este efeito foi menor quando comparado ao grupo da dieta padrão (Figura 10B).

A incubação das plaquetas com ODQ (10 μ M, 10 minutos), inibidor da GCs, preveniu os efeitos antiplaquetários SNP, SNAP e BAY 41-2272 (10 μ M cada) e aboliu o aumento dos níveis de GMPc, como esperado.

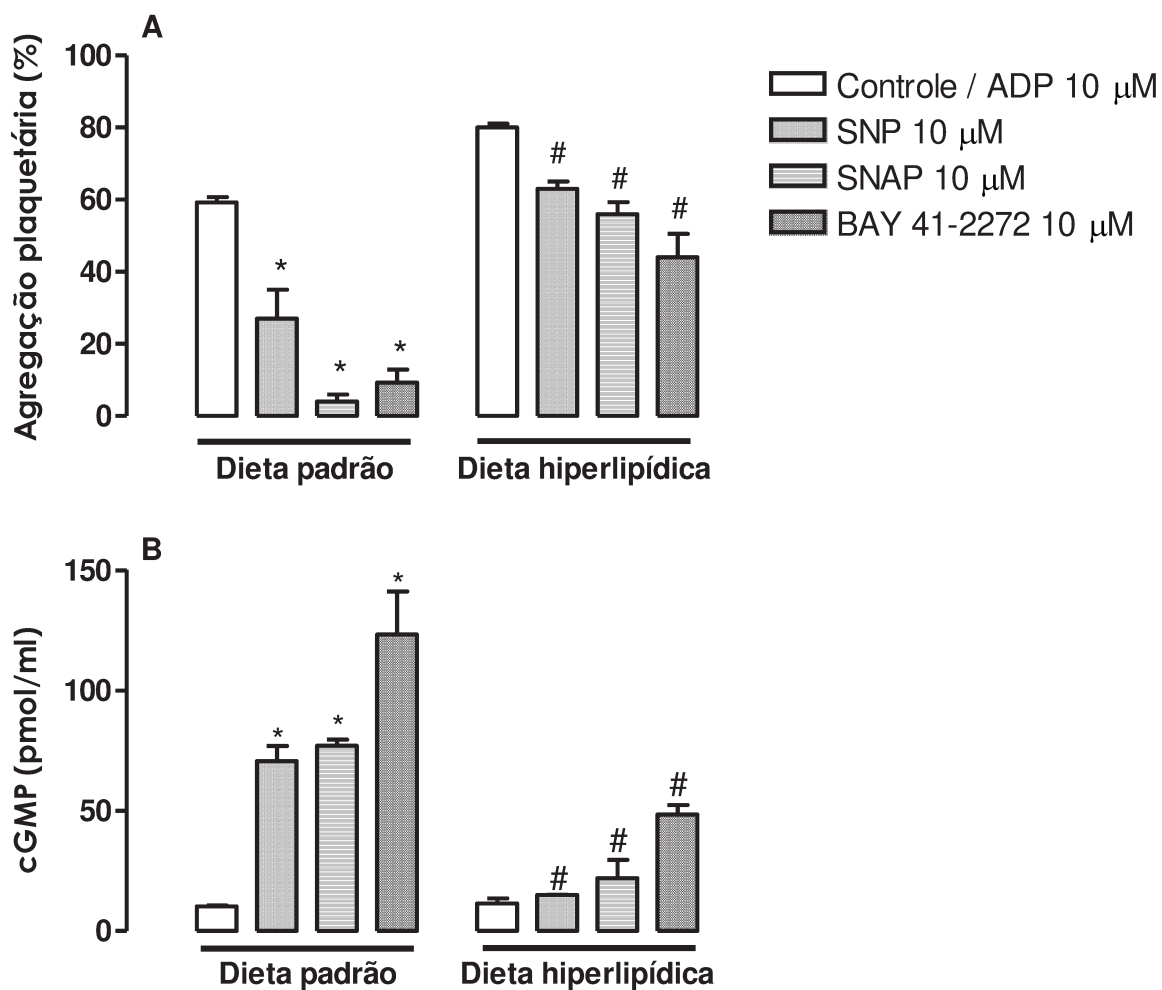


Figura 10 – Efeito do SNP, SNAP e BAY 41-2271 na agregação plaquetária (painel A) e produção de GMP cíclico (painel B) de ratos alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica durante 10 semanas. Plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foram pré-incubadas com SNP (10 μ M), SNAP (10 μ M) e BAY 41-2271 (10 μ M). Em seguida, foram ativadas com ADP (10 μ M). Os resultados são apresentados como médias $\pm$ EPM de $n = 4-7$. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle; # $p < 0,05$ comparado com o respectivo agente no grupo controle.

4.10. Efeito do iloprost na agregação plaquetária

A Tabela 2 mostra o efeito do pré-tratamento de plaquetas com iloprost (1 μ M, 3 minutos), análogo estável da prostaciclina e ativador da via de sinalização da AMPc/PKA. A pré-incubação com iloprost diminuiu significativamente a agregação plaquetária induzida por ADP em ambos os grupos experimentais, não havendo diferenças entre os mesmos.

Tabela 2- Efeito de Iloprost (1 μ M) na agregação plaquetária induzida por ADP (50 μ M).

	Dieta Padrão	Dieta Hiperlipídica
Controle	54,2 $\pm$ 2,9 %	70,7 $\pm$ 4,9 % [#]
Iloprost	5,5 $\pm$ 1,5 % [*]	5,7 $\pm$ 2,2 % [*]

Os animais foram tratados por 10 semanas com a dieta padrão ou dieta hiperlipídica (n=4).

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle. [#] $p < 0,05$ comparado com o respectivo grupo da dieta padrão.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A reatividade plaquetária desempenha papel fundamental na patogênese da aterotrombose em quadros de obesidade, diabetes do tipo 2 e síndrome metabólica. As disfunções plaquetárias incluem ativação plaquetária com aumento da adesão e agregação. Modificação da sensibilidade a agonistas fisiológicos também são descritos em pacientes obesos (Anfossi *et al.*, 2009; Santilli *et al.*, 2011).

Nossos resultados mostram que a dieta hiperlipídica em ratos por 10 semanas é capaz de produzir um aumento significativo do ganho ponderal e da adiposidade visceral, além de um desequilíbrio no metabolismo da glicose. Os animais alimentados com a dieta hiperlipídica apresentaram hiperreatividade plaquetária (adesão e agregação) em resposta ao ADP e trombina, que foi acompanhada por aumento na produção de ERO. A hiperreatividade plaquetária foi prevenida pelos compostos antioxidantes, PEG-catalase e NAC, confirmando o papel crucial das ERO nos animais tratados com dieta hiperlipídica. Além disso, os doadores de NO (SNAP e SNP) e o estimulador da GCs (BAY 41-2272) foram menos eficazes em inibir a agregação de plaquetas dos animais alimentados com a dieta hiperlipídica, possivelmente como consequência da redução da produção intraplaquetária de GMPc.

Os animais do grupo dieta hiperlipídica apresentaram hiperglicemia de jejum, intolerância à glicose e menor sensibilidade à insulina. Segundo DeFronzo e Ferrannini (1991), no início do desenvolvimento da resistência à insulina, as células β do pâncreas são capazes de aumentar a secreção de insulina e, conseqüentemente, manter a glicemia normal ou discretamente aumentada. No entanto, a secreção de insulina não é permanentemente mantida em excesso, e, assim, o indivíduo pode evoluir para

intolerância à glicose ou mesmo para o diabetes. Os efeitos da dieta hiperlipídica sobre os níveis de glicose sanguínea em animais estão descritos na literatura de forma discrepante, variando de normo-glicemia, discreta hiperglicemia e até desenvolvimento do diabetes do tipo 2 (Buettner *et al.*, 2007).

Evidências mostram que a hiperglicemia persistente pode ativar vias do metabolismo da glicose, que resulta na formação de produtos deletérios derivados de alterações da estrutura de proteínas ou de lipídios que são chamados de produtos finais da glicação avançada (AGEs, do inglês, *Advanced Glycation End-products*), os quais podem afetar profundamente o funcionamento do sistema cardiovascular. No sistema cardiovascular, a interação de AGEs com seus receptores (RAGE) ativa vias complexas da sinalização elevando a produção de mediadores inflamatórios e/ou produção de ERO, os quais podem levar à diminuição na biodisponibilidade de NO e à disfunção endotelial, assim como alterações no sistema de coagulação. Em tecidos cardíacos, as ERO induzidas pela hiperglicemia ativa a via da MEK/ERK aumentando a fosforilação GATA-4 que leva à hipertrofia cardíaca. A hiperglicemia também está associada à desregulação da inervação simpática do tecido miocárdico. É plausível que o mecanismo pelo qual a adiposidade induzida por dieta hiperlipídica causa disfunção plaquetária pode estar associado à hiperglicemia, que é condizente com nossos dados de intolerância à glicose e diminuição da sensibilidade à insulina (Buettner *et al.*, 2007).

De fato, estudos prévios mostraram que a hiperglicemia aguda aumenta a agregação plaquetária induzida pelo colágeno devido ao aumento da produção de O_2^- mitocondrial (Yamagishi *et al.*, 2001). A hiperglicemia aguda, após um teste oral de tolerância à glicose ou uma refeição rica em carboidratos, também promove a ativação plaquetária *in vivo* (Yngen *et al.*, 2001; 2006).

Radicais derivados de oxigênio representam a fonte mais importante de ERO no organismo. O anion superóxido (O_2^-) é considerado a principal ERO, podendo interagir diretamente com outras moléculas, ou indiretamente através de processos catalisados por enzimas ou metais, gerando outras ERO relevantes, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxila ($^{\cdot}OH$) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (Gresele *et al.*, 2011).

A adiposidade em humanos está relacionada a risco elevado para aterotrombose, devido em parte, ao aumento do estresse oxidativo, o qual pode ser avaliada pela medida de biomarcadores sistêmicos, como peroxidação lipídica, e produção de TNF- α , ácidos graxos livres e LDL oxidada. As plaquetas podem gerar O_2^- de fontes como NADPH oxidase, xantina oxidase e derivados de ácido araquidônico. No entanto, a contribuição de excesso de ERO intraplaquetária para a hiperreatividade plaquetária no estado obeso não tem sido explorado. Por isso, avaliamos inicialmente a adesão e agregação plaquetária *ex-vivo* em ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Confirmando a hiperreatividade plaquetária nos animais tratados com dieta hiperlipídica, passamos a investigar o papel das ERO intraplaquetárias para o desencadeamento da mesma. Os nossos dados mostraram que a adesão e agregação plaquetária induzida por ADP, trombina e/ou colágeno foram significativamente maiores no grupo alimentado com dieta hiperlipídica, o qual foi acompanhada por níveis elevados de ERO (avaliado pelo ensaio de fluorescência utilizando-se o marcador DCFH). Além disso, a incubação prévia de plaquetas com os seqüestradores de ERO, PEG-catalase ou NAC, suprimiu tanto a produção excessiva de ERO e a hiperagregabilidade em ratos alimentados com a dieta hiperlipídica. De modo geral, nossos dados sugerem que a hiperagregabilidade plaquetária *ex vivo* em ratos da dieta hiperlipídica está intimamente ligada com a maior produção de ERO intraplaquetária. Um estudo recente mostrou que a NAC reduz

significativamente a agregação plaquetária induzida pela trombina e ADP no sangue total de doentes diabéticos tipo 2 (Gibson *et al.*, 2011).

O aumento do estresse oxidativo pode também influenciar a função das plaquetas, devido à diminuição da biodisponibilidade de NO (Anfossi *et al.* 2009). O NO é uma ERO envolvida em várias funções biológicas essenciais para o sistema cardiovascular e função plaquetária. A superfície íntima do endotélio vascular em condições fisiológicas é anticoagulante e antitrombótica. A interação das plaquetas com as células endoteliais em locais de dano endotelial assegura a secreção de mediadores, como o NO, que previnem a agregação e adesão e a formação intravascular do trombo. O papel do NO na inibição plaquetária mediante geração de GMPc já foi bem elucidado. Estudos mais recentes investigam outros mecanismos de ação dessa molécula mecanismos, independentes de GMPc.

Em nosso estudo, a agregação plaquetária induzida pelo ADP foi marcadamente reduzida pelos doadores de NO (SNP e SNAP) em ratos alimentados com dieta padrão, sendo este fenômeno acompanhado por elevações significativas nos níveis intraplaquetários de GMPc. É interessante notar que nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, as plaquetas foram resistentes às elevações de GMPc em resposta ao SNP e SNAP, bem como às ações inibitórias destes agentes sobre a agregação plaquetária. É provável que o excesso de produção de O_2^- nas plaquetas de animais da dieta hiperlipídica inative o NO (derivado do SNP e SNAP). Isto corrobora estudos realizados em indivíduos obesos e obesos-diabéticos do tipo 2 obesos os quais apresentam plaquetas resistentes ao nitrato de gliceril e SNP (Anfossi *et al.*, 1998; Anfossi *et al.*, 2004).

A GCs é uma enzima de transdução de sinal amplamente distribuída no organismo que, sob ativação por NO, converte o GTP em GMPc. Este segundo mensageiro ativa diversos alvos diretos como proteínas quinases, canais regulados por nucleotídeos cíclicos e fosfodiesterases (Francis *et al.*, 2010). Um dos pré-requisitos essenciais para ativação da GCs em resposta ao NO é a presença do grupamento heme reduzido onde sua oxidação (ou sua perda) torna a enzima insensível ao NO. Ativadores da GCs independentes de NO têm merecido destaque como ferramentas valiosas para elucidar a fisiopatologia da via de sinalização do NO-GCs-GMPc (Stasch *et al.*, 2009). O composto BAY 41-2272 foi descrito como um estimulador potente da GCs, heme-dependente e independente de NO (Stasch *et al.*, 2001). Este composto estimula diretamente a GCs e aumenta a sensibilidade da enzima ao NO, produzindo quantidades expressivas de GMPc (Stasch *et al.*, 2002; Evgenov *et al.*, 2006). Através deste mecanismo, o BAY 41-2272 produz uma variedade de efeitos, incluindo efeitos anti-agregantes plaquetários. E nosso estudo, o BAY 41-2272 elevou significativamente os níveis de GMPc e reduziu marcadamente a agregação plaquetária nos animais da dieta padrão, como esperado. Porém, o aumento de GMPc e a inibição da agregação nos animais alimentados com dieta hiperlipídica foram significativamente menores, sugerindo que a GCs das plaquetas dos animais obesos apresenta “defeito” na produção de GMPc. Em plaquetas de ratos, em condições fisiológicas, a inibição da agregação plaquetária pelo BAY 41-2272 requer a forma reduzida da GCs e a presença de NO (Roger *et al.*, 2010). Além disso, o radical livre, ONOO⁻, é capaz de oxidar o grupo prostético heme da GCs para seu estado Fe³⁺ insensível ao NO (Gladwin, 2006; Stasch *et al.*, 2006; Chirkov *et al.*, 2007). Se este fenômeno ocorre nas plaquetas dos animais alimentados com dieta hiperlipídica, é de fato esperado que o BAY 41-2272

seja menos efetivo na ativação da GCs. Portanto, seria interessante testar ativadores de GCs heme-independentes, como o HMR1766 e o BAY 58-2667. Estes compostos previnem a degradação induzida por oxidação da GCs em linhagem de células do ovário de hamster e células endoteliais porcinas (Hoffmann *et al.*, 2009). Curiosamente, o ativador direto da GCs, HMR1766, aumenta a sinalização mediada pela NO/GMPc em plaquetas de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, reduzindo os agregados plaquetários (Schäfer *et al.*, 2006).

Além das vias NO/GMPc/PDE5, a ativação de plaquetas é inibida por agentes indutores de AMPc (Noé *et al.*, 2010). A elevação dos níveis de AMPc intracelular pode ser alcançada diretamente através da ativação da adenilato ciclase ou através de receptores de membrana. No nosso estudo, o pré-tratamento das plaquetas com o iloprost, análogo estável da prostaciclina, suprimiu a agregação induzida por ADP, tanto no grupo dieta padrão quanto no grupo dieta hiperlipídica. Isto exclui a hipótese de que a hiperagregabilidade observada nos animais obesos pode estar relacionada a alterações na via de sinalização do AMPc.

Nossos resultados mostram claramente que as anormalidades metabólicas como consequência da ingestão da dieta hiperlipídica em ratos causam hiperagregabilidade plaquetária com aumento na produção de ERO e diminuição da biodisponibilidade de NO acompanhada por possíveis efeitos deletérios no grupo prostético heme da GCs.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- A dieta hiperlipídica é capaz de induzir adiposidade em ratos, nos experimentos de adesão e agregação plaquetária, levando a um quadro de hiperreatividade em resposta ao ADP, trombina e colágeno; acompanhada de um aumento na produção de ERO.
- A hiperreatividade plaquetária foi prevenida por compostos antioxidantes NAC, PEG-catalase e PEG-SOD.
- Doadores de NO (SNAP e SNP) e o estimulador da GCs (BAY 41-2272) apresentaram eficácia menor em inibir a agregação de plaquetas dos animais obesos, como consequência da redução na produção de GMPc nas plaquetas desses animais
- Nossos resultados mostram claramente que as anormalidades metabólicas como consequência da ingestão da dieta hiperlipídica em ratos causam hiperagregabilidade plaquetária com aumento na produção de ERO e diminuição da biodisponibilidade de NO, acompanhada por possíveis efeitos deletérios no grupo prostético heme da GCs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, *et al.* S-glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *NatMed.*; 2004;10: 1200-7.
- Ambrosio G, Golino P, Pascucci I, Rosolowsky M, Campbell WB, DeClerk F, Tritto I, Chiariello. Modulation of platelet function by reactive oxygen metabolites. *Am J Physiol*;1994;267:14308-18.
- Anfossi G, Mularoni EM, Burzacca S, Ponziani MC, Massucco P, Mattiello L, Cavalot F, Trovati M: Platelet resistance to nitrates in obesity and obese NIDDM, and normal platelet sensitivity to both insulin and nitrates in lean NIDDM. *Diabetes Care* 1998, 21:121-126.
- Anfossi G, Russo I, Massucco P, Mattiello L, Doronzo G, De Salve A, Trovati M: Impaired synthesis and action of antiaggregating cyclic nucleotides in platelets from obese subjects: possible role in platelet hyperactivation in obesity. *Eur J Clin Invest* 2004, 34:482-489.
- Anfossi G, Russo I, Trovati M: Platelet dysfunction in central obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009, 19:440-449.
- Atkuri KR, Mantova JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA.2 N-Acetylcysteine – A Safe Antidote for Cysteine/Glutathione Deficiency. *Curr Opin Pharmacol.*2007; 7(4):355-9.
- Bayir H.2005 Reactive Oxygen Species. *Crit Care Med*;33(12):s498-501.
- Belisario MA, Tafuri S, Di Domenico C, Squillacioti C, Della Morte R, Lucisano A, Staiano N.H(2)O(2) activity on platelet adhesion to fibrinogen and protein tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* ;2000;1495(2):183-93.
- Berger MM, Chioléro RL. Antioxidant Supplementation in Sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Crit Care Med.*35(9 suppl):2007;s584-90.
- Bhattacharyya J, Biswas S, Datta AG. Mode of action of endotoxin: role of free radicals and antioxidants. *Curr. Med. Chem.* 2004; 11:359-368.

- Brown DI, Griendling KK. NOX Proteins in Signal Transduction. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47(9):1239-53.
- Buechler WA, Nakane M, Murad F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,1994; 174: 351-357.
- Buettner, R, Scolmerich, J, Bollheimer, C. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. *Obesity* 2007; 15:798-808.
- Cadenas, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors.* 1997; 6: 391-397.
- Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidase as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24: 471-8
- Chirkov YY, Horowitz JD: Impaired tissue responsiveness to organic nitrates and nitric oxide: a new therapeutic frontier? *Pharmacol Ther* 2007, 116:287-305.
- Clark RA, Klebanoff SJ. Neutrophil-platelet interaction mediated by myeloperoxidase and hydrogen peroxide. *J Immunol* 1980;124:399-405.
- Collier J, Vallance P. Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. *Trends Pharmacol. Sci.*,1999; 10: 427-431.
- Dusting GJ, Selemidis S, Jian F. Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 100 (suppl.I) 98-103.
- Egbrink, O. *et al.* Regulation of vascular thromboembolism in vivo. *Microcirculation*, v.12, n.3, p. 287-300,2005.
- Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Haskó G, Schmidt HH, Stasch JPN: NO independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5:755-678.
- Feldman PL, Griffith OW, Hong H & Stuehr DJ Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. *J. Med. Chem.*, 1993 36: 491-496.

- Freedman JE. Oxidative Stress and Platelets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008; 28: s11-s16.
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D: cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* 2010, 62:525-63.
- Friedman, J. M. . "Obesity in the new millennium." *Nature* , 2004;404(6778): 632-4.
- Fukuto JM, Chaudhuri G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*,1995; 35: 165-
- Garthwaite J. Neural nitric oxide signalling. *Trends Neurosci.*,1995; 18: 51-52.
- Gerzer R, Radany EW, Garbers DL. The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,1992 108: 678-686.
- Gibson KR, Winterburn TJ, Barrett F, Sharma S, MacRury SM, Megson IL: Therapeutic potential of N-acetylcysteine as an antiplatelet agent in patients with type-2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2011, 10:43-51.
- Giordano FJ.. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest.*,2005 115(3):500-8.
- Gladwin MT: Deconstructing endothelial dysfunction: soluble guanylyl cyclase oxidation and the NO resistance syndrome. *J Clin Invest* 2006, 116:2330-2332.
- Gresele P, Cerletti C, Guglielmini G, Pignatelli P, de Gaetano G, Violi F: Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *J Nutr Biochem* 2011, 22:201-211.
- Gutteridge JM, Mitchell J. Redox Imbalance in the Critically. *Br Med Bull.*1999;55(1):49-75. *Br Med Bull.*1999;55(1):49-75. 55
- Harteneck C, Koesling D, Soling A, Schultz G, Bohme E. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett.*,1990; **272**: 221-223.
- Hartwig, J., Italiano JR., J.E. The birth of the platelet. *J Tromb Haemost*, v.I, p. 1580-6, 2003

- Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1997;18: 484-491.
- Hoffmann LS, Schmidt PM, Keim Y, Schaefer S, Schmidt HH, Stasch JP: Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation. *Br J Pharmacol* 2009, 157:781-795.
- Holmsen H, Weiss HJ. Secretable pools in platelets. *Annu. Ver. Med.* 1979; 30: 119-3
- Ignarro LJ, Degnan JN, Baricos WH, Kadowitz PJ, Wolin MS . Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982 718: 49-59.
- Ignarro LJ, Murad F (eds), *Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications*. Advances in Pharmacology, Volume 34, pp. 1-516, Academic Press, 1995.
- Iuliano L, Colavita AR, Leo R, Pratico D, Violi F. Oxygen free radicals and platelets activation. *Free Radical Biol Med* 1997;22:999-1006
- Junior JALS, David CM et al. Sepsis Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepsis em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. *RBTI*. 2006; 18(1): 9-17.
- Harker L. Platelet survival time: its measurement and use. *Prog Hemost Thromb* 1978;4:321-26.
- Kerwin JF JR, Lancaster JR, Feldman PL. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J. Med. Chem.*, 1995; 38: 4343-4362.
- Klinger MH. Platelets and inflammation. *Anat Embryol (Berl)*. 1997; 196:1-11.
- Koesling D, Bohme E, Schultz G. Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *FASEB J*, 1991; 5: 2785-2791.
- Kopelman, P. G. "Obesity as a medical problem." *Nature* 2000; 404(6778): 635-43.

- Kovacic P, Pozzos RS, Somanathan R, Shangari N, O'Brien PJ. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free 53 radicals, and structure-activity relationships. *Curr. Med. Chem.* 2005; 12: 2601-2623.
- Krötz, F, Sohn HY, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele T M, Becker B F, Theisen K, Klauss V, Pohl U. NAD(P)H-oxidase-dependent platelet superoxide anion
- Kulbacka J, Saczko J, Chwilkowska A. Oxidative Stress in Cells Damage Processes. *Pol Merkur Lekarski*.2009;27(157):44-7.
- Lehninger AL, Nelson DL, Coxx MM. Lehninger Princípios da Bioquímica. In: Lehninger AL. 3ªEd. São Paulo. Savier, 2000:973.
- Liochev PS, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle-70 years later: An alternative view. *Redox Rep.* 2002; 7: 55-7.
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP & Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. 52 Rev.*; 375-414.
- Marcondes S, Cardoso MHM, Morganti RP, Thomazzi SM, Lilla S, Murad F, De Nucci G, Antunes E. Cyclic GMP-independent mechanisms contribute to the inhibition of platelet adhesion by nitric oxide donor: A role for α -actinin nitration. *PNAS* 2006;103(9):3434–39
- Masella R, Di Benetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem* 2005; 16: 577-586.
- Matsuzawa, Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett* 2006; 580: 2917-2921.
- McCord MJ. The Evolution of Free radicals and Oxidative Stress. *Am J Med*.2000;108:652-659.
- Millea PJ. N-Acetylcysteine: Multiple Clinical Applications. *Am Fam Physician*.2009; 80(3):265-9.
- Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: High-dose Vitamin E Supplementation may Increase all-mortality. *Ann. Intern. Med.* 2005;142(1):37-46.

- Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Aljada A, Gard R, Dandona P. Both lipid and protein intakes stimulate increase generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cell. *Am J Clin Nutr* 2002; 75:722-67
- Moncada S, Palmer RMJ & Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 1991; 43: 109-142.
- Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, Shah AM. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc Res.* 2006; 71(2):208-15.
- Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Suda O, Morishita T, Shibata K, *et al.* Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Circulation.* 2008; 117: 2211-23
- Noé L, Peeters K, Izzi B, Van Geet C, Freson K: Regulators of platelet cAMP levels: clinical and therapeutic implications. *Curr Med Chem* 2010, 17:2897-2905.
- Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Che. Rev.* 2004; 104: 6255-85.
- Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system of rat corpus cavernosum. *Free Radic Biol Med.*, 2001; 31(11):1287-312.
- Ohlstein EH, Wood KS, Ignarro LJ. Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1982; 218: 187-198.
- Ohyashiki T, Kobayashi M, Matsui K. Oxygen-radical-mediated lipid peroxidation and inhibition of ADP-induced platelet aggregation. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288:282-86.
- Ouchi, N., S. Kihara, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, K. Walsh. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol* 2003, 14: 561-566.
- Peckham, SC, Entenmann, C, Carroll, HW. The influence of a hypercaloric diet on gross body and adipose tissue composition in the rat. *J Nutr* 1962; 77:187-189.

- Pignatelli P, Pulcinelli FM, Lenti L, Gazzaniga PP, Violi F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood* 1998;91:484-90.
- Pignatelli P, Sanguigni V, Lenti L, Ferro D, Finocchi A, Rossi P, Violi F. Gp91phox-dependent expression of platelet CD40 ligand. *Circulation*. 2004; 110:1326-1329.
- Pratico D, Iuliano A, Ghiselli A, Alessandri C, Violi F. Hydrogen peroxide as trigger of platelet aggregation. *Haemostasis* 1991;21:169-74.
- Roger S, Badier-Commander C, Paysant J, Cordi A, Verbeuren TJ, Félétou M: The anti-aggregating effect of BAY 41-2272, a stimulator of soluble guanylyl cyclase, requires the presence of nitric oxide. *Br J Pharmacol* 2010, 161:1044-1058.
- Sawyer DB, Silwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol.*,2002 34(4):379-88.
- Schäfer A, Flierl U, Kobsar A, Eigenthaler M, Ertl G, Bauersachs J: Soluble guanylyl cyclase activation with HMR1766 attenuates platelet activation in diabetic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 26:2813-2818.
- Schulz S, Yuen OS, Garbers DL. The expanding family of guanylyl cyclases. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1991; 12: 116-120.
- Smith JA, Weidemann MJ. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1993 ;162(2):261-8.
- Stahl, W., Sies, H. Antioxidant defence: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*, New York, v.46, p.S14-S18,1997. Supplement 2.
- Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge JS. Adhesive signaling in platelets. *Curr Op Cell Biol* 1994a;6:695-704.
- Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schröder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A, Schramm M: NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* 2001, 410:212-215.

- Stasch JP, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, Minuth T, Perzborn E, Schramm M, Straub A: Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. *Br J Pharmacol* 2002, 135:333-343.
- Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, Arum Kumar HS, Meurer S, Taye A, Knorr A, Lapp H, Müller H, Turgay Y, Rothkegel C, Tersteegen A, Kemp-Harper B, Müller-Esterl W, Schmidt HH: Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest* 2006, 116:2552-2561.
- Stasch JP, Hobbs AJN: NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handb Exp Pharmacol* 2009, 191:277-308.
- Stokes KY, Russel JM, Jennings MH, Alexander JS, Granger DN. Platelet-associated NAD(P)H oxidase contributes to the thrombogenic phenotype induced by hypercholesterolemia. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 43: 22-30.
- Stone JR, Marletta MA. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*, 1994; 33: 5636-40.
- Stone JR, Sands RH, Dunham WR, Marletta MA. Electron paramagnetic resonance spectral evidence for the formation of a pentacoordinate nitrosylheme complex on soluble guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995; 207: 572-7.
- Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension.*, 2007; 49(2):241-8.
- Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress and redox signaling in hipertensión: what is the clinical significance? *Hypertension.* 2004; 44: 248-52
- Traylor TG, Sharma VS. Why NO? *Biochemistry*, 1992;31: 2847-2849.

- Tsikas, D. *et al.* Inhibition of platelet aggregation by S-nitroso-cysteine via cGMP-independent mechanism: evidence of inhibition of thromboxane A2 synthesis in human blood platelets. *FEBS Letters*, v.442, p.162-6,1999.
- Ushio- Fukai M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci STKE*. 2006; 349: r8
- Vanderschueren S, De Weerd A, Malbrain M, Vankersschaever D, Frans E, Wilmer A, Bobbaers H. Thrombocytopenia and Prognosis in Intensive Care. *Crit Care Med*. 2000; 28: 1871-6.
- Ward JR, Bingle L, Judge HM, Brown SB, Storey RF, Whyte MK, Dower SK, Buttle DJ, Sabroe I. Agonists of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 are unable to modulate platelet activation by adenosine diphosphate and platelet activating factor. *Thromb Haemost* 2005;94(4):831-38.
- Wedel B, Humbert P, Hartenack C, Foerster J, Malkewitz J, Bohme E, Schultz G & Koesling D Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 2592-2596.
- Who - Action Plan for the Global Strategy for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases, 2008-2013.
- Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Brownlee M: Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* 2001, 50:1491-1494.
- Yeaman MR. The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clin Infect Dis*. 1997; 25: 951-68.
- Yngen M, Ostenson CG, Li N, Hjemdahl P, Wallén NH: Acute hyperglycemia increases soluble P-selectin in male patients with mild diabetes mellitus. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001, 12:109-116.
- Yngen M, Ostenson CG, Hjemdahl P, Wallén NH: Meal-induced platelet activation in Type 2 diabetes mellitus: effects of treatment with repaglinide and glibenclamide. *Diabet Med* 2006, 23:134-140.

Zhang Q, Malik P, Pandey D, Gupta S, Jagnandan D, Chantemele EB, *et al.* Paradoxical activation of endothelial nitric oxide synthase by NADPH oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 1627-33

ANEXO

8. ANEXO



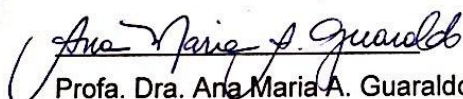
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

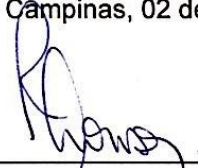
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Contribuição das Espécies Reativas de Oxigênio no aumento da Agregação Plaquetária de Ratos Tratados com Dieta Hiperlipídica" (protocolo nº 2409-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edson Antunes / Priscila Fukumura Monteiro, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 02 de maio de 2011.

Campinas, 02 de maio de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>