

RAFAEL PRADA MORGANTI

**EFEITOS DA INCUBAÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS E DO
LIPOPOLISSACÁRIDE NA AGREGAÇÃO E NA ADESÃO DE PLAQUETAS
HUMANAS**

*CAMPINAS
2008*

RAFAEL PRADA MORGANTI

**EFEITOS DA INCUBAÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS E DO
LIPOPOLISSACÁRIDE NA AGREGAÇÃO E NA ADESÃO DE PLAQUETAS
HUMANAS**

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Antunes

**CAMPINAS
2008**

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

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

M821e Morganti, Rafael Prada
Efeitos da incubação de enterotoxinas estafilocócicas e do lipopolissacáride na agregação e na adesão de plaquetas humanas / Rafael Prada Morganti. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Edson Antunes
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Plaquetas. 2. Lipopolissacarídeos. 3. Enterotoxinas. I. Antunes, Edson. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Incubation effects of staphylococcal enterotoxins and lipopolysaccharide in human platelets aggregation and adhesion

Keywords: • Platelets
• Lipopolysaccharide
• Enterotoxins

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora: Prof. Dr. Edson Antunes

Prof. Dr. José Luiz Donato
Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos
Profa. Dra. Lucia Lopes
Profa. Dra. Ivani Aparecida de Souza

Data da defesa: 24 -07 – 2008



Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Edson Antunes

Membros:

Prof. Dr. Edson Antunes

Profa. Dra. Ivani Aparecida de Souza

Profa. Dra. Lucia Rossetti Lopes

Prof. Dr. José Luiz Donato

Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos

Handwritten signatures in blue ink:
- A large signature above the first member name.
- A signature for "Ivani Aparecida de Souza".
- A signature for "José Luiz Donato".
- A signature for "Marcelo de Carvalho Ramos".

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

Data: 24/07/2008

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Oscar e Maria Suzana

*De quem tenho a honra de ser filho,
responsáveis pela minha criação,
servindo sempre de exemplo para minha formação...*

A quem declaro meu amor eterno...

A minha esposa Kika,

Pela sua constante presença... Por sua ajuda...

Por seu amor...

Te amo muito...

A meu filho Raul,

Por me "acordar" para a vida...

Te amo muito...

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador,

Prof. Dr. Edson Antunes,

*Agradeço imensamente pela confiança e a
oportunidade de desenvolver este trabalho, por sua
orientação e todo o crescimento profissional.*

A Profa. Dra. Sisi Marcondes,

*Agradeço pela sua co-orientação e contribuição
para o desenvolvimento deste trabalhos.*

A minha grande amiga,

Profa. Dra. Marcia Helena Miranda Cardoso

*Meu agradecimento especial pelos ensinamentos que você me
fez e por toda sua dedicação na minha vida profissional.*

Serei eternamente grato...

Agradecimentos

*A meu eterno amigo Prof. Dr. Cleber Evandro Teixeira,
Uma pessoa especial como poucas... obrigado por me ensinar tanto... Espero um dia poder me
reencontrar com você...*

Ao Prof. Dr. José Luiz Donato, por todas as experiências e ensinamentos compartilhados.

*Agradeço aos meus queridos amigos com os quais compartilhei momentos de muita alegria
(Gurza, Dron, Jr, Samir, Ricardo, Guto, Adriano, Flávio).*

*Aos amigos do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Aline Maziero, Carla Penteado,
Camila Moraes, Clélio Pena, Elen Landucci, Emilton Camarço, Fabiola Monica, Fernando Bau,
Fernanda Dell, Haroldo Flores, Ivani Souza, Juliana Baracat, Juliana Moreira, Julio Rojas,
Leticia Lintomen, Lineu, Márcia Cardoso, Maria Andréa Nadellin, Mario Claudino, Priscila,
Rafael Annovazzi, Raquel Lorenzetti, Tatiane
Ferreira, agradeço por toda a amizade e pela alegria compartilhada no dia-a-dia de trabalho.*

*Aos funcionários do Depto. de Farmacologia da UNICAMP, Francileuda, Elaine, Wanderlei,
Marcos, Agnaldo, Adilson, José Ilton, Sr. Miguel Borges da Silva, Marcos e Tominho, pela
agradável convivência e pelos serviços*

*Aos meus familiares, Vó Daisy, Guilherme, Bia, Mariana, Isabela, Filó, Hugo, Angela, João,
Roberto, Adriane, Bruno, Rebeca e Vó Nair por toda a amizade e compreensão.*

*Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da
bolsa de Doutorado direita*

“Cada homem deve inventar o seu caminho.”

Jean Paul Sartre

SUMÁRIO

LISTA DE MATERIAIS.....	xxii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxvii
LISTA DE FIGURAS.....	xxxii
LISTA DE TABELAS.....	xxxv
RESUMO.....	xxxix
ABSTRACT.....	xliii
1. INTRODUÇÃO.....	47
1. Considerações gerais sobre a septicemia.....	49
1.2. Plaquetas.....	51
1.2.1. Adesão e agregação plaquetária.....	52
1.3. Lipopolissacarídeo (LPS).....	53
1.3.2. Plaquetas e LPS.....	55
1.4. Enterotoxinas de <i>Staphylococcus</i>	56
OBJETIVOS.....	59
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
2.1. Obtenção de plaquetas lavadas.....	63
2.2. Ensaio de viabilidade celular.....	63
2.3. Medida de atividade de fosfatase ácida.....	64
2.4. Ensaio de adesão plaquetária.....	64
2.4.1. Preparo da placa de adesão.....	64
2.4.2. Adesão de plaquetas não ativadas ou ativadas com trombina.....	65
2.4.3. Adesão de plaquetas incubadas com SOD, PEG-SOD, ou PEG-Catalase.....	65
2.4.4. Adesão de plaquetas incubadas com puromicina e ciclohexamida.....	65
2.4.5. Transferência das plaquetas do Eppendorf para a placa de adesão.....	65
2.4.6. Leitura da placa.....	66
2.5. Teste para verificar a adesão de plaquetas ao Eppendorf durante incubação.....	66
2.6. Determinação dos níveis de AMPc e de GMPc.....	66
2.7. Ensaio de Agregação plaquetária.....	67
2.8. Medida da mobilização de cálcio.....	68
2.8.1. Marcação das plaquetas com FURA 2-AM.....	68
2.8.2. Incubação das plaquetas com LPS.....	68

2.8.3. Obtenção da fluorescência máxima e mínima.....	68
2.9. Citometria de fluxo.....	69
2.10. Análise estatística.....	69
3. RESULTADOS.....	71
3.1. LPS.....	73
3.1.1. Efeito do LPS na adesão plaquetária ao fibrinogênio.....	73
3.1.2. Efeito de LPS sobre a atividade da fosfatase ácida e viabilidade plaquetária.....	75
3.1.3. Teste de adesão de plaquetas ao Eppendorf durante incubação com LPS.....	78
3.1.4. Dosagem do AMPc e GMPc em plaquetas incubadas com LPS.....	80
3.1.5. Efeito da SOD e PEG-SOD sobre a inibição promovida pelo LPS.....	82
3.1.6. Efeito da PEG-catalase sobre a inibição promovida pelo LPS.....	85
3.1.7. Efeito da puromicina e ciclohexamida sobre a inibição promovida pelo LPS.....	86
3.1.8. Efeitos do LPS sobre a mobilização intracelular de cálcio em plaquetas.....	89
3.1.9. Efeito do LPS na agregação plaquetária induzida por trombina.....	92
3.1.10. Efeito do LPS sobre a ativação da glicoproteína IIb/IIIa.....	94
3.2. Enterotoxinas estafilocócicas.....	97
3.2.1. Efeito da SEA na adesão plaquetária ao fibrinogênio.....	97
3.2.2. Efeito da SEB na adesão plaquetária ao fibrinogênio.....	99
3.2.3. Efeito da SEA ou SEB sobre a atividade da fosfatase ácida e viabilidade plaquetária.....	101
3.2.4. Teste para verificar a adesão de plaquetas ao Eppendorf durante incubação com SEA ou SEB.....	104
3.2.5. Dosagem do AMPc e GMPc em plaquetas incubadas com SEA ou SEB.....	106
3.2.6. Efeito da puromicina sobre a inibição promovida pela SEB.....	109
3.2.7. Efeito da SOD e PEG-SOD sobre a inibição promovida pela SEB.....	110
3.2.8. Efeito da PEG-catalase sobre a inibição promovida pela SEB.....	111
4. DISCUSSÃO.....	113
4.1. LPS.....	115
4.2. Enterotoxinas estafilocócicas.....	123
5. SUMÁRIO E CONCLUSÕES.....	127
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

LISTA DE MATERIAIS

<u>Substância</u>	<u>Procedência</u>
Albumina (de soro bovino)	Sigma (St. Luis, MO, EUA)
Catalase polietileno glicol (de pulmão bovino)	Sigma (St. Luis, MO, EUA)
Ciclohexamida (de fonte microbial)	Sigma (St. Luis, MO, EUA)
EGTA	Sigma (St. Luis, MO, EUA)
Enterotoxina estafilocócica do tipo A de <i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma (St. Luis, MO, EUA)
Enterotoxina estafilocócica do tipo B de <i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma (St. Luis, MO, EUA)
Fibrinogênio (fração I, de plasma humano)	Sigma (St. Luis, MO, EUA)
FITC Mouse IgM	BD Biosciences (San Jose,CA, EUA)
FURA 2-AM	Sigma (St. Luis, MO, EUA)
Iloproste	Schering (Alemanha)
Kit AMPc	Cayman (Ann Arbor, Mi, EUA)
Kit GMPc	Cayman (Ann Arbor, Mi, EUA)
LPS de <i>E.coli</i> (soro tipo 0111:B4)	Sigma (St. Luis, MO, EUA)
MTT	Sigma (St. Luis, MO, EUA)
PAC-1 FITC	BD Biosciences (San Jose,CA, EUA)
Puromicina	Sigma (St. Luis, MO, EUA)
Substrato para fosfatase ácida (p-Nitrophenyl phosphate, disodium)	Sigma (St. Luis, MO, EUA)
Superóxido dismutase (de eritrócitos bovinos)	Sigma (St. Luis, MO, EUA)
Superóxido dismutase polietileno glicol	Sigma (St. Luis, MO, EUA)
<u>Substância</u>	<u>Procedência</u>
Triton X-100	Sigma (St. Luis, MO, EUA)

Trombina (de plasma humano)

Sigma (St. Luis, MO, EUA)

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina di-fosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
APC	Células apresentadoras de antígenos
ATP	Adenosina tri-fosfato
BSA	Soro albumina bovina
COX-2	Ciclooxigenase-2
DIC	Coagulação intravascular disseminada
DO	Densidade ótica
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EGTA	Ácido tetracético etileno glicol
EPM	Erro padrão da média
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GPIIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleucina
IP₃	Inositol tri-fosfato
LBP	Proteína ligante de LPD
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB₄	Leucotrieno B ₄
MHC II	Complexo de histocompatibilidade maior classe II
MOF	Insuficiência múltipla de órgãos
NF-κB	Fator nuclear κB
NO	Óxido Nítrico
NOSi	Óxido nítrico sintase induzível
O²⁻	Anion superóxido
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEG-catalase	Catalase polietileno glicol
PEG-SOD	Superóxido dismutase polietileno glicol
PF4	Fator 4 plaquetário
PGE₂	Prostaglandina E ₂

PGI₂	Prostaciclina
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PLC	Fosfolipase C
PRP	Plasma rico em plaquetas
RNA_m	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SEA	Enterotoxina Estafilocócica A
SEB	Enterotoxina Estafilocócica B
SEs	Enterotoxinas estafilocócicas
SNP	Nitroprussiato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TcR	Receptor de célula T
TF	Fator tecidual
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TXA₂	Tromboxano A ₂
UTI	Unidade de internação
VASP	Fosfoproteína estimulante vasodilatadora
vWf	Fator de von Willebrand

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito inibitório da LPS na adesão de plaquetas ao fibrinogênio.....	74
Figura 2. Efeito da SOD na adesão de plaquetas incubadas com LPS.....	83
Figura 3. Efeito da PEG-SOD na adesão de plaquetas incubadas com LPS.....	84
Figura 4. Efeito da SOD e PEG-SOD sobre a inibição na adesão de plaquetas após a incubação com SNP.....	84
Figura 5. Efeito da PEG-Catalase na adesão de plaquetas incubadas com LPS.....	85
Figura 6. Efeito da puromicina e ciclohexamida na adesão de plaquetas ao fibrinogênio.....	87
Figura 7. Efeito da puromicina na adesão de plaquetas incubadas com LPS.....	87
Figura 8. Efeito da ciclohexamida na adesão de plaquetas incubadas com LPS.....	88
Figura 9. Efeito do LPS na mobilização de cálcio intracelular em plaquetas.....	90
Figura 10. Efeito da incubação do LPS por 60 min na agregação de plaquetas induzida por trombina.....	93
Figura 11. Efeito da incubação do LPS sobre a expressão de glicoproteína IIb/IIIa ativada em plaquetas não estimuladas e estímulada com trombina (5-50 mU/ml).	95
Figura 12. Efeito inibitório da SEA na adesão de plaquetas ao fibrinogênio.....	98
Figura 13. Efeito inibitório da SEB na adesão de plaquetas ao fibrinogênio.....	100
Figura 14. Efeito da puromicina na adesão de plaquetas incubadas com SEB.....	109
Figura 15. Efeito da SOD e PEG-SOD na adesão de plaquetas incubadas com SEB.....	110
Figura 16. Efeito da PEG-Catalase na adesão de plaquetas incubadas com SEB.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito de LPS sobre a atividade da fosfatase ácida.....	76
Tabela 2. Efeito de LPS sobre a viabilidade plaquetária.....	77
Tabela 3. Determinação do efeito da incubação com LPS sobre a adesão de plaquetas ao Eppendorf.....	79
Tabela 4. Dosagem dos níveis de AMPc e de GMPc em plaquetas incubadas com LPS por 60 min.....	81
Tabela 5. Efeito do LPS na mobilização total, mobilização intracelular e influxo de cálcio estimulada por trombina.....	91
Tabela 6. Efeito da incubação do LPS sobre a ligação a FITC-IgM.....	96
Tabela 7. Efeito da SEA e SEB sobre a atividade da fosfatase ácida.....	102
Tabela 8. Efeito da SEA e SEB sobre a viabilidade plaquetária.....	103
Tabela 9. Determinação do efeito da SEA e SEB sobre a adesão de plaquetas ao Eppendorf.....	105
Tabela 10. Dosagem dos níveis de AMPc e de GMPc em plaquetas incubadas com SEA por 60 min.....	107
Tabela 11. Dosagem dos níveis de AMPc e de GMPc em plaquetas incubadas com SEB por 60 min.....	108

RESUMO

A sepsis é a segunda causa de morte em pacientes internados em unidades de tratamento intensivo não coronariano. Pacientes com sepsis apresentam anormalidades plaquetárias como trombocitopenia, prolongamento do tempo de coagulação, coagulação intravascular disseminada, trombose microvascular maciça e sangramentos. Entretanto, os mecanismos envolvidos nestas alterações plaquetárias ainda são mal compreendidos. O objetivo deste trabalho foi investigar as ações do lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*, e de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* (SEA e SEB), na adesão e na agregação de plaquetas humanas, bem como os mecanismos envolvidos nesses fenômenos. As plaquetas foram expostas ao LPS, SEA ou SEB em diferentes concentrações e tempos de incubação para avaliação *in vitro* da adesão ou agregação. Além disso, realizou-se experimentos para verificar o papel do óxido nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio nas ações induzidas pelo LPS, SEA e SEB, assim como a sinalização intracelular (mobilização de Ca^{+2}) e ativação do receptor do fibrinogênio glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa).

A incubação de plaquetas com LPS, SEA e SEB por períodos 5 a 120 min inibiu a adesão espontânea das plaquetas ao fibrinogênio, sendo esta inibição dependente da concentração e do tempo de incubação. A adesão de plaquetas ativadas com trombina também foi inibida após incubação com LPS, SEA ou SEB por 5 a 120 min. Porém, a inibição em plaquetas ativadas foi menor quando comparada à inibição da adesão espontânea. Esta inibição ocorreu de forma independente de aumentos intraplaquetários de GMPc e AMPc.

Com o objetivo de se entender o mecanismo de ação envolvido na inibição da adesão plaquetária pelo LPS, SEA e SEB as plaquetas foram pré-tratadas com os seguintes agentes farmacológicos: superóxido dismutase (seqüestrador de ânion superóxido), polietileno glicol superóxido dismutase (seqüestrador de ânion superóxido intracelular), polietileno glicol catalase (degrada peróxido de hidrogênio), puromicina e ciclohexamida (inibidores de síntese protéica). Em conjunto, nossos dados mostraram que o efeito inibitório do LPS não envolve aumento de ânion superóxido (O_2^-) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), nem a formação de proteínas neo-sintetizadas, e alterações na ativação da GPIIb/IIIa. Por outro lado, o LPS reduziu significativamente o influxo externo de cálcio, sem afetar a mobilização intracelular deste cátion. Em relação às

enterotoxinas estafilocócicas, a síntese de neo-proteínas e aumento de O_2^- não tem papel direto sobre a inibição plaquetária, embora um aumento nas concentrações de H_2O_2 intracelulares esteja ligado a esta resposta.

Em conclusão, a exposição ao LPS inibiu a adesão a agregação plaquetária, dose- e tempo-dependente, inibindo a influxo de cálcio; da mesma forma, a incubação com SEA ou SEB inibiu a adesão de plaquetas ao fibrinogênio, por um mecanismo que envolveria a formação de H_2O_2 .

ABSTRACT

Sepsis is the second major cause of death in intensive care unit. Septic patients show abnormalities in platelet like thrombocytopenia, prolongation in coagulation time, disseminated intravascular coagulation, deep venous thrombosis and bleedings. However, the mechanisms involved in these platelet alterations are not totally clear. The objective of this work was investigate the actions of lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* and enterotoxins from *Staphylococcus aureus* (SEA and SEB), in human platelet adhesion and aggregation, likewise the mechanism involved in these phenomenon. The platelets were exposed to LPS, SEA or SEB in different concentrations and times of incubation *in vitro* evaluations of adhesion and aggregation. Moreover, experiments to elucidate the participation of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species in the actions of LPS, SEA and SEB, likewise the intracellular sinalization (calcium mobilization) and activation of fibrinogen receptor glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) were carry out .

The platelets incubation with LPS, SEA and SEB for 5 to 120 min, inhibited the spontaneous adhesion to fibrinogen and this inhibition was dependent of concentration and time of incubation. The thrombin activated adhesion of platelets was concentration and time dependently also inhibited after incubation with LPS, SEA and SEB for 5 to 120 min. However, the activated platelets inhibition was lower when compared to spontaneous adhesion inhibition. This inhibition was not dependent of intracellular levels increase of cGMP and cAMP.

To understand the mechanism of action involved in the platelet adhesion inhibition by LPS, SEA and SEB, the platelets were previously treated with pharmacological agents like: superoxide dismutase (superoxide anion scavenger), superoxide dismutase-polyethylene glycol (superoxide anion intracellular scavenger), catalase-polyethylene glycol (Hydrogen peroxide intracellular scavenger), puromycin and cyclohexamide (protein synthesis inhibitors). Our data suggests that the inhibitory effect of LPS neither involve superoxide anion (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) increase, nor the formation of neo-proteins, and alterations on activation of glycoprotein IIb/IIIa. In contrast, LPS significantly reduce the external calcium influx, without effecting calcium internal mobilization. With regard to staphylococcal enterotoxin, the protein synthesis and rise in O_2^- do not play a role in the platelet inhibition; however the increase of H_2O_2 intracellular concentration was involved in this response.

In conclusion, platelet aggregation and adhesion was inhibited after addition of LPS, concentration and time-dependently, inhibiting calcium influx; similarly, incubation with SEA or SEB inhibited platelets adhesion to fibrinogen, by a mechanism involving H_2O_2 formation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais sobre a septicemia

American College of Chest Physicians em associação a *Society of Critical Care Medicine*, em conferência realizada em 1992, na cidade de Northbrook, EUA, definiram a sepsis como uma resposta inflamatória sistêmica a infecções, associada com pelo menos um destes fatores: temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$, batimentos cardíacos acima de 90 batimentos/min, taquipnéia (> 20 respirações/min) ou hiperventilação ($\text{PaCO}_2 < 32\text{mmHg}$), e alteração no número de leucócitos circulantes ($> 12\,000$ células/ mm^3 ou < 4000 células/ mm^3).

A sepsis é a segunda causa de morte em pacientes internados em unidades de tratamento intensivo. Pesquisa realizada nos Estados Unidos mostrou que a incidência anual da sepsis é de 50-95 casos por 100.000 habitantes (Martin e col., 2003). É responsável por 2% dos casos admitidos em hospitais, sendo que aproximadamente 9% dos pacientes progridem para sepse grave, e 3% evoluem para choque séptico (Rangel-Frausto e col., 1998; Annane e col., 2003). A taxa de mortalidade dos pacientes em choque séptico é 56% (dados obtidos em 2000 nos EUA), mas vem diminuindo nos últimos anos (Annane e col., 2003).

A incidência de sepsis decorrente de bactérias gram-negativas varia de 25 a 30% dos casos, enquanto a de gram-positivas varia de 30 a 50%. As bactérias gram-negativas mais comuns responsáveis pela sepse grave e pelo choque séptico são a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Klebsiella*, enquanto as gram-positivas são, principalmente, o *Staphylococcus* e o *Streptococcus* (Alberti e col., 2002; Martin e col., 2003; Annane e col., 2003).

De modo geral, a sepsis caracteriza-se por diminuição da atividade cardiocirculatória resultante da liberação descontrolada de agentes vasodilatadores como o óxido nítrico (NO), cininas, prostaglandinas e citocinas, também da redução simultânea do débito cardíaco. Dessa forma, há o colapso do sistema vascular, quadro típico do choque séptico, que é caracterizado ainda por sinais bioquímicos de déficit de oxigênio, danos vasculares e coagulação intravascular disseminada. A diminuição da pressão arterial e da perfusão tecidual, somada à reação inflamatória, acaba gerando danos funcionais nos sistemas renal, hepático e pulmonar, que podem culminar na disfunção múltipla de órgãos (Brandtzaeg, 1996; Karima e col., 1999).

O evento mais precoce na fase inicial da endotoxemia é a diminuição significativa do número de leucócitos e de plaquetas no sangue periférico. Estudo clínico realizado em voluntários sadios mostrou que já na primeira hora após a administração endovenosa de lipopolissacarídeo (LPS) há diminuição de 15% do número de plaquetas circulantes (Stohlawetz e col., 1999). Alguns autores especulam que esta trombocitopenia se deve ao acúmulo de plaquetas em certos órgãos como pulmão e fígado. De fato, a injeção de LPS em camundongos causa simultaneamente diminuição do número de plaquetas circulantes e acúmulo desses elementos no fígado e no pulmão, o qual é acompanhado de liberação de 5-hidroxitriptamina (5-HT) no sangue, e o aparecimento de agregados plaquetários circulantes em nível de artéria pulmonar (Davis e col., 1960; Morrison e col., 1978; Neame e col., 1980; Shibazaki e col., 1996, Ohtaki e col., 2003).

Em humanos, o número de plaquetas acumuladas em órgãos periféricos e o grau de ativação destas plaquetas (determinado através da expressão de proteínas presentes na membrana plaquetária como a CD62P e o receptor de fibrinogênio GP IIb-IIIa) apresentam correlação positiva com a gravidade da sepsis e, por conseguinte, com o desenvolvimento da disfunção múltipla de órgãos (Gawaz e col., 1997; Russwurm e col., 2002).

Já é bem estabelecido que durante a sepsis ocorre uma intensa ativação sistêmica da cascata de coagulação, com conseqüente aumento das concentrações intravasculares de trombina (Morris e col., 2002; Jagneaux e col., 2004). Trabalhos prévios mostram que células endoteliais expostas a endotoxina e citocinas pró-inflamatórias expressam fator tecidual em sua superfície celular (Bevalacqua e col., 1984; Nawroth e Stern, 1986). Alguns estudos mostraram efeitos benéficos da inibição de receptores plaquetários GPIIb/IIIa em pacientes com choque séptico (Taylor e col., 1997; Pu e col., 2001), que parecem refletir a redução no recrutamento de plaquetas ao pulmão e fígado, onde poderiam causar dano a estes tecidos.

1.2. Plaquetas

As plaquetas são elementos sangüíneos indispensáveis para a hemostase fisiológica e para a trombose patológica, além de participar em processos inflamatórios (Klinger, 1997; Yeaman, 1997).

Plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos, de forma discóide. Estes elementos estão presentes no sangue em concentração de $140 - 400 \times 10^3/\mu\text{L}$ e possuem meia-vida na circulação de 8 a 14 dias, quando então são retirados do sangue pelos macrófagos. As plaquetas são anucleadas, mas contêm organelas comuns a outros tipos celulares tais como mitocôndrias, sistemas de Golgi, ribossomos e microtúbulos. Possuem estrutura funcional complexa, permitindo rápido reconhecimento de lesão vascular (Harker, 1978).

As plaquetas possuem três tipos de grânulos, classificados como grânulos densos, alfa e lisossomais (Holmsen e Weiss, 1979). Os grânulos densos contêm serotonina, ATP, ADP, cálcio e pirofosfato. Os grânulos alfa possuem o fator 4 plaquetário (PF4), a β -tromboglobulina, o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), proteínas catiônicas, fator bactericida e fatores que participam da cascata da coagulação tais como o fibrinogênio, fator V e o fator VIII/von Willebrand. Nos grânulos lisossomais encontram-se algumas hidrolases ácidas como a β -glucuronidase e β -galactosidase.

Em processos inflamatórios, as plaquetas parecem ter importante papel em respostas imunes inatas e adaptativas, participando de processos iniciais e de perpetuação destas respostas (Elzey e col., 2003). Foi visto que plaquetas tem a capacidade de expressar CD154, importante na ativação dos linfócitos T CD4+, provendo o sinal necessário para a diferenciação de células T (Renshaw e col., 1994; Elzey e col., 2003).

A ativação plaquetária inapropriada pode contribuir para a patogênese de doenças como aterosclerose e coagulação intravascular disseminada. Aterosclerose é a maior causa de morte em países desenvolvidos onde apenas cerca 50% dos casos estão correlacionados a fatores de risco como obesidade, tabagismo, fatores genéticos e hipertensão arterial (Ward e col., 2005).

As plaquetas expressam níveis elevados dos fatores de iniciação translacional eIF-4E e eIF-2 α , ambos com papel regulatório chave na síntese protéica (Harding e col, 1999; Rosenwald e col., 2001). Inibidores de síntese protéica como a puromicina e a emetina

apresentam respostas contraditórias na agregação plaquetária, podendo atenuar a agregação em resposta ao ADP e à adrenalina, ou potencializar o efeito agregante em resposta ao colágeno (Rosenwald e col., 2001). A ativação de plaquetas por diversos agonistas leva à síntese de proteínas específicas, como a IL-1 β e Bcl-3 (Rosenwald e col., 2001; Weyrich e col., 1998; Pabla e col., 1999).

Plaquetas ativadas são também capazes de gerar espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido (Iuliano e col., 1997; Pignatelli e col., 1998). Entretanto, o papel dessas espécies reativas de oxigênio em plaquetas ainda não está bem definido. Alguns trabalhos mostram um papel inibitório na agregação e na adesão plaquetária (Clark e col., 1980; Ohyashiki e col., 1991; Belisario e col., 2000; Marcondes e col., 2006), enquanto outros indicam um efeito estimulante (Pratico e col., 1991; Ambrosio e col., 1994).

1.2.1. Adesão e agregação plaquetária

A ativação plaquetária pode gerar quatro diferentes fenômenos, a saber: *shape change*, secreção, adesão e agregação. O *shape change* envolve a mudança da forma discóide para a forma esférica que é acompanhada de emissão de pseudópodes. A secreção compreende a extrusão do conteúdo granular durante a adesão, agregação ou mesmo na ausência de ambas. A adesão é o processo no qual plaquetas se juntam a superfícies que não são de outras plaquetas, enquanto a agregação é o processo onde as plaquetas se juntam somente a superfícies de outras plaquetas.

De modo geral, a ativação plaquetária se dá através de uma seqüência de sinalização denominada *inside-out* e *outside-in*. A sinalização *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⁺² intracelular e ativação de uma série de enzimas dependentes deste íon. Esta cascata de sinais intracelulares é responsável pela conversão do receptor α IIb β 3 do estado de baixa afinidade para o de alta afinidade, permitindo assim a ligação de seu ligante (Abrams e col., 1990, Levy-Toledano, 1999). A glicoproteína IIb-IIIa participa tanto dos processos de agregação quanto de adesão, sendo responsável pela ligação das plaquetas ao fibrinogênio, fator de von Willebrand (vWf), vitronectina e fibronectina (Shattil e col.,

1994a). Após a ligação da glicoproteína IIb-IIIa 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). Na adesão, o processo de ativação plaquetária começa a partir da etapa *outside-in*, enquanto 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 (Oberfell e col., 2002) ou pela ativação da proteína G, como a PI3-K γ (Levy-Toledano, 1999); mas, outras são ativadas somente quando há ativação total das plaquetas; isto é, ativação da PLC e ligação do fibrinogênio, como é o caso da FAK (Shattil e col., 1994b). A ativação do complexo formado pelas GPIIb/IIIa permite o aparecimento de poros na membrana, por onde atravessam livremente os íons Na⁺, H⁺ e Ca⁺² durante o processo de ativação plaquetária.

1.3. Lipopolissacarídeo (LPS)

O LPS, maior componente da membrana celular externa de bactérias gram-negativas, é constituído por três regiões principais: a região polissacarídea O, a qual caracteriza a bactéria do ponto de vista imunológico; a região polissacarídea central, formada pelo ácido 3-deoxi-D-mano-octo-2-ulônico (Kdo), que é comum à maioria das bactérias, e a região lipídica (lipídeo A) (Rietschel e Brade, 1992; Raetz e Whitfield, 2002). O lipídeo A de *E. coli* possui dois grupamentos fosfato e duas porções acil-oxi-acil necessários para desencadear os efeitos da endotoxina em células humanas (Golenbock e col., 1991; Alexander e Rietschel, 2001).

Na literatura está estabelecido que a endotoxina desencadeia a maioria dos fenômenos fisiopatológicos observados em infecções causadas por esse tipo de bactérias (Morrison e Ulevitch, 1978). Huang e colaboradores (2001) demonstraram que 466 genes são regulados positivamente (*up-regulation*) nas células dentríticas após exposição à *E. coli*, sendo que aproximadamente 88% dos genes transcritos são transcritos após exposição ao LPS purificado.

O LPS liberado na circulação pode ser o responsável pelo choque séptico e síndromes relacionadas, como coagulação disseminada intravascular (DIC) e

insuficiência múltipla de órgãos (Levi e col., 2003). Estudos clínicos têm associado níveis elevados de LPS com risco maior de mortalidade, que parece ser independente da natureza da bactéria gram-negativa responsável pelo episódio séptico (Opal, 2002).

A estimulação celular com LPS, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, promove a liberação de várias substâncias, incluindo citocinas, prostaglandinas, óxido nítrico (NO), ânion superóxido e fatores pró-coagulantes (Raij e col., 1977; Zielinski e col., 2001; Cerwinka e col., 2002a,b). Normalmente, o reconhecimento de componentes da parede de bactérias pelo hospedeiro é feito de maneira específica. Inicialmente, os agregados de LPS são dissociados pela proteína ligante de LPS (LBP) formando complexos LPS/LBP, que são transferidos para a glicoproteína de membrana CD14 presente em células monocíticas ou para a CD14 solúvel presente no sangue (Wright e col., 1990; Gutschmann e col., 2001). O complexo da LBP solúvel e LPS pode se ligar a células negativas para CD14, como as células endoteliais e epiteliais (Pugin e col., 1993; Schumann e col., 1994). Entretanto, a glicoproteína CD14 não pode iniciar a sinalização intracelular uma vez que está localizada na porção extracelular da membrana e não possui um segmento transmembrana.

O *Toll-like receptor 4* (TLR4) tem sido descrito como o receptor responsável pela transdução de sinal iniciada pelo LPS ou pelo complexo LPS/CD14 (Medzhitov e col., 1997; Chow e col., 1999; Shimazu e col., 1999). Os receptores *Toll* foram descobertos inicialmente em *Drosophila* e depois identificados em outras espécies como camundongos e humanos. Estes receptores pertencem à família de receptores de imunidade inata, que possuem um grande domínio extracelular contendo resíduos repetidos de leucina, um único segmento trans-membrana e uma pequena porção citoplasmática que está ligada à proteína adaptadora MyD88 (Raetz e Whitfield, 2002). Atualmente, mais de 10 tipos de TLR foram descritos em humanos, mas o TLR4 parece ser o mais importante na sinalização de efeitos desencadeados pelo LPS (Beutler, 2000). A sinalização via TLR4 ocorre através do recrutamento sequencial da molécula adaptadora MyD88 e da quinase associada ao receptor da IL-1 (IRAK) (Muzio e col., 1998). Logo em seguida, a IRAK se dissocia do receptor e interage com o fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6), que resulta na ativação celular através do fator nuclear kB (NF-kB) ou da quinase do N-terminal da Jun/proteína quinase (JNK/SAP),

que são sistemas envolvidos na ativação de inúmeros genes inflamatórios (Heumann e Roger, 2002).

A presença do receptor TLR4 já foi descrita em várias células como em monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais e células epiteliais do túbulo renal (Perera e col, 2001; Sabroe e col, 2002; Tsuboi e col., 2002; Zeuke, e col, 2002). Um crescente número trabalhos vem mostrando a presença deste receptor em plaquetas humanas e murinas (Ward e col., 2005; Cognasse e col., 2005; Andonegui e col., 2005; Aslam e col., 2006). Megacariócitos obtidos de culturas *in vitro* expressam TLR4 quando se tornam CD41 (marcador de plaquetas), sugerindo que plaquetas adquirem a expressão deste receptor durante sua gênese (Andonegui e col., 2005).

Em pacientes com diminuição no número de TLR4, mostrou-se um aumento de susceptibilidade a infecções gram-negativas; entretanto, reduziu-se o risco de desenvolvimento de aterosclerose (Kiechl e col., 2002). Camundongos *knock-out* para TLR4 também apresentaram risco reduzido de lesões ateroscleróticas quando estimulados com LPS (Vink e col., 2002).

1.3.1. Plaquetas e LPS

Apesar das numerosas observações de trombocitopenia após exposição à endotoxina *in vivo*, os efeitos *in vitro* do LPS em plaquetas continuam controversos, variando de acordo com o protocolo experimental empregado e a fonte de LPS utilizada no estudo.

Estudos prévios, examinando os efeitos do LPS na agregação de plaquetas humanas, mostraram resultados conflitantes, onde alguns grupos observaram ativação e agregação plaquetária em resposta ao LPS (Ream, 1965; Saluk-Juszczak e col., 1999; Zielinski e col., 2001), ao passo que outros não observaram nenhum efeito (Mueller-Eckhardt e Luscher, 1968; Csako e col, 1988; Whitworth e col., 1989; Nystrom e col, 1994; Ward e col., 2005).

Disparidade semelhante foi observada em relação à habilidade do LPS em modular respostas plaquetárias a outros agonistas clássicos, tendo se observado tanto aumento (Matera e col, 1992; Saluk-Juszczak e col, 2001; Olas e col, 2002; Zielinski e

col, 2002; Montrucchio e col, 2003), quanto inibição da adesão e da agregação plaquetária (Saba e col., 1984; Cicala e col., 1997; Sheu e col., 1998 e 1999).

1.4. Enterotoxinas de *Staphylococcus*

O *Staphylococcus aureus* é um patógeno virulento frequentemente presente em ferimentos (queimaduras ou incisões locais), cateteres, e tubos intravenosos em pacientes hospitalizados (Sheagren, 1985; Villavicencio e Wall, 1996).

Um dos mecanismos pelos quais as bactérias Gram-positivas iniciam as lesões é através da produção e excreção de potentes toxinas pirogênicas denominadas enterotoxinas estafilocócicas (SEs). Estas toxinas são responsáveis pela maioria das intoxicações alimentares em humanos, podendo causar várias alterações fisiopatológicas que podem levar a choque e morte (LeClaire e col., 1995).

A SEs são proteínas básicas com peso molecular entre 25.000 - 28.000, estáveis em meio ácido, resistentes ao aquecimento e à digestão por enzimas proteolíticas. Estas toxinas são estruturalmente semelhantes entre si, tendo sido classificadas por critérios imunológicos em diferentes tipos, designados alfabeticamente de A a E, e de G a Q (Bergdoll, 1989; Iandolo, 1989; Munson, e col., 1998, Alouf e Alouf, 2003; Baker e Acharya, 2004).

Em humanos, vários estudos mostraram que os efeitos fisiopatológicos das SEs envolvem a liberação de múltiplos mediadores inflamatórios como prostaglandinas (PGs), histamina, serotonina e leucotrienos, além de citocinas como a IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral- α , interferon- γ (INF- γ) e NO. Do mesmo modo, uma variedade de células tem sido implicada na produção destes mediadores, principalmente mastócitos, macrófagos e linfócitos (Dinarello, 1991; Kluger, 1991; Micusan e Thibodeau, 1993; Haskó e col., 1998; Won e col., 2000; Alouf e Alouf, 2003; Baker e Acharya, 2004). Além disto, as SEs funcionam como superantígenos, acreditando-se que parte de suas ações se deve a este efeito imunomodulador (Fleischer e col., 1989; Marrak e Kappler, 1990; Bobak e Guerrant, 1992; Alouf e Alouf, 2003; Baker e Acharya, 2004).

Em camundongos, trabalhos prévios mostraram que a enterotoxina estafilocócica do tipo B (SEB) induz edema e influxo neutrofílico, sendo este efeito modulado pelo NO (Linardi e col., 2000; Franco-Penteado e col, 2001a). De maneira semelhante, esta

enterotoxina, quando injetada em cavidade peritoneal de camundongos, leva a uma reação inflamatória rica em infiltrado neutrofílico, também dependente de NO (Franco-Penteado e col, 2001b). Por outro lado, a peritonite causada pela enterotoxina estafilocócica do tipo A (SEA) é mediada, em parte, pela substância P (Desouza e col., 2001). Além disso, a SEA é capaz de induzir intenso infiltrado neutrofílico nas vias aéreas de ratos, que é acompanhado de aumento na expressão de COX-2, iNOS e CINC-3 no tecido pulmonar, assim como de aumento dos níveis de LTB₄, PGE₂, TNF- α , IL-6 e NO no lavado broncoalveolar (Desouza e col., 2005 e 2006).

As enterotoxinas interagem com moléculas do complexo de histocompatibilidade maior classe II (MHC II) presentes na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs). Estas são concomitantemente apresentadas como proteínas não processadas para o Linfócito T, que expressa o seu domínio variável de cadeia β apropriado no receptor de célula T (TcR) (Florquin e Aaldering, 1997). Este processo resulta na formação de um complexo ternário (MHC II-Ses-TCR), que leva à proliferação da célula alvo T (Papageorgiou e col., 1999; Alouf e Alouf, 2003).

Trabalho recente mostrou que o seqüestro de neutrófilos no pulmão em resposta as SEs pode ser mediado por TLR-4 (Calkins e col, 2002). Além disso, as SEs compartilham outras várias propriedades biológicas com o LPS bacteriano tais como a febre, produção de citocinas e liberação das proteínas quimiotáticas por macrófagos (Bergdoll e Chesney, 1991).

Na literatura poucos trabalhos procuraram estudar o efeito das SEs em plaquetas. Porém, recentemente mostrou-se redução da agregação plaquetária à trombina após incubação com SEA, SEB, SEC e TSST-1, através de um mecanismo que parece envolver proteína quinase C (PKC) (Tran e col., 2006).

OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste trabalho foram investigar os efeitos induzidos pelo LPS, SEA ou SEB na agregação e na adesão plaquetária, bem como os mecanismos farmacológicos envolvidos nestas respostas.

Os objetivos específicos foram:

- i) Investigar os efeitos do LPS na agregação e na adesão de plaquetas humanas *in vitro*, realizando curvas de concentração e de tempos de incubação;
- ii) Investigar os efeitos da SEA ou SEB na adesão de plaquetas humanas *in vitro*, realizando curvas de concentração e de tempos de incubação;
- iii) Investigar a sinalização intracelular determinada pelo LPS na agregação e na adesão plaquetária, verificando o papel dos nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc), de espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio), proteínas neo-sintezadas, mobilização intraplaquetária de Ca^{+2} , e modificação conformacional do receptor do fibrinogênio (GIIb/IIIa).
- iv) Investigar a sinalização intracelular determinada pela SEA ou SEB na adesão plaquetária, verificando o papel dos nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc), de espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio), e proteínas neo-sintezadas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP (Parecer n.º 272/2006).

2.1. Obtenção de plaquetas lavadas

Sangue humano de voluntários sadios que não receberam qualquer medicação durante 10 dias anteriores ao experimento foi coletado em ACDC (ácido cítrico 3 %, citrato trissódico 4 %, glicose 2 %; 9:1, v/v). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação do sangue total a 200 g em temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, 5 ml de PRP foram adicionados a 7 ml de tampão de lavagem de plaquetas (cloreto de sódio 140 mM, cloreto de potássio 5 mM, citrato trissódico 12 mM, glicose 10 mM, sacarose 12,5 mM, pH=6) e centrifugados a 800 g em temperatura ambiente por 12 min. O sobrenadante foi desprezado e o resíduo plaquetário cuidadosamente ressuspenso em Krebs-Ringer desprovida de cálcio (cloreto de sódio 118 mM, carbonato de sódio 25 mM, glicose 5,6 mM, cloreto de potássio 2,8 mM, fosfato de potássio 1,2 mM, sulfato de magnésio 1,7 mM). O número de plaquetas foi ajustado para 2×10^8 plaquetas /ml através de contagem manual, utilizando-se câmara de Neubauer. Finalmente, foi adicionado CaCl_2 à suspensão plaquetária para uma concentração final de 1mM.

2.2. Ensaio de viabilidade celular

Este método foi originalmente descrito por Mosmann (1983) e modificado para o uso em plaquetas por Xia e col. (2000). A viabilidade celular foi determinada baseando-se na capacidade de plaquetas metabolicamente ativas de reduzir o MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) em formazan. A suspensão plaquetária (50 µl; $1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foi adicionada aos poços de uma microplaca na presença ou na ausência de 5 µl de LPS (0,01 - 300 µg/ml), SEA (0,01 pg – 1 µg/ml) ou SEB (0,0001 - 30 µg/ml) puromicina (1 µM – 1 mM), SOD (10 U – 100 U/ml) e SIN-1 (1mM). Após 120 min, foi adicionado a cada poço solução de Krebs para um volume final de 100 µl. Finalmente, as plaquetas foram incubadas com 10 µl de MTT (5 mg/ml) e após 3 h (37°C) a reação foi interrompida com 100 µl de SDS 10% em HCl 0,01 M. A

seguir, realizou-se outra incubação por 60 min (37°C). A leitura da placa foi realizada a 540 nm em leitor de microplacas (Spectra Max 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA)

2.3. Medida de atividade de fosfatase ácida

A suspensão plaquetária (50 µl; $1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foi adicionada aos poços de uma microplaca na presença ou na ausência de 5 µl de LPS (0,01 - 300 µg/ml), SEA – (0,01 pg – 1 µg/ml) ou SEB (0,0001 - 30 µg/ml), e incubada durante 5, 15, 60 ou 120 min. Em seguida, foi adicionado 150 µl/poço do substrato para fosfatase ácida (p-nitrofenilfosfato 5mM em tampão citrato 0,1, M pH 5,4, contendo Triton X-100 0,1%). Após 60 min, a reação foi interrompida e a cor foi desenvolvida pela adição de 100 µl de NaOH 2 N. A placa foi lida a 405 nm em leitor de microplacas (Spectra Max 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

2.4. Ensaio de Adesão plaquetária

Os ensaios de adesão foram realizados como descrito anteriormente por Bellavit e col. (1994), e detalhado a seguir.

2.4.1. Preparo da placa de adesão

Microplacas contendo 96 poços foram revestidas com fibrinogênio (50 µl/ poço), e mantidas por 16 h à 4°C. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com solução de Krebs-Ringer desprovida de cálcio (200 µl/poço). Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 100 µl/poço de BSA (1%). Após de 60 min à 37°C, o BSA foi removido e a microplaca lavada duas vezes com solução de Krebs-Ringer desprovida de cálcio (200 µl/poço).

2.4.2. Adesão de plaquetas não ativadas ou ativadas com trombina

A suspensão de plaquetas (200 µl de $1,2 \times 10^8$ plaqueta/ml) foi transferida para Eppendorf, e incubada com LPS (0,01 – 300 µg/ml), SEA (0,01 pg - 1 µg/ml), SEB (0,0001 - 30 µg/ml) ou solução Krebs-Ringer por 5, 15, 60 e 120 min à 37°C. Dependendo do protocolo, após a transferência da suspensão plaquetária para a placa de Elisa estas foram ativadas ou não com trombina (50 mU/ml).

2.4.3. Adesão de plaquetas incubadas com SOD, PEG-SOD, ou PEG-Catalase

A suspensão de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaqueta/ml) foi transferida para Eppendorf (200 µl), e incubada com SOD (100 U/ml), PEG-SOD (30 U/ml), ou PEG-catalase (300 e 1000 U/ml) por 15 min à 37°C. Em seguida, a suspensão foi incubada com LPS (0,01 e 100 µg/ml), SEB (30 µg/ml) ou solução Krebs-Ringer por 15, 60 e 120 min a 37°C.

2.4.4. Adesão de plaquetas incubadas com puromicina ou ciclohexamida

A suspensão de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaqueta/ml) foi transferida para Eppendorf (200 µl), e incubada com puromicina (10 µM - 1 mM), ou ciclohexamida (50 µM - 1 mM) por 60 min a 37 °C. Em seguida, a suspensão foi incubada com LPS (100 µg/ml), SEB (30 µg/ml) ou solução Krebs-Ringer por 15 min a 37°C.

2.4.5. Transferência das plaquetas do Eppendorf para a placa de adesão

Após as devidas incubações, o conteúdo dos Eppendorfs foi transferido para cada poço da microplaca, na ausência ou na presença de trombina (50 mU/ml). Após 15 min, as plaquetas não aderidas foram removidas, e os poços foram lavados duas vezes com solução de Krebs-Ringer (200 µl/poço). Em seguida, foi adicionado 150 µl/poço do substrato da fosfatase ácida (p-nitrofenilfosfato 5mM em tampão citrato 0,1 M pH 5,4 contendo Triton X-100 0,1%). Após incubação em temperatura ambiente por 60 min, a reação foi interrompida, adicionando-se 100 µl de NaOH 2 N.

2.4.6. Leitura da placa

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

2.5. Teste para verificar adesão de plaquetas ao Eppendorf durante incubação

As plaquetas foram isoladas como descrito anteriormente e ressuspensas em Krebs-Ringer numa concentração final de $1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml. A suspensão plaquetária foi transferida diretamente para placa de ELISA (50 μ l/poço) ou para Eppendorfs (200 μ l), e incubadas com trombina (50 mU/ml), ADP (50 μ M), LPS (100 e 300 μ g/ml), SEA (1 μ g/ml), SEB (30 μ g/ml) ou puromicina (1 mM) por 15, 60 e 120 min à 37°C. Após a incubação, o conteúdo dos Eppendorfs foi adicionado a cada poço da microplaca de ELISA (50 μ l/poço). Em seguida, foi adicionado 150 μ l/poço do substrato da fosfatase ácida (p-nitrofenilfosfato 5 mM em tampão citrato 0,1 M pH 5,4 contendo Triton X-100 0,1%). Depois da incubação em temperatura ambiente por 60 min, a reação foi interrompida pela adição de 100 μ l de NaOH 2 N. A leitura foi medida em ELISA à 405 nm. A porcentagem de células aderidas foi calculada com relação à curva padrão, como descrito anteriormente.

2.6. Determinação dos níveis de AMPc e de GMPc

As plaquetas foram isoladas como descrito anteriormente e ressuspensas em Krebs-Ringer numa concentração final de $1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml. Em seguida, as plaquetas foram incubadas à temperatura ambiente com 2 mM de IBMX (inibidor inespecífico de fosfodiesterase). Após 30 min, as plaquetas foram incubadas com LPS (0,01 - 300 μ g/ml), SEA (0,01 pg - 1 μ g/ml), SEB (0,0001 - 30 μ g/ml) por 15 ou 60 min à 37°C, ou co-incubadas com LPS (100 μ g/ml), SEB (10 μ g/ml) ou SEA (0,1 μ g/ml), na presença de trombina (50 mU/ml) por 60 min à 37°C. Os controles foram realizados

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 min e centrifugadas a 4000 g, 4°C, por 30 min. Os sobrenadantes das amostras foram recolhidos e guardados, sendo os precipitados lavados com 0,5 ml de etanol acidificado gelado (67%), centrifugados novamente à 14000 g à temperatura ambiente por 5 min. Estes sobrenadantes foram adicionados aos primeiros. As amostras foram secas à 55-60°C em banho-maria, sob fluxo de nitrogênio, e estocadas à -20°C.

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

2.7. Ensaios de Agregação plaquetária

A suspensão plaquetária (500 μ l; $1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foi transferida para Eppendorf e incubada com 25 μ l de solução Krebs-Ringer ou LPS (300 μ g/ml) por 5, 15, 60 ou 120 min.

Após a incubação, 400 μ l desta suspensão foi transferida para a cubeta de agregação 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 trombina na concentração mínima capaz de promover 100% de agregação (obtida após a obtenção de uma curva concentração resposta à trombina).

2.8. Medida da mobilização de cálcio

Este método foi originalmente descrito por Pollock e colaboradores (1986).

2.8.1. Marcação das plaquetas com FURA 2-AM

As plaquetas foram isoladas como descrito anteriormente e ressuspensas em Krebs-Ringer numa concentração final de 3×10^8 plaquetas/ml. Em seguida, as plaquetas foram incubadas à temperatura ambiente com $2 \mu\text{M}$ de FURA 2-AM (marcador específico de cálcio). Após 45 min, as plaquetas foram adicionadas de iloprost ($0,8 \mu\text{M}$) e centrifugadas à temperatura ambiente à 600 g por 12 min. O sobrenadante foi desprezado e o resíduo plaquetário cuidadosamente ressuspendido em Krebs-Ringer desprovido de cálcio. O número de plaquetas foi ajustado para $1,2 \times 10^8$ plaquetas /ml.

2.8.2. Incubação das plaquetas com LPS

A suspensão de plaquetas (1000 μl) foi transferida para Eppendorf, e incubada com solução Krebs-Ringer ou LPS (300 $\mu\text{g/ml}$) por 60 min a 37°C .

2.8.3. Obtenção da fluorescência máxima e mínima

A leitura foi realizada em espectrofotômetro de fluorescência marca HITACHI (F-2000), com comprimentos de onda 339 nm (excitação) e 500 nm (emissão), com 400 V de voltagem, conforme descrito abaixo.

No espectrofotômetro de fluorescência, transferiu-se 1 ml da suspensão plaquetária para a cubeta (quartzo), e adicionou-se 0,1 % de Triton X e 1 mM de CaCl_2 , obtendo-se a fluorescência máxima (Fmax); em seguida, adicionou-se $20 \mu\text{M}$ de Tris e 10 mM de EGTA, obtendo-se a fluorescência mínima (Fmin).

Transferiu-se 1 ml da suspensão plaquetária previamente incubada em Eppendorf para a cubeta (quartzo) e adicionou-se 2 mM de EGTA, deixando-se estabilizar por 1 min; em seguida, adicionou-se o estímulo (trombina, 50 mU/ml), obtendo-se valores de fluorescência pós-estímulo de mobilização de cálcio intracelular.

Para a medida da mobilização e influxo de cálcio intracelular transferiu-se 1 ml da suspensão plaquetária previamente incubada em Eppendorf para a cubeta (quartzo) e adicionou-se 1 mM de CaCl_2 , deixando-se estabilizar por 1 min; em seguida adicionou-se

a trombina (50 mU/ml), obtendo-se valores de fluorescência pós-estímulo de mobilização e influxo de cálcio intracelular.

A concentração de cálcio intracelular foi calculada através da seguinte equação: $[Ca^{2+}] = Kd \times (F - Fmin) / (Fmax - F)$, onde $Kd=224$, $F=$ *Fluorescência* obtida, $Fmin=$ *fluorescência mínima* e $Fmax=$ *fluorescência máxima*.

2.9. Citometria de Fluxo

O ensaio de citometria de fluxo foi baseado em estudo prévio (Radomski e col, 2001), e detalhado a seguir.

A suspensão plaquetária (20 μ l; 3×10^8 plaq/ml) foi incubada com solução Krebs-Ringer ou LPS (300 μ g/ml) durante 60 min à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão plaquetária foi incubada com 25 μ l de PAC 1 (PAC-1 FITC; solução 3,125 μ g/ml) ou 25 μ l de anticorpo controle (FITC Mouse IgM), e 5 μ l trombina (550 mU/ml, concentração final de 50 mU/ml) ou Krebs, por 15 min ao abrigo da luz. Adicionou-se, em seguida, 450 μ l de solução Krebs-Ringer (para minimizar a presença de agregados nas amostras de plaquetas, diluído 10 vezes).

A ligação do anticorpo foi quantificada usando um citometro de fluxo (FACSCalibur Becton Dickinson, NJ, EUA) equipado com 488 nm wavelength argon laser, 525 e 575 nm band pass filters.

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 agregados plaquetários ou micropartículas.

2.10. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para N experimentos de diferentes doadores. Diferenças estatísticas significativas foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni. Quando apropriado, teste t de Student não-pareado foi usado para comparar grupos específicos. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS

3.1. LPS

3.1.1. Efeito do LPS na adesão plaquetária ao fibrinogênio

Em nossos experimentos, a adesão basal de plaquetas (6×10^6 plaquetas por poço; 15 min na placa) foi de $7,3 \pm 0,4\%$. A adesão foi significativamente aumentada após a ativação de plaquetas com 50 mU/ml de trombina ($12,9 \pm 0,8\%$, $p < 0.0001$).

A incubação de LPS (0,01 – 300 $\mu\text{g/ml}$) com plaquetas não ativadas (6×10^6 plaquetas/poço) por 5, 15 e 60 min inibiu de maneira dependente da concentração e do tempo a adesão plaquetária (Figura 1). A resposta inibitória máxima ocorreu aos 60 min com 300 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, a qual foi 260% maior que a resposta do LPS, nesta mesma concentração, aos 5 min de incubação (Figura 1). A incubação de plaquetas com LPS durante 120 min também levou à inibição da adesão plaquetária; entretanto, esta inibição não foi dependente da concentração do LPS (Figura 1). A inibição da adesão em 120 min foi significativamente menor quando comparada àquela causada pela incubação de 60 min (Figura 1).

A adesão de plaquetas ativadas por trombina (50 mU/mL) foi inibida pelo LPS (0,01 a 300 $\mu\text{g/mL}$) de maneira discreta quando comparada à inibição da adesão espontânea, em todos os tempos de incubação testados (Figura 1). É interessante notar que, diferentemente da adesão espontânea, o efeito inibitório máximo do LPS na adesão de plaquetas ativadas com trombina foi obtido com 120 min de incubação (Figura 1).

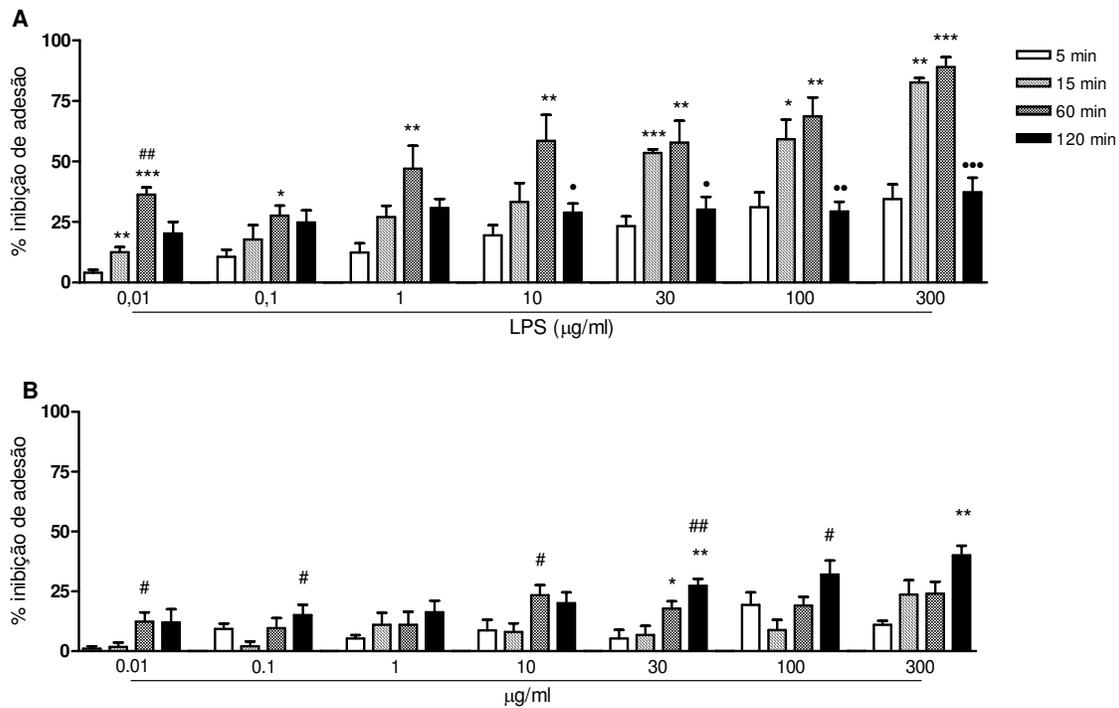


Figura 1. Efeito inibitório da LPS na adesão de plaquetas ao fibrinogênio. As plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) foram incubadas com LPS (0,01 – 300 µg/ml) por 5, 15, 60 e 120 min e a adesão espontânea (Painel A) ou estimulada por trombina (Painel B) foi avaliada após 15 min. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado ao tempo de 5 min; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ comparado ao tempo de 15 min; • $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado ao tempo de 60 min (n= 3–12).

3.1.2. Efeito de LPS sobre a atividade da fosfatase ácida e viabilidade plaquetária

Decidimos avaliar os efeitos diretos de LPS sobre a atividade da fosfatase ácida uma vez que os ensaios de adesão foram quantificados através da determinação da atividade desta enzima.

A incubação de plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) com o substrato da fosfatase ácida apresentou um leitura de densidade ótica (DO) igual a 4,2, que não foi alterado pela incubação com LPS (0,01 – 300 $\mu\text{g/ml}$) por 5, 15, 60 e 120 min (Tabela 1). Isto mostra que o LPS não interfere diretamente com a atividade desta enzima, validando, portanto, nossos resultados de adesão.

Da mesma maneira, o valor da DO de 0,4 obtido na análise da redução do MTT por plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) não foi modificado pela incubação com LPS (0,01 – 300 $\mu\text{g/ml}$) durante 120 min, indicando que o LPS não afeta a viabilidade plaquetária (Tabela 2).

Tabela 1. Efeito de LPS sobre a atividade da fosfatase ácida.

Tratamento	Concentração	15 min	60 min	120 min
Controle		3,9 ± 0,3	4,1 ± 0,1	4,2 ± 0,2
LPS	0,01 µg/ml	3,9 ± 0,3	4,2 ± 0,2	4,2 ± 0,1
	0,1 µg/ml	3,9 ± 0,2	4,2 ± 0,3	4,3 ± 0,5
	1 µg/ml	4 ± 0,1	4,2 ± 0,2	4,3 ± 0,6
	10 µg/ml	4 ± 0,3	4,2 ± 0,2	4,3 ± 0,1
	30 µg/ml	4 ± 0,8	4,2 ± 0,2	4,3 ± 0,1
	100 µg/ml	4 ± 0,2	4,2 ± 0,5	4,4 ± 0,3
	300 µg/ml	4 ± 0,2	4,2 ± 0,6	4,3 ± 0,4

Plaquetas (6×10^6 plaqueta/poço) foram incubadas com LPS (0,01 – 300 µg/ml). Após 5, 15, 60 e 120 min foi medida a atividade da fosfatase ácida. As colunas representam os valores de densidade ópticas medida (n= 3).

Tabela 2. Efeito de LPS sobre a viabilidade plaquetária.

Tratamento	Concentração	MTT
Controle		0,4 ± 0,1
LPS	0,01 µg/ml	0,4 ± 0,1
	0,1 µg/ml	0,4 ± 0,1
	1 µg/ml	0,4 ± 0,1
	10 µg/ml	0,5 ± 0,1
	30 µg/ml	0,5 ± 0,1
	100 µg/ml	0,4 ± 0,1
	300 µg/ml	0,4 ± 0,1

As plaquetas (6×10^6 plaqueta/poço) foram incubadas com LPS (0,01 – 300 µg/ml). A viabilidade plaquetária foi medida após 120 min de incubação (n= 3).

3.1.3. Teste de adesão de plaquetas ao Eppendorf durante a incubação com LPS

Este protocolo experimental teve como objetivo verificar uma possível adesão das plaquetas ao Eppendorf durante as incubações com LPS, visto que isso poderia influenciar os resultados obtidos nos testes de adesão na microplaca revestida com fibrinogênio.

A incubação de plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) diretamente na placa apresentou um leitura da DO igual a 5,6, não sendo significativamente alterada pela incubação em Eppendorfs com o LPS (100 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 15, 60 e 120 min (Tabela 3). Além disso, a adição de agonistas plaquetários como a trombina (50 mU/ml) e o ADP (50 μM) não foi capaz de alterar os valores de DO (Tabela 3). Isto mostra que, em nossas condições experimentais, as plaquetas não aderem ao Eppendorf, mesmo após a incubação com agonistas plaquetários.

Estes resultados, juntamente com aqueles obtidos nos testes de viabilidade plaquetária e de atividade da enzima fosfatase ácida, validam nosso protocolo experimental de adesão para o LPS.

Tabela 3. Determinação do efeito da incubação com LPS sobre a adesão de plaquetas ao Eppendorf.

		0 min	15 min	60 min	120 min
Controle		5,6 ± 0,04	5,6 ± 0,04	5,4 ± 0,08	5,4 ± 0,03
Trombina	50 mU/ml	-	5,2 ± 0,11	5,3 ± 0,04	4,9 ± 0,01
ADP	50 µM	-	5,7 ± 0,07	5,6 ± 0,06	5,4 ± 0,01
LPS	100 µg/ml	-	5,5 ± 0,06	5,4 ± 0,07	5,3 ± 0,02
	300 µg/ml	-	5,5 ± 0,03	5,4 ± 0,05	5,2 ± 0,01

As plaquetas (6×10^6 plaqueta/poço) foram incubadas com trombina (50 mU/ml), ADP (50 µM) ou LPS (100 e 300 µg/mL) por 0, 15, 60 ou 120 min de incubação ao Eppendorf. As colunas representam os valores de densidade óptica a 405 nm (n= 3-6).

3.1.4. Dosagem do AMPc e GMPc em plaquetas incubadas com LPS

Plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço), incubadas durante 60 min com LPS (0,01 – 100 $\mu\text{g/ml}$), não tiveram seus níveis de AMPc significativamente modificados quando comparados ao controle; entretanto, na concentração de 300 $\mu\text{g/ml}$ de LPS houve aumento de 38% deste nucleotídeo cíclico (Tabela 4). A incubação de plaquetas com 100 nM de iloprost (análogo estável de prostaciclina e usado como controle positivo de nossos experimentos) aumentou em 250% os níveis de AMPc em relação ao grupo controle.

A incubação de plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) com LPS (0,01 – 300 $\mu\text{g/mL}$) por 60 min não elevou significativamente os níveis intraplaquetários de GMPc (Tabela 3). Contudo, plaquetas incubadas com nitroprussiato de sódio 100 μM (doador de NO, usado como controle positivo de nossos experimentos) por 60 min aumentaram em 500% os níveis GMPc.

Tabela 4. Dosagem dos níveis de AMPc e de GMPc em plaquetas incubadas com LPS por 60 min.

		AMPc	GMPc
		(pmol/ml)	(pmol/ml)
Controle		90,6 ± 1,1	2,3 ± 0,2
LPS	0,01 µg/ml	75,7 ± 5,6	1,7 ± 0,2
	0,1 µg/ml	77,9 ± 6,2	2,8 ± 0,1
	1 µg/ml	89,8 ± 8,5	2,7 ± 0,1
	10 µg/ml	82,0 ± 8,9	2,5 ± 0,1
	30 µg/ml	71,1 ± 5,2	2,7 ± 0,2
	100 µg/ml	91,8 ± 8,2	2,7 ± 0,3
	300 µg/ml	137,1 ± 12,2	3,0 ± 0,2
Iloprost	100 nM	249,6 ± 71,2*	ND
SNP	100 µM	ND	11,4 ± 0,7*

As plaquetas (6×10^6 plaqueta/poço) foram incubadas com LPS (0,01 – 300 µg/mL). Após 60 min o AMPc ou GMPc foi extraído e quantificado. Os dados estão expressos como pmol/ml (n= 3). ND, não determinado.

3.1.5. Efeito da SOD e da PEG-SOD sobre a inibição promovida pelo LPS

Com o objetivo de verificar a participação de ânion superóxido na resposta inibitória causada pelo LPS em plaquetas, utilizamos dois sequestradores para este ânion, a SOD (100 U/ml) e PEG-SOD (30 U/ml), os quais foram pré-incubados com as plaquetas 5 min antes da adição do LPS. Para tanto, utilizamos três concentrações de LPS (0,01, 100 e 300 µg/ml), e tempos de incubação variando de 15 a 120 min.

A simples incubação de SOD (100 U/ml) com plaquetas por 60 min inibiu a adesão plaquetária espontânea em $18 \pm 2,5\%$ (n=6), ao passo que, a PEG-SOD (30 U/ml, 60 min) não afetou significativamente a adesão. Nossos resultados mostraram que o efeito inibitório do LPS não foi modificado nem pela pré-incubação com SOD (Figura 2), nem com PEG-SOD (Figura 3). Entretanto, a incubação de plaquetas com SOD (100 U/ml) ou PEG-SOD (30 U/ml) reduziu significativamente a inibição da adesão plaquetária espontânea promovida pelo SNP (Figura 4).

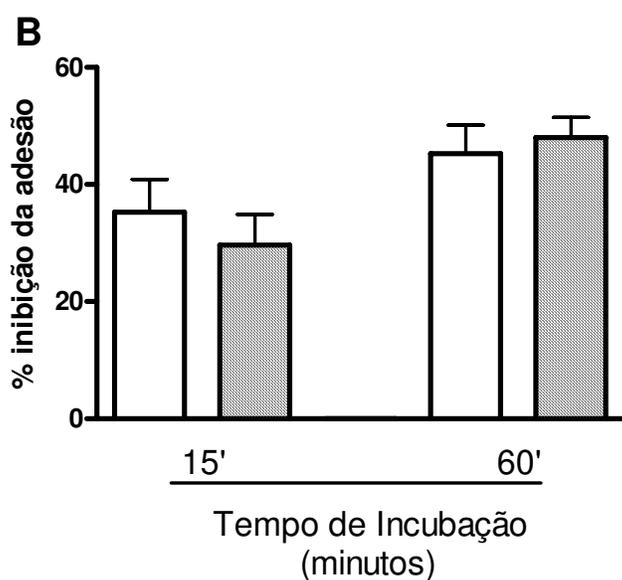
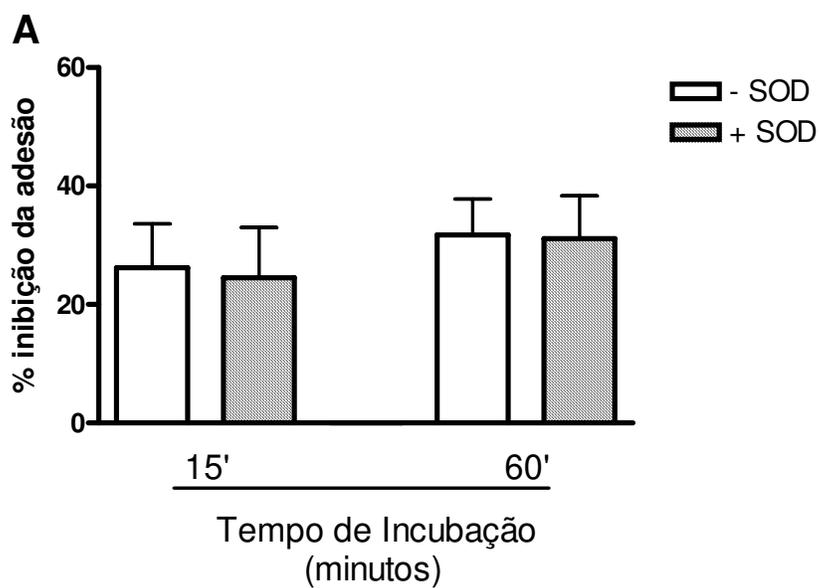


Figura 2. Efeito da SOD na adesão de plaquetas incubadas com LPS. As plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) foram pré-incubadas com SOD (100 U/ml) por 5 min e posteriormente incubadas com LPS nas concentrações de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ (Painel A) ou 100 $\mu\text{g/ml}$ (Painel B) por 15, 60 e 120 min. Os resultados estão expressos como média da porcentagem de inibição de plaquetas aderidas \pm EPM (n= 5-9).

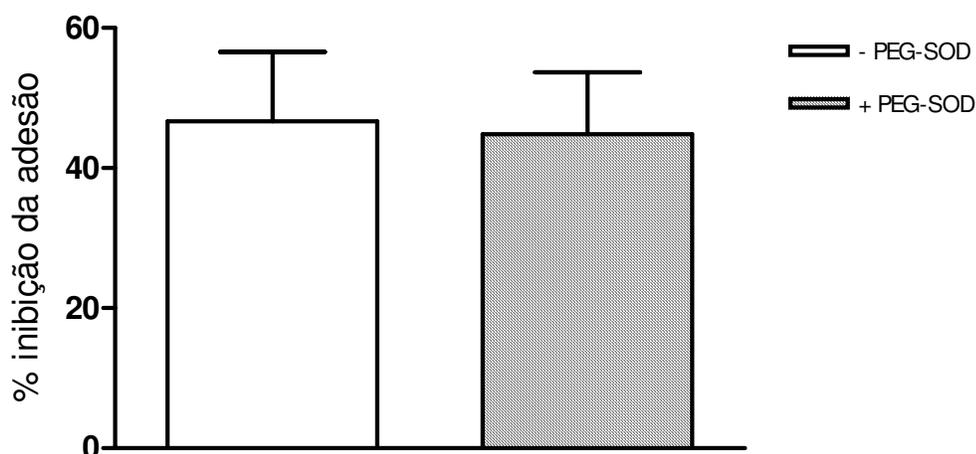


Figura 3. Efeito da PEG-SOD na adesão de plaquetas incubadas com LPS. As plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) foram pré-incubadas com PEG-SOD (30 U/ml) por 5 min e posteriormente incubadas com LPS (300 μ g/ml) por 60 min. Os resultados estão expressos como média da porcentagem de inibição de plaquetas aderidas \pm EPM (n= 4).

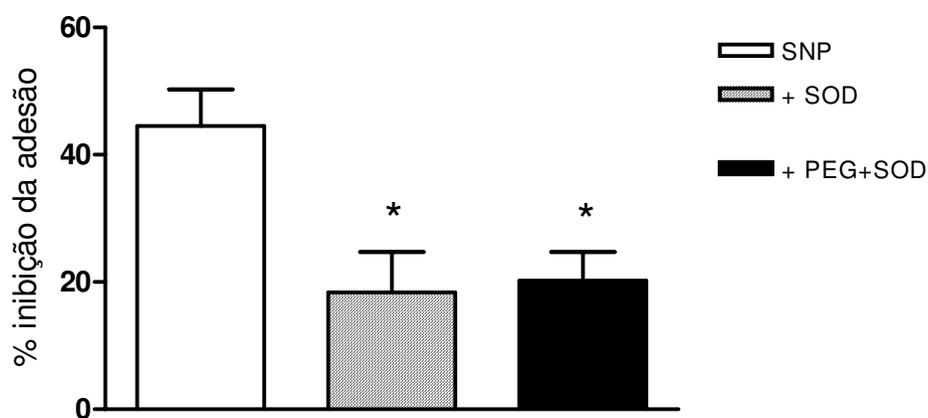


Figura 4. Efeito da SOD e PEG-SOD sobre a inibição na adesão de plaquetas após incubação com SNP. As plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) foram pré-incubadas com SOD (100 U/ml) ou PEG-SOD (30 U/ml) por 5 min, e posteriormente incubadas com SNP (1 mM) por 15 min na placa. Os resultados estão expressos como média da porcentagem de inibição de plaquetas aderidas \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado ao controle (n= 4).

3.1.6. Efeito da PEG-Catalase sobre a inibição promovida pelo LPS

Resolvemos investigar a participação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na inibição da adesão espontânea causada pelo LPS. Para tanto, utilizamos a PEG-Catalase, substância que decompõe o H_2O_2 em água e oxigênio.

A suspensão plaquetária ($1,2 \times 10^8$ plaqueta/ml) foi preincubada com PEG-Catalase (300 e 1000 U/ml) por 5 min antes da incubação com LPS (300 μ g/ml, 60 min). Nossos resultados mostraram que a inibição da adesão plaquetária promovido pelo LPS não foi alterada de forma significativa pela prévia incubação com PEG-Catalase (Figura 5).

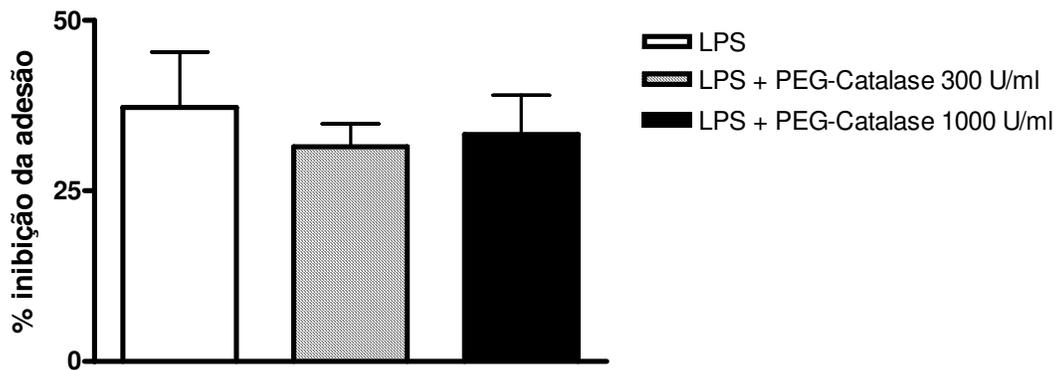


Figura 5. Efeito da PEG-Catalase na adesão de plaquetas incubadas com LPS. As plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) foram pré-incubadas com PEG-Catalase (300 e 1000 U/ml) por 5 min e posteriormente incubadas com LPS (300 μ g/ml, 60 min). Os resultados estão expressos como média da porcentagem de inibição de plaquetas aderidas \pm EPM (n= 7).

3.1.7. Efeito da puromicina e ciclohexamida sobre a inibição promovida pelo LPS

Buscando verificar se o LPS induz a neossíntese de proteínas que expliquem seu efeito inibitório na adesão espontânea de plaquetas, utilizamos dois inibidores de síntese protéica, puromicina (10 μ M - 1 mM) e ciclohexamida (50 μ M - 1 mM), que foram pré-incubados por 60 min antes da incubação com LPS por 15 ou 60 min.

Interessantemente, a incubação de plaquetas somente com puromicina (100 μ M e 1 mM), por 60 min, levou a uma inibição significativa da adesão plaquetária espontânea ao fibrinogênio (Figura 6); do mesmo modo, a prévia incubação de plaquetas com ciclohexamida (500 μ M e 1 mM), por 120 min, também inibiu a adesão plaquetária espontânea ao fibrinogênio, porém com uma menor magnitude quando comparado à puromicina (Figura 6).

Entretanto, nossos resultados mostraram que a inibição da adesão espontânea de plaquetas promovida pelo LPS (100 μ g/ml), após 15 min de incubação, não é modificada de modo significativo pela pré-incubação com puromicina em todas as concentrações testadas (10 μ M - 1 mM) (Figura 7). O mesmo foi observado com ciclohexamida (50 μ M - 1 mM), que também não foi capaz de alterar a resposta inibitória do LPS (300 μ g/ml; 60 min) sobre a adesão espontânea de plaquetas ao fibrinogênio (Figura 8).

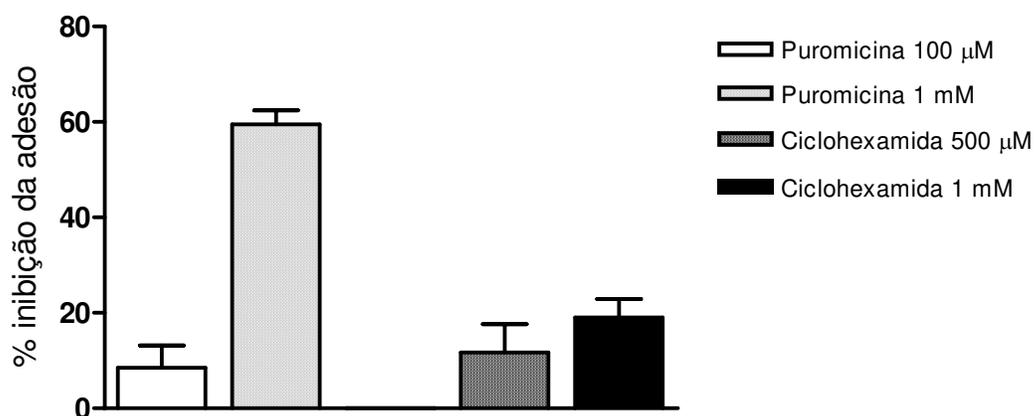


Figura 6. Efeito da puromicina e ciclohexamida na adesão de plaquetas ao fibrinogênio. As plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) foram incubadas com puromicina (100 µM - 1mM) ou ciclohexamida (500 µM – 1 mM) por 120 min e a inibição da adesão foi avaliada após 15 min. Os resultados estão expressos como média da porcentagem de inibição de plaquetas aderidas \pm EPM (n= 4).

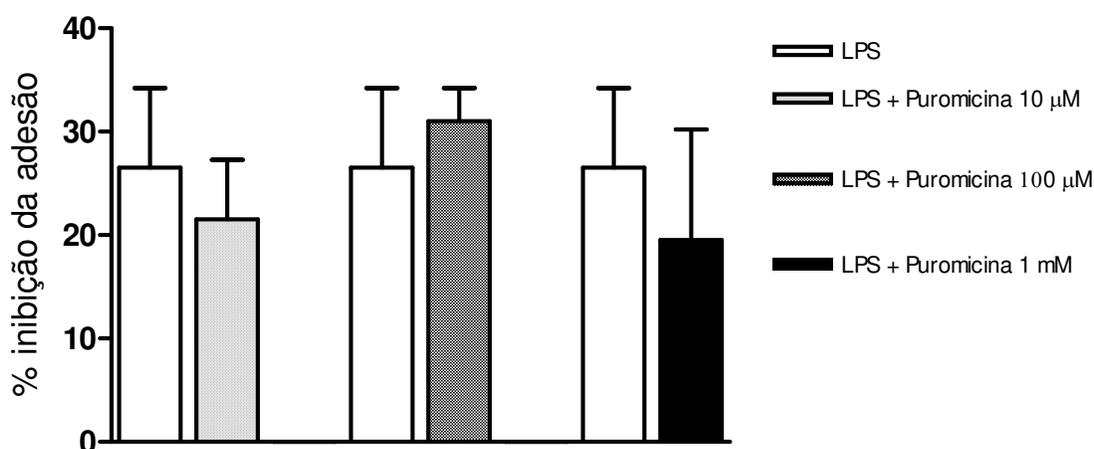


Figura 7. Efeito da puromicina na adesão de plaquetas incubadas com LPS. As plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) foram pré-incubadas com puromicina (10 µM - 1mM) por 60 min e posteriormente incubadas com LPS (100 µg/ml) por 15 min. Os resultados estão expressos como média da porcentagem de inibição de plaquetas aderidas \pm EPM (n= 4).

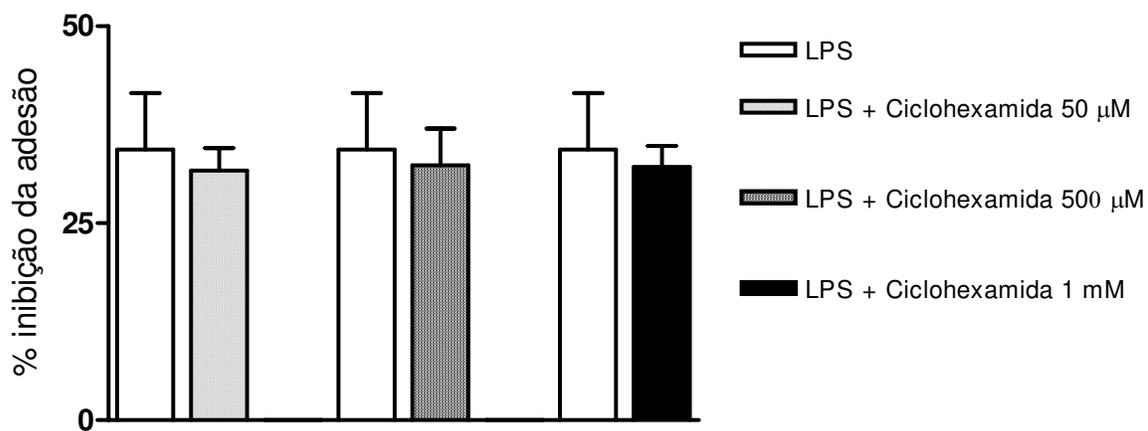


Figura 8. Efeito da ciclohexamida na adesão de plaquetas incubadas com LPS. As plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) foram pré-incubadas com ciclohexamida (50 μM - 1mM) por 120 min e posteriormente incubadas com LPS (300 μg/ml) por 60 min. Os resultados estão expressos como média da porcentagem de inibição de plaquetas aderidas \pm EPM (n= 4).

3.1.8. Efeitos do LPS sobre a mobilização intracelular de cálcio em plaquetas

Com o intuito de verificar se a resposta mediada pelo LPS em plaquetas humanas afetaria a concentração intracelular de cálcio, realizamos experimentos utilizando o marcador de cálcio FURA 2-AM. Para estimular a liberação de cálcio intraplaquetário, utilizamos como agonista a trombina (50 mU/ml).

Na presença de CaCl_2 , a mobilização total de cálcio intracelular promovida pela trombina (50 mU/ml) diminuiu significativamente após a prévia incubação com o LPS (300 $\mu\text{g/ml}$; 60 min), com uma diminuição de aproximadamente 65 % (Figura 9A). Entretanto, na presença de EGTA (quelante de cálcio), a incubação de plaquetas com LPS (300 $\mu\text{g/ml}$; 60 min) não alterou significativamente a mobilização de cálcio intracelular em resposta à trombina (50 mU/ml; Figura 9B).

Deste modo, nossos resultados mostraram claramente que o LPS não afeta a mobilização intracelular de cálcio; entretanto, praticamente abole o influxo de cálcio (Tabela 5).

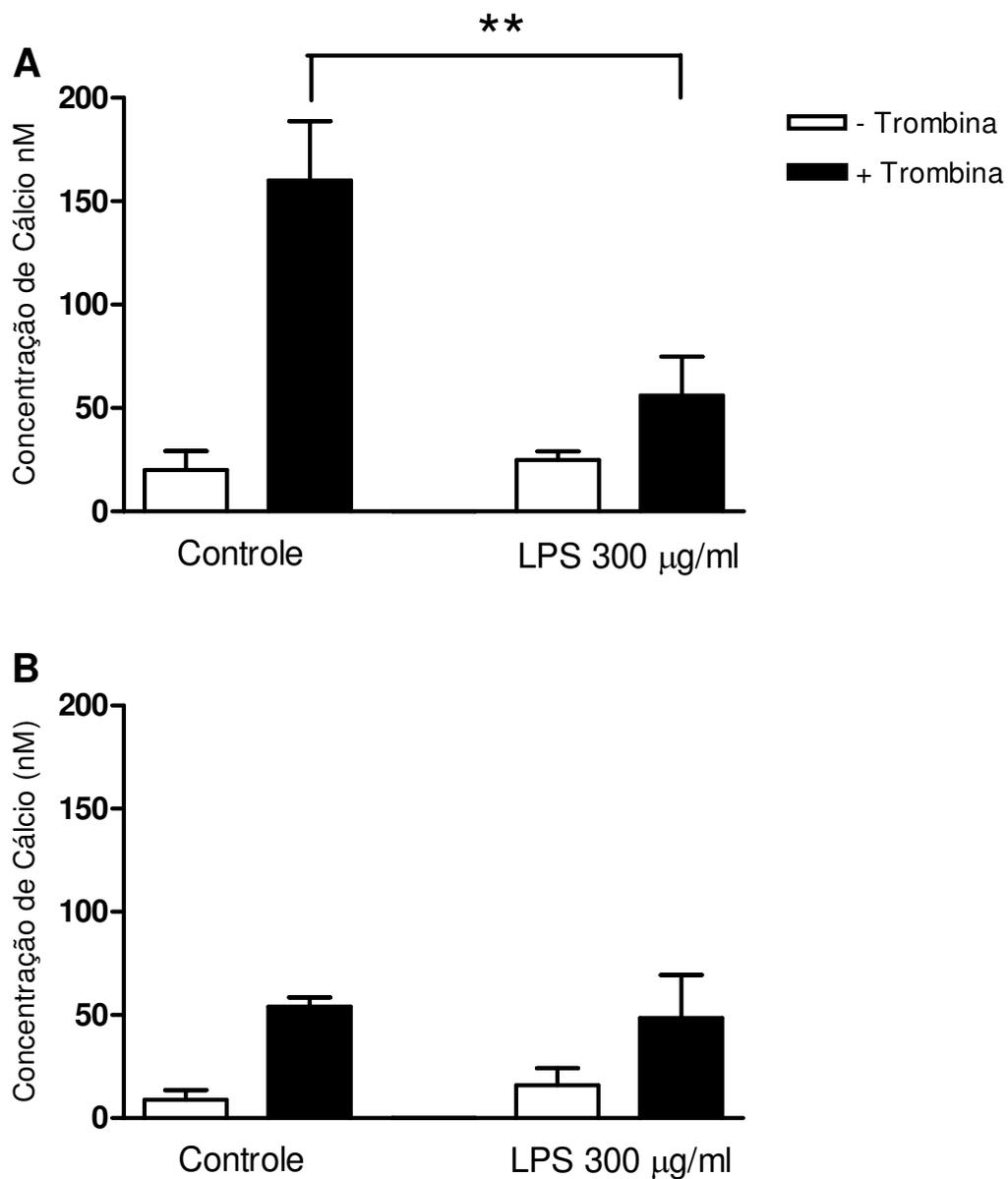


Figura 9. Efeito do LPS sobre a mobilização de cálcio intracelular em plaquetas. As plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foram incubadas com LPS (300 µg/ml) por 60 min. A mobilização de cálcio foi induzida pela adição de trombina (50 mU/ml), na presença de CaCl_2 (1mM, painel A) ou EGTA (2 mM, painel B). Os resultados estão expressos como média da concentração de cálcio em nM \pm EPM. ** $p < 0,01$ comparado ao controle (n= 3).

Tabela 5. Efeito do LPS na mobilização total, mobilização intracelular e influxo de cálcio estimulado por trombina

	Mobilização Total de Cálcio (nM)	Mobilização Intracelular de Cálcio	Influxo de Cálcio
Controle (Krebs)	160,13 ± 28,58	54,08 ± 4,47	106,05 ± 24,43
LPS (300 µg/ml)	56,09 ± 18,78**	48,57 ± 20,86	7,52 ± 3,93 *

As plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foram incubadas com LPS (300 µg/ml) por 60 min. A mobilização de cálcio foi induzida pela adição de trombina (50 mU/ml). Os resultados estão expressos como média dos valores absolutos da concentração de cálcio em nM ± EPM . * p<0,05, ** p<0,01 comparado ao grupo controle (n=3).

3.1.9. Efeito do LPS na agregação plaquetária induzida por trombina

De modo similar à adesão, a incubação de LPS (300 µg/ml) com plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por trombina (10 – 50 mU/ml) de maneira dependente do tempo. Nos menores tempos de incubação com LPS (300 µg/ml; 5 e 15 min) não foi vista alterações significativas na agregação plaquetária induzida por trombina (10 – 50 mU/ml; Figuras 10A e 10B); entretanto, com tempos maiores de incubação (60 e 120 min), a agregação de plaquetas se mostrou marcadamente inibida (Figuras 10C e 10D), sendo praticamente abolida após após 120 min de incubação com LPS (300 µg/ml) (Figura 10D).

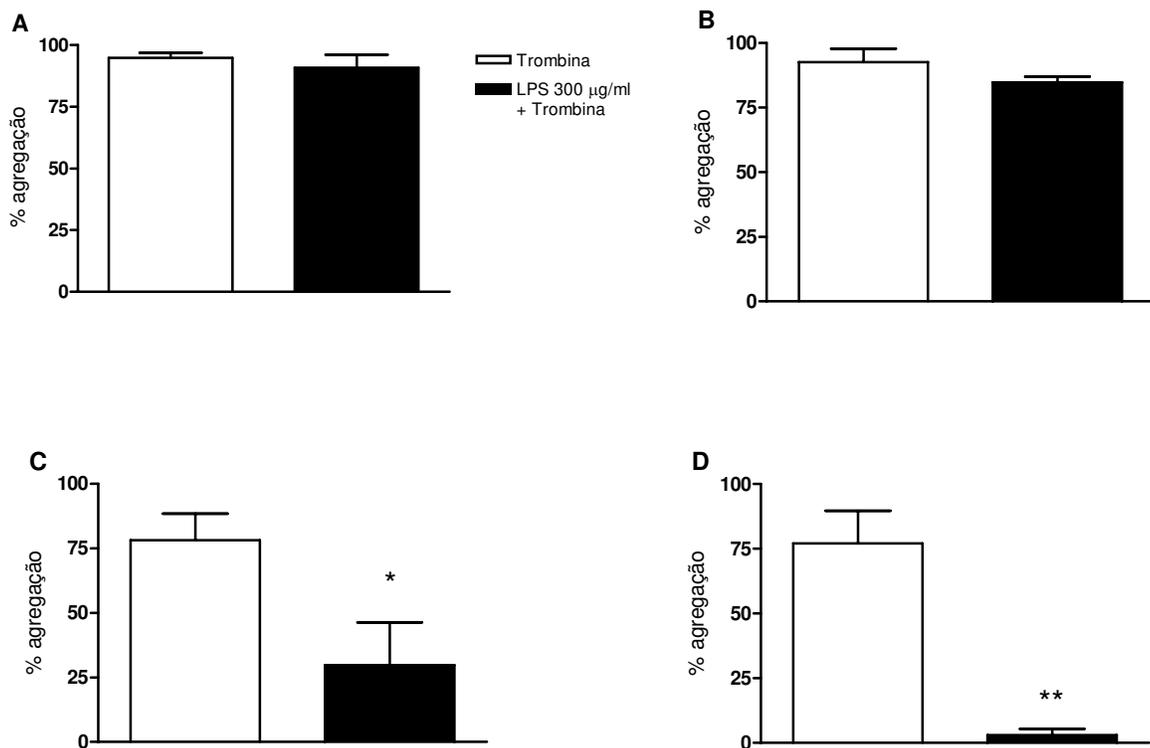


Figura 10. Efeito da incubação do LPS por 60 min na agregação de plaquetas induzida por trombina. As plaquetas ($500 \mu\text{l}$; $1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foram incubadas com LPS ($300 \mu\text{g/mL}$) por 5 (painel A), 15 (painel B), 60 (painel c) e 120 min (painel D) e a agregação foi induzida por trombina ($10 - 50 \text{ mU/ml}$). Os resultados estão expressos como média da porcentagem de agregação plaquetária \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado ao controle ($n = 4-5$).

3.1.10 Efeito do LPS sobre a ativação da glicoproteína IIb/IIIa

Com o intuito de verificar se a resposta inibitória mediada pelo LPS em plaquetas humanas ocorreria devido à diminuição na ativação de seu principal receptor de membrana, a GPIIb/IIIa (responsável pela ligação ao fibrinogênio e ao fator de Von Willebrand), realizamos experimentos utilizando um marcador específico para quantificar a expressão desta glicoproteína em sua forma ativada, o PAC-1. Para tanto realizamos a leitura em citômetro de fluxo. Para estimular a ativação da GPIIb/IIIa utilizamos como agonista a trombina (5 - 50 mU/ml).

Nossos resultados mostraram que a ligação de PAC-1 a plaquetas não tratadas (ausência de LPS) estimuladas com trombina (5 – 50 mU/ml) aumentou de modo dependente da concentração de trombina (Figura 11). Entretanto, a incubação prévia de plaquetas com LPS (300 µg/ml, 60 min) não modificou significativamente a ligação do PAC-1 às plaquetas em nenhuma das concentrações testadas de trombina (5 – 50 mU/ml).

Do mesmo modo, a ligação do anticorpo controle, FITC Mouse IgM, não foi afetada nem pela adição de LPS (300 µg/ml, 60 min) nem de trombina (5 – 50 mU/ml) (Tabela 6).

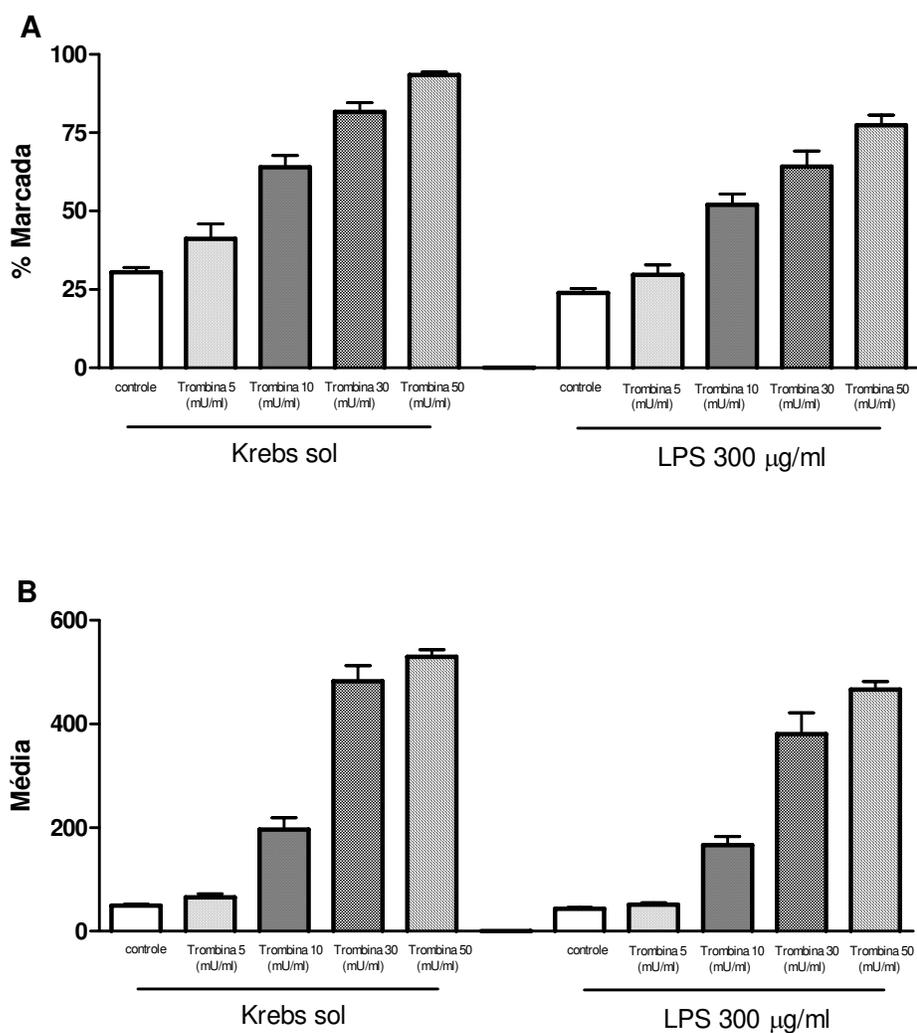


Figura 11. Efeito da incubação do LPS sobre a expressão de glicoproteína IIb/IIIa ativada em plaquetas não estimuladas e estimulada com trombina (5-50 mU/ml). As plaquetas (6×10^6 plaquetas) foram incubadas com LPS (300 µg/ml) por 60 min; após este período foram ativadas ou não com trombina (5 - 50 mU/ml) e a ligação ao PAC-1 foi quantificada. Os resultados estão expressos como: A - porcentagem de células marcadas \pm EPM; B - média de fluorescência \pm EPM (n= 3).

Tabela 6. Efeito da incubação do LPS sobre a ligação a FITC-IgM

Tratamento	Fluorescência
Krebs	35,5 ± 3,6
LPS 300 µg/ml	34,9 ± 3,6
Trombina 5 mU/ml	36,1 ± 0,5
Trombina 10 mU/ml	35,1 ± 0,7
Trombina 30 mU/ml	34,2 ± 1,1
Trombina 50 mU/ml	38,6 ± 4,7
LPS 300 µg/ml + Trombina 5 mU/ml	34,4 ± 0,5
LPS 300 µg/ml + Trombina 10 mU/ml	35,3 ± 0,7
LPS 300 µg/ml + Trombina 30 mU/ml	34,6 ± 1,1
LPS 300 µg/ml + Trombina 50 mU/ml	36,7 ± 4,7

As plaquetas (6×10^6 plaquetas) foram incubadas com Krebs ou LPS (300 µg/ml) por 60 min. Após este período foram ativadas com trombina (5 – 50 mU/ml) e a ligação ao IgM foi quantificada. Os resultados estão expressos como média de fluorescência ± EPM (n=3-10).

3.2. Enterotoxinas estafilocócicas

3.2.1 Efeito da SEA na adesão plaquetária ao fibrinogênio

A incubação de SEA (0,01 pg – 1 µg/ml) com plaquetas não ativadas (6×10^6 plaquetas/poço) por 5, 15 e 60 inibiu de maneira dependente do tempo a adesão plaquetária (Figuras 12). Quando as plaquetas foram incubadas com concentrações menores de SEA (0,01 pg – 0,01 ng/ml) por 120 min, a inibição da adesão foi significativamente menor quando comparada ao período de incubação de 60 min (Figura 12). A resposta máxima de inibição ocorreu com 1 µg/ml de SEA por 60 min, a qual foi 35% maior que a resposta da SEA, nesta mesma concentração, aos 5 min (Figura 12).

A adesão de plaquetas ativadas por trombina (50 mU/ml) foi inibida pela SEA (0,01 pg – 1 µg/ml). Porém, de maneira discreta quando comparada à inibição da adesão espontânea, em todos os tempos de incubação testados (Figura 12). Do mesmo modo, efeito inibitório máximo da SEA na adesão de plaquetas ativadas foi obtido com 120 min de incubação (figura 12).

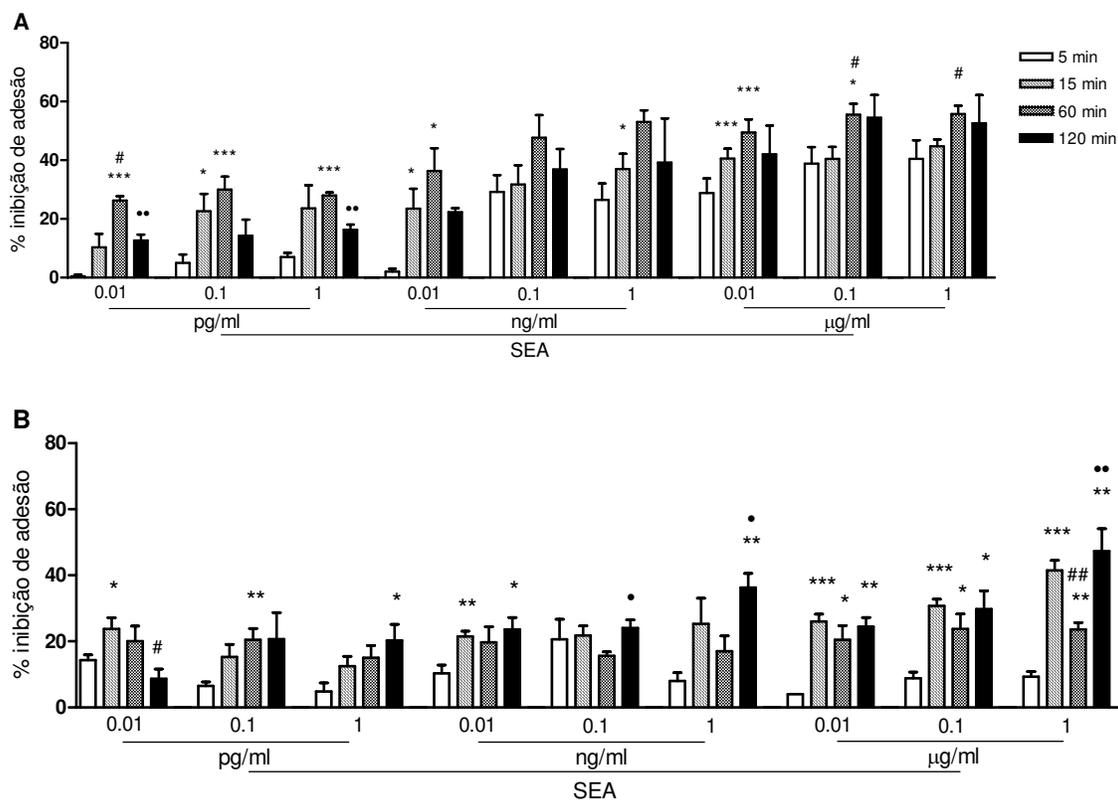


Figura 12. Efeito inibitório da SEA na adesão de plaquetas ao fibrinogênio.

As plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) foram incubadas com SEA (0,01 pg – 1 µg/ml) por 5, 15, 60 e 120 min e a adesão espontânea (Painel A) ou estimulada por trombina (Painel B) foi avaliada após 15 min.. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado ao tempo de 5 min; # $p < 0,05$, ### $p < 0,01$ comparado ao tempo de 15 min; • $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, comparado ao tempo de 60 min (n= 3–9).

3.2.2. Efeito da SEB na adesão plaquetária ao fibrinogênio

A incubação de plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) por 5 min com a SEB (0,0001 – 30 $\mu\text{g/ml}$) causou inibição significativa da adesão plaquetária, sendo este efeito independente da concentração (Figura 13). Quando o tempo de incubação de plaquetas e SEB foi aumentado para 15 e 60 min, observou-se um aumento da inibição plaquetária, sendo esta resposta dependente de concentração desta enterotoxina (Figuras 13). A incubação de plaquetas com concentrações maiores de SEB (0,1 – 30 $\mu\text{g/ml}$), por 120 min, causou diminuição de efeito inibitório desta enterotoxina quando comparado ao tempo de 60 min (Figuras 13). A inibição máxima da adesão plaquetária foi observada quando as plaquetas foram incubadas com SEB por 60 min (Figura 13).

A adesão de plaquetas ativadas por trombina (50 mU/ml) foi inibida pela SEB (0,0001 – 30 $\mu\text{g/ml}$); porém, a amplitude desta resposta foi menor quando comparada à inibição da adesão espontânea, em todos os tempos de incubação testados (Figura 13). Entretanto, diferentemente da resposta inibitória promovida pelo LPS e SEA, o efeito inibitório máximo da SEB na adesão de plaquetas ativadas foi obtido com 60 min de incubação, declinando após 120 min de incubação (Figura 13).

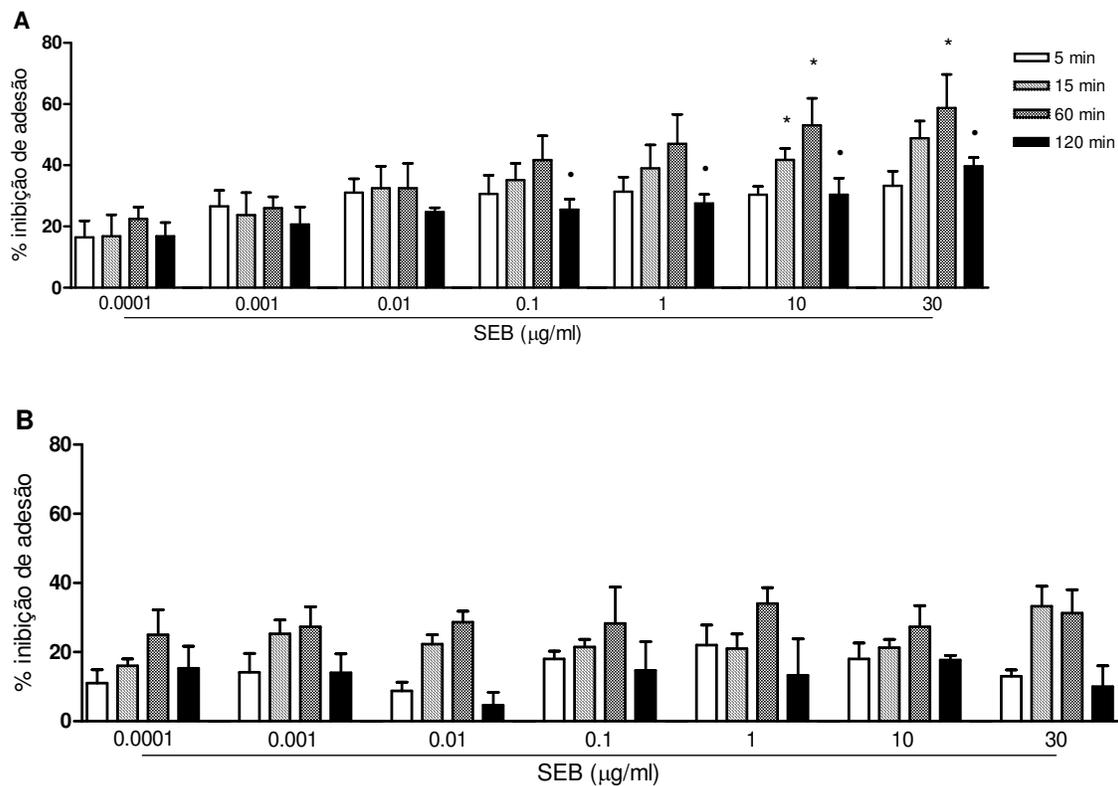


Figura 13. Efeito inibitório da SEB na adesão de plaquetas ao fibrinogênio. As plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) foram incubadas com SEB (0,0001 – 30 $\mu\text{g/ml}$) por 5, 15, 60 e 120 min e a adesão espontânea (Painel A) ou estimulada por trombina (Painel B) foi avaliada após 15 min. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado ao tempo de 5 min; # $p < 0,05$, ### $p < 0,01$ comparado ao tempo de 15 min; • $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, comparado ao tempo de 60 min ($n = 3-10$).

3.2.3. Determinação do efeito da SEA ou SEB sobre a atividade da fosfatase ácida e viabilidade plaquetária

Assim como realizado para o LPS, avaliamos os efeitos diretos da SEA e SEB sobre a atividade da fosfatase ácida, uma vez que os ensaios de adesão foram quantificados através da determinação da atividade desta enzima.

A incubação de plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) com o substrato para fosfatase ácida apresentou um valor de DO igual a 4,2, não sendo alterado pela incubação com a SEA (0,01 pg – 1 µg/ml) ou SEB (0,0001 – 30 µg/ml) para todos os tempos testados (5, 15, 60 e 120 min) (Tabela 7). Isto mostra que estas toxinas não interferem diretamente com a atividade de fosfatase ácida.

Da mesma forma, a redução do MTT por plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) não foi modificada pela prévia incubação com a SEA (0,01 pg – 1 µg/ml) ou SEB (0,0001 – 30 µg/ml) durante 120 min, evidenciando que estas toxinas não interferem com a viabilidade plaquetária (Tabela 8).

Tabela 7. Efeito da SEA e SEB sobre a atividade da fosfatase ácida

Tratamento	Concentração	15 min	60 min	120 min
Controle		3,9 ± 0,3	4,1 ± 0,1	4,2 ± 0,2
SEA	0,01 pg/ml	4 ± 0,1	4,2 ± 0,7	4,2 ± 0,2
	0,1 pg/ml	4,1 ± 0,1	4,2 ± 0,8	4,2 ± 0,1
	1 pg/ml	4 ± 0,3	4,2 ± 0,2	4,3 ± 0,3
	0,01 ng/ml	4 ± 0,5	4,2 ± 0,3	4,4 ± 0,2
	0,1 ng/ml	4 ± 0,4	4,2 ± 0,2	4,4 ± 0,3
	1 ng/ml	4 ± 0,1	4,2 ± 0,1	4,4 ± 0,2
	0,01 µg/ml	4 ± 0,1	4,2 ± 0,5	4,6 ± 0,1
	0,1 µg/ml	4 ± 0,1	4,2 ± 0,5	4,3 ± 0,5
	1 µg/ml	4 ± 0,3	4,2 ± 0,1	4,3 ± 0,8
	SEB	0,0001 µg/ml	4 ± 0,2	4,2 ± 0,1
0,001 µg/ml		4 ± 0,2	4,2 ± 0,3	4,3 ± 0,2
0,01 µg/ml		4 ± 0,3	4,2 ± 0,3	4,3 ± 0,2
0,1 µg/ml		4 ± 0,7	4,2 ± 0,2	4,2 ± 0,1
1 µg/ml		3,9 ± 0,2	4,1 ± 0,2	4,3 ± 0,2
10 µg/ml		3,9 ± 0,2	4,2 ± 0,2	4,3 ± 0,5
30 µg/ml		4 ± 0,2	4,2 ± 0,3	4,5 ± 0,4

Plaquetas (6×10^6 plaqueta/poço) foram incubadas com SEA (0,01 pg – 1 µg/ml) e SEB (0,0001 – 30 µg/ml). Após 5, 15, 60 e 120 min foi medida a atividade da fosfatase ácida. As colunas representam os valores de densidade ópticas medida (n= 3).

Tabela 8. Efeito da SEA e SEB sobre a viabilidade plaquetária

Tratamento	Concentração	MTT
Controle		0,4 ± 0,1
SEA	0,01 pg/ml	0,4 ± 0,1
	0,1 pg/ml	0,5 ± 0,1
	1 pg/ml	0,4 ± 0,1
	0,01 ng/ml	0,5 ± 0,1
	0,1 ng/ml	0,4 ± 0,1
	1 ng/ml	0,5 ± 0,2
	0,01 µg/ml	0,4 ± 0,1
	0,1 µg/ml	0,4 ± 0,1
	1 µg/ml	0,5 ± 0,0
SEB	0,0001 µg/ml	0,4 ± 0,1
	0,001 µg/ml	0,4 ± 0,1
	0,01 µg/ml	0,5 ± 0,1
	0,1 µg/ml	0,5 ± 0,1
	1 µg/ml	0,5 ± 0,1
	10 µg/ml	0,4 ± 0,0
	30 µg/ml	0,5 ± 0,1

Plaquetas (6×10^6 plaqueta/poço) foram incubadas com SEA (0,01 pg – 1 µg/ml) e SEB (0,0001 – 30 µg/ml). Após 120 min foi medida a viabilidade plaquetária. A coluna representa o valor de densidade óptica medida (n= 3).

3.2.4. Teste para verificar a adesão de plaquetas ao Eppendorf durante a incubação com SEA ou SEB

À semelhança do LPS, resolvemos investigar se haveria adesão das plaquetas ao Eppendorf durante as incubações com SEA ou SEB, tendo em vista que isso poderia influenciar os resultados obtidos nos testes de adesão na microplaca revestida com fibrinogênio.

A incubação de plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) diretamente na placa apresentou um leitura da DO igual a 5,6 que não foi significativamente modificada pela incubação em Eppendorfs com a SEA (0,01 pg – 1 µg/ml) ou SEB (0,0001 – 30 µg/ml) por 15, 60 e 120 min (Tabela 9). Além disso, a adição de agonistas plaquetários como a trombina (50 mU/ml) e o ADP (50 µM) não também foi capaz de alterar o valor da DO (Tabela 9). Isto mostra que, em nossas condições experimentais, as plaquetas não estariam aderindo ao Eppendorf (mesmo após a incubação com agonistas plaquetários).

Estes resultados, juntamente com aqueles de viabilidade plaquetária e de atividade da enzima fosfatase ácida, validam nosso protocolo experimental de adesão para a SEA e SEB.

Tabela 9. Determinação do efeito da SEA e SEB sobre a adesão de plaquetas ao Eppendorf

		0 min	15 min	60 min	120 min
Controle		5,6 ± 0,04	5,6 ± 0,04	5,4 ± 0,08	5,4 ± 0,03
Trombina	50 mU/ml	-	5,2 ± 0,11	5,3 ± 0,04	4,9 ± 0,01
ADP	50 µM	-	5,7 ± 0,07	5,6 ± 0,06	5,4 ± 0,01
SEA	1 µg/ml	-	5,6 ± 0,06	5,5 ± 0,03	5,3 ± 0,09
SEB	30 µg/ml	-	5,6 ± 0,08	5,5 ± 0,05	5,3 ± 0,07

Plaquetas (6×10^6 plaqueta/poço) foram incubadas com trombina (50 mU/ml), ADP (50 µM), SEA (1 µg/ml), SEB (30 µg/ml) ou puromicina (1 mM) após 0, 15, 60 ou 120 min de incubação no Eppendorf. As colunas representam os valores de densidade óptica a 405 nm (n= 3-6).

3.2.5. Dosagem do AMPc e GMPc em plaquetas incubadas com SEA ou SEB

Plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) incubadas com SEA (0,01 pg – 1 µg/ml) durante 60 min apresentaram um discreto aumento dos níveis intracelulares de AMPc não dependente da concentração de SEA (Tabela 10). Por outro lado, a preincubação de plaquetas com SEB (0,001 – 30 µg/ml) não foi capaz de aumentar as concentrações intracelulares de AMPc (Tabela 11). A incubação de plaquetas com 100 nM de iloprost (análogo estável de prostaciclina e usado como controle positivo de nossos experimentos) aumentou em 250% os níveis de AMPc em relação ao grupo controle.

A incubação de plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) com SEA (0,01 pg - 1 µg/ml) durante 60 min não alterou significativamente os valores de GMPc quando comparado com os valores obtidos em amostras controle ($2,05 \pm 0,24$ pmol/ml) (Tabela 10). Da mesma forma, a prévia incubação plaquetária com a SEB (0,001 – 30 µg/ml) por 60 min, não alterou significativamente os níveis intraplaquetários de GMPc (Tabela 11), embora uma discreta tendência possa ser observada, em torno de 20%. Porém, o aumento promovido pelo SNP foi de 555% (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10. Dosagem dos níveis de AMPc e de GMPc em plaquetas incubadas com SEA por 60 min

		AMPc (pmol/ml)	GMPc (pmol/ml)
Controle		90,57 ± 1,57	2,05 ± 0,24
SEA	0,01 pg/ml	91,55 ± 3,18	2,11 ± 0,68
	0,1 pg/ml	87,13 ± 8,53	2,20 ± 0,55
	1 pg/ml	106,97 ± 10,22	2,21 ± 0,36
	0,01 ng/ml	102,45 ± 4,08	1,93 ± 0,29
	0,1 ng/ml	89,09 ± 4,02	2,05 ± 0,46
	1 ng/ml	103,83 ± 16,55	ND
	0,01 µg/ml	132,85 ± 7,83	2,70 ± 0,20
	0,1 µg/ml	127,07 ± 18,39	1,09 ± 0,38
	1 µg/ml	100,97 ± 1,39	2,11 ± 0,47
Iloprost	100 nM	249,63 ± 71,21	ND
SNP	100 µM	ND	11,37 ± 0,71

Plaquetas (6×10^6 plaqueta/poço) foram incubadas com SEA (0.01 pg – 1 µg/ml). Após 60 min o AMPc ou GMPc foi extraído e quantificado. Os dados estão expressos como pmol/ml (n= 3 – 4). ND, não detreminado.

Tabela 11. Dosagem dos níveis de AMPc e de GMPc em plaquetas incubadas com SEB por 60 min

		AMPc (pmol/ml)	GMPc (pmol/ml)
Controle		90,57 ± 1,04	2,3 ± 0,2
SEB	0,001 µg/ml	77,18 ± 3,18	ND
	0,01 µg/ml	80,41 ± 0,18	2,8 ± 0,1
	0.1 µg/ml	82,38 ± 1,32	2,7 ± 0,1
	1 µg/ml	75,18 ± 0,69	2,5 ± 0,1
	10 µg/ml	77,27 ± 1,46	2,7 ± 0,2
	30 µg/ml	81,27 ± 3,35	2,7 ± 0,3
Iloprost	100 nM	249,63 ± 71,21	ND
SNP	100 µM	ND	11,4 ± 0,7

Plaquetas (6×10^6 plaqueta/poço) foram incubadas com SEB (0.0001 – 30 µg/ml). Após 60 min, o AMPc ou GMPc foi extraído e quantificado. Os dados estão expressos como pmol/ml (n= 3 – 4). ND, não detreminado.

3.2.6. Efeito da puromicina sobre a inibição promovida pela SEB

Buscando verificar se os efeitos inibitórios observados na adesão de plaquetas após a incubação com SEB envolvem a neo-síntese de proteínas, usamos a puromicina (10 μ M - 1 mM), que foi incubada por 60 min antes da incubação com SEB.

Entretanto, a inibição da adesão de plaquetas promovida pela SEB (30 μ g/ml) não foi modificada de modo significativo pela puromicina (Figura 14), indicando o não envolvimento de proteínas neosintetizadas na resposta plaquetária a SEB.

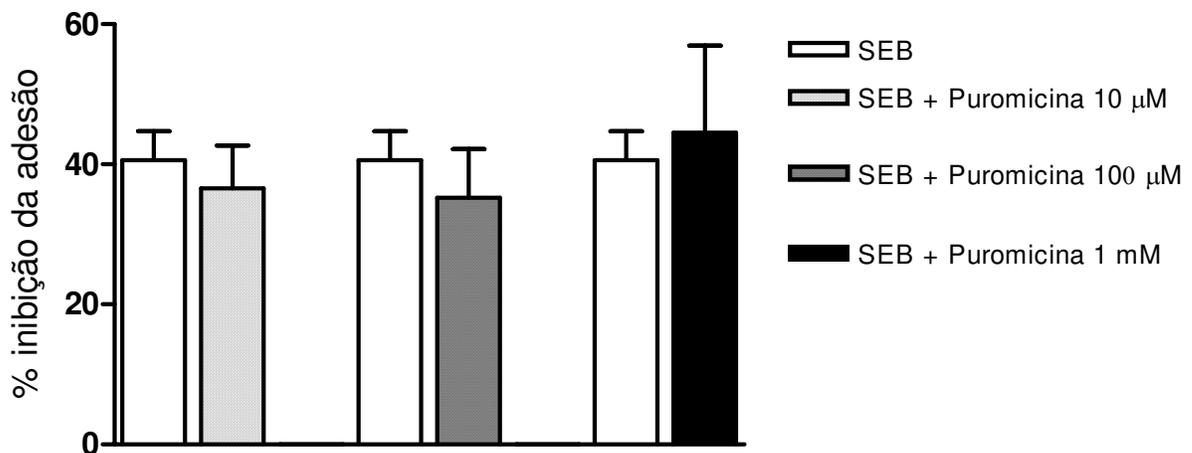


Figura 14. Efeito da puromicina na adesão de plaquetas incubadas com SEB.

As plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) foram pré-incubadas com puromicina (10 μ M – 1 mM) por 60 min e posteriormente incubadas com SEB (30 μ g/ml) por 60 min. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM (n= 8-14).

3.2.7. Efeito da SOD e PEG-SOD sobre a inibição promovida pela SEB

Resolvemos investigar se haveria a participação de ânion superóxido na resposta mediada pela SEB em plaquetas humanas. Para tanto, utilizamos a SOD (100 U/ml) e a PEG-SOD (30 U/ml), as quais foram pré-incubadas com as plaquetas por 5 min antes da SEB (30 µg/ml, 60 min).

Nossos resultados mostraram claramente que o efeito inibitório da SEB não foi alterado de maneira significativa pela SOD e PEG-SOD (Figuras 15). Desta forma, excluimos a participação de ânion superóxido na resposta inibitória da SEB.

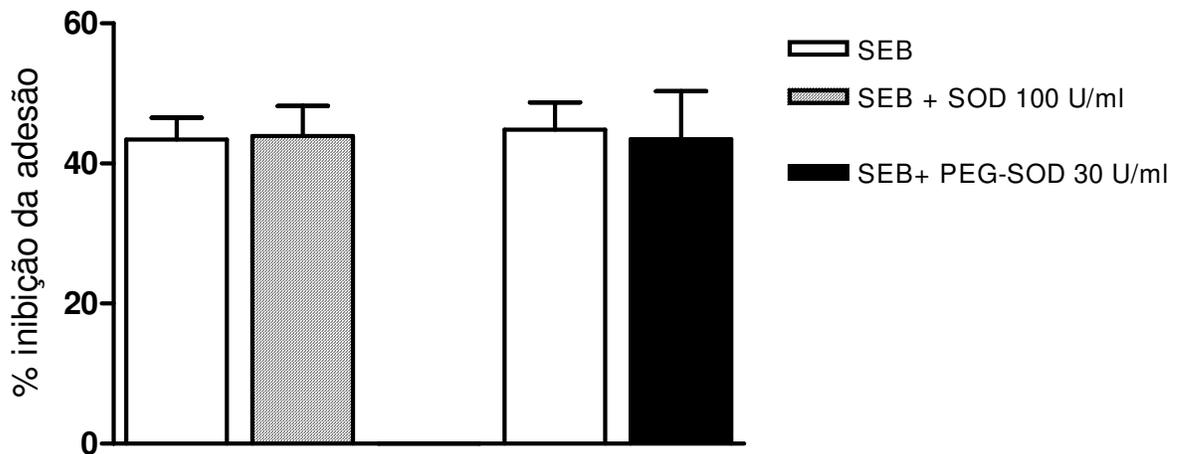


Figura 15. Efeito da SOD e PEG-SOD na adesão de plaquetas incubadas com SEB. As plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) foram pré-incubadas com SOD (100 U/ml) ou PEG-SOD (30 U/ml) por 5 min e posteriormente incubadas com SEB (30 µg/ml) por 60 min. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM (n= 13-18).

3.2.8. Efeito da PEG-Catalase sobre a inibição promovida pela SEB

Ainda investigando se a resposta observada na adesão de plaquetas após a incubação com SEB envolveria espécies reativas de oxigênio, resolvemos investigar a participação do H₂O₂. Para isso, utilizamos PEG-catalase (300 e 1000 U/ml), preincubada por 5 min antes da incubação com SEB (30 µg/ml) por 60 min. Nossos resultados mostraram que a preincubação com PEG-Catalase, na maior concentração utilizada (1000 U/ml), foi capaz de prevenir significativamente o efeito inibitório promovido pela SEB na adesão de plaquetas humanas (Figura 16).

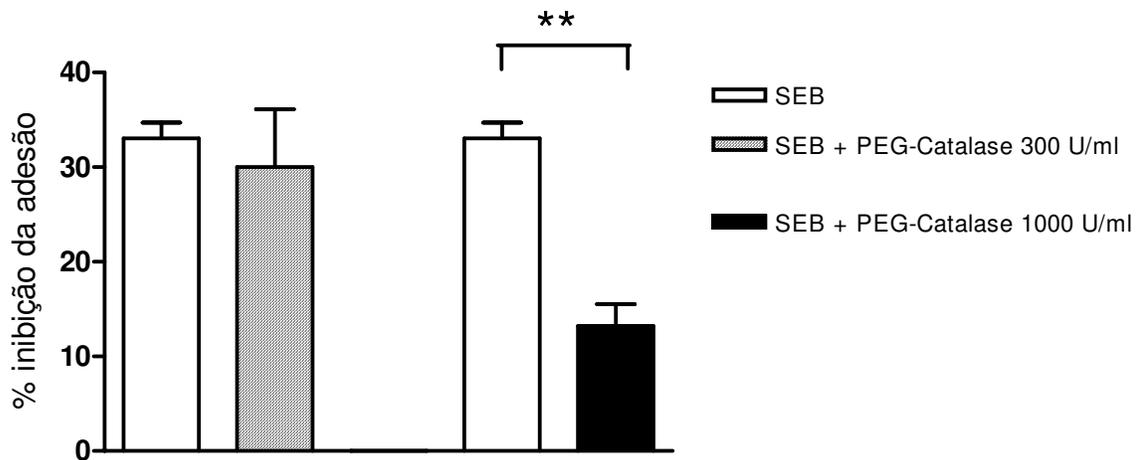


Figura 16. Efeito da PEG-Catalase na adesão de plaquetas incubadas com SEB. As plaquetas (6×10^6 plaquetas/poço) foram pré-incubadas com PEG-Catalase (300 e 1000 U/ml) por 5 min e posteriormente incubadas com SEB (30 µg/ml) por 60 min. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. ** $p < 0,01$ comparado ao controle (n= 5-9).

4. DISCUSSÃO

A evidência mais clara do envolvimento das plaquetas na patogênese da sepsis vem da marcante trombocitopenia, resultante, provavelmente, do acúmulo das plaquetas no pulmão e fígado (Shibazaki e col., 1999; Vanderschueren e col., 2000; Strauss e col., 2002; Ohtaki e col., 2003; Andonegui e col., 2005). A literatura mostrou que a gravidade da sepsis se correlaciona positivamente com a diminuição na contagem de plaquetas (Gawaz e col., 1997; Mavrommatis e col., 2000; Russwurm e col., 2002). Desta maneira, visando uma maior compreensão sobre a participação das plaquetas na sepsis, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito e o mecanismo de ação do LPS, SEA e SEB em plaquetas humanas *in vitro*.

4.1. LPS

Apesar das numerosas observações de trombocitopenia após exposição à endotoxina *in vivo*, os efeitos *in vitro* do LPS em plaquetas continuam controversos, variando de acordo com o protocolo experimental empregado e a fonte de LPS utilizada no estudo.

Estudos prévios envolvendo as ações do LPS em plaquetas humanas mostraram resultados conflitantes, em que alguns grupos verificaram ativação plaquetária (Ream, 1965; Saluk-Juszczak e col., 1999; Zielinski e col., 2001), outros grupos nenhum efeito (Mueller-Eckhardt e Luscher, 1968; Csako e col., 1988; Whitworth e col., 1989; Nystrom e col., 1994; Ward e col., 2005), e ainda grupos que observaram inibição da adesão ou da agregação plaquetária (Saba e col., 1984; Cicala e col., 1997; Sheu e col., 1998, 1999). Entretanto, nenhum trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do LPS sobre a adesão de plaquetas humanas.

Em nosso trabalho, observamos que a pré-incubação (5 a 120 min) de plaquetas humanas com LPS (0,0001 – 30 µg/ml) levou a inibição significativa da adesão espontânea de plaquetas ao fibrinogênio, bem como da adesão de plaquetas ativadas por trombina; em ambos os casos, este efeito inibitório foi dependente da concentração e do tempo de incubação. Entretanto, o efeito inibitório do LPS sobre a adesão de plaquetas ativadas foi menor quando comparada à adesão espontânea.

Já é bem definido que em plaquetas não-ativadas, o complexo GPIIb/IIIa está no estado de baixa afinidade, incapaz de se ligar a ligantes solúveis, mas pode se ligar ao

fibrinogênio e ao fator de von Willebrand imobilizados (Savage e col., 1992). De fato, já em 1991, Savage e Ruggeri demonstraram que a GPIIb/IIIa de plaquetas ativadas e não-ativadas apresentam afinidades específicas para diferentes porções do fibrinogênio, mas, em ambos os casos, a interação do fibrinogênio com o seu receptor leva à adesão plaquetária irreversível. Entretanto, a simples ligação de plaquetas ao fibrinogênio deve ser vista de maneira distinta da adesão propriamente dita. A ligação ao fibrinogênio corresponde à etapa inicial da fosforilação de proteínas, enquanto a adesão corresponde a processos mais tardios de ativação (Shattil e col., 1994).

A ligação da trombina ao seu receptor (PAR-1, PAR-3 e PAR-4), que está ligado à proteína G, leva à ativação da fosfolipase C, sendo a PLC β 2 e a PLC γ 2 as mais encontradas em plaquetas (Lee e col., 1996; Levy-Toledano, 1999). Por sua vez, a PLC β hidrolisa fosfatidilinositol 4,5P₂ presente na membrana plaquetária levando à síntese do segundo mensageiro, inositol trifosfato (IP₃), contribuindo para a mobilização do cálcio e diacilglicerol que ativa PKC. Isso é seguido pela fosforilação específica da cadeia leve de miosina (MLC; 20 kD). O aumento na concentração de cálcio juntamente com a fosforilação mediada pela p38MAP kinase ativa a fosfolipase A₂, que hidrolisa os fosfolípidios de membrana, aumentando a disponibilidade ácido araquidônico e síntese de tromboxano A₂. Este, por sua vez, contribui para a amplificação do fenômeno de agregação (Hartwig e Burkalow, 1997). Esta cascata de sinais intracelulares é denominada de sinalização “inside-out”, e é a responsável pela conversão do receptor α IIB β 3 do estado de baixa afinidade para o de alta afinidade (Levy-Toledano, 1999). Os processos intracelulares “inside-out” regulam a ligação da glicoproteína ao seu ligante e, assim, inicia-se a segunda etapa de sinalização denominada “outside-in”, importante para a firme adesão plaquetária, bem como para a estabilização dos grandes agregados de plaquetas (Peerschke, 1995). Desta maneira, podemos sugerir que o efeito inibitório menor do LPS sobre a adesão de plaquetas ativadas comparado à adesão espontânea deve-se ao fato que a trombina estaria induzindo a firme adesão de plaquetas logo nos 15 min de permanência destes elementos à placa, enquanto que a ligação das plaquetas não-ativadas ao fibrinogênio estaria entrando na fase inicial de adesão.

Nossos resultados mostram que também a incubação de plaquetas com LPS inibiu a adesão plaquetária de maneira dependente da concentração, sugerindo que esta inibição

esteja ocorrendo através da ativação de receptor plaquetário específico. Trabalhos recentes mostraram que plaquetas possuem o receptor específico para o LPS, o Toll-like receptor-4 (Andonegui e col., 2005; Stahl e col., 2006).

De modo geral, a ativação plaquetária resulta na mudança de forma, liberação dos conteúdos granulares, agregação e estabilização do coágulo (Levy-Toledano, 1999). A adesão plaquetária corresponde ao primeiro passo para o início do processo hemostático, sendo mediada por receptores de membrana, geralmente glicoproteínas, que medeiam a interação do meio extracelular com o meio intracelular.

A GPIIb/IIIa está presente em maior quantidade em plaquetas é a mais estudada, e participa tanto dos processos de adesão quanto de agregação. Esta glicoproteína é responsável pela ligação das plaquetas ao fibrinogênio, vWf, vitronectina e fibronectina. Em plaquetas não-ativadas, o complexo GPIIb/IIIa está no estado de baixa afinidade, incapaz de se ligar a ligantes solúveis, mas pode se ligar ao fibrinogênio e ao vWf imobilizados (Savage e col., 1992; Shattil e col., 1994; Ginsberg e col., 1995; Shattil, 1999; Naik e Naik, 2003). Sabe-se que a GPIIb/IIIa de plaquetas ativadas e não-ativadas apresenta afinidade específica para diferentes porções do fibrinogênio, mas, em ambos os casos, a interação do fibrinogênio com o seu receptor leva à adesão plaquetária irreversível; portanto, em ambos os estados de ativação, a GPIIb/IIIa é capaz de se ligar ao fibrinogênio imobilizado (Savage e Ruggeri, 1991).

Após a adesão plaqueta-parede vascular, as plaquetas agregam-se na camada aderida para formar o *plug* hemostático. Isso requer a ativação plaquetária, que envolve uma mudança conformacional no receptor α IIb β 3 na superfície das plaquetas (inside-out), permitindo a ligação ao seu principal ligante, o fibrinogênio solúvel plasmático. Na sequência, isto resulta em uma segunda sinalização (outside-in), que leva a um agrupamento deste receptor e uma reorganização do citoesqueleto plaquetário (Isenberg e col., 1987; Shattil, 1999).

Baseado nisto, inferimos que a agregação plaquetária também poderia ser afetada após a incubação com LPS, pois o receptor responsável pela adesão de plaquetas ao fibrinogênio, GPIIb/IIIa, também é o principal envolvido neste evento. Desta forma, resolvemos investigar a agregação plaquetária após a incubação com LPS, utilizando a trombina como agonista. Em concordância com nossos resultados de adesão, a incubação

das plaquetas com LPS inibiu a agregação plaquetária promovida por trombina, de maneira dependente do tempo. Nos tempos iniciais (5 e 15 min) não se observou alterações significativas, ao passo que nos tempos mais tardios (60 e 120 min), a inibição foi marcante, atingindo seu pico em 120 min, com inibição praticamente total (95%).

Ao se comparar as inibições de adesão e de agregação em plaquetas estimuladas com trombina causadas pelo LPS é possível se perceber um perfil semelhante, pois em ambos os casos a relação com o tempo foi a mesma, embora a amplitude das respostas tenham sido diferentes, com uma menor resposta inibitória nos experimentos de adesão.

A análise de nossos resultados de adesão e de agregação plaquetária indica que esta resposta é dependente do tempo de incubação das plaquetas com o LPS, sendo o efeito máximo para adesão observado em 60 min, enquanto para a agregação foi em 120 min. Isto sugere que a inibição da adesão e da agregação plaquetária pelo LPS poderia estar relacionada à indução da expressão de substâncias com ações antiplaquetárias.

Embora plaquetas não possuam DNA nuclear, o que não as permitiriam sintetizar RNA mensageiro (RNAm) e proteínas, foi reportado há mais de duas décadas que elas retêm o RNAm de megacariócitos (Booyse e Rafelson, 1967; Newman e col., 1988). Recentemente, trabalhos vêm mostrando de maneira convincente a capacidade das plaquetas de sintetizar proteínas e citocinas, como IL-1 β , PAI-1, e fator tecidual (TF) (Lindermann e col., 2001; Brogren e col., 2004; Panes e col., 2007). Esta síntese de proteínas por plaquetas pode, dependendo de estímulo, produzir respostas positivas ou negativas na sua ativação (Lindemann e col., 2001a; 2001b; Weyrich e col., 1998; Pabla e col., 1999; Rosenwald e col., 2001). Já está bem estabelecido que o LPS pode induzir a expressão de várias proteínas, como a iNOS, heme oxigenase-1 (HO-1) e IL-20 (Sheu e col., 1999; Hosoi e col., 2004; Malaguarnera e col., 2005). Desta forma, resolvemos investigar o papel de proteínas neo-sintetizadas plaquetárias na resposta inibitória promovida pelo LPS, utilizando dois inibidores de síntese protéica bastante conhecidos, a puromicina e a ciclohexamida. Entretanto, nossos resultados mostraram que a pré-incubação de plaquetas com puromicina e ciclohexamida não foi capaz de alterar a inibição da adesão espontânea ao fibrinogênio, sugerindo que a inibição da adesão pelo LPS não envolve síntese de proteínas recém formadas.

É curioso notar que a incubação de plaquetas com puromicina e ciclohexamida *per se* levou à inibição da adesão plaquetária ao fibrinogênio. Na literatura já foi mostrado que a incubação de plaquetas com inibidores de síntese protéica pode afetar sua agregação, mas o mecanismo não é claro. A incubação de plaquetas com puromicina e emetina potencializou o efeito do colágeno e reduziu o efeito do ADP e de adrenalina (Rosenwald e col., 2001). Porém, não existem estudos mostrando o efeito destes inibidores na adesão de plaquetas, limitando no momento qualquer discussão mais aprofundada sobre esse mecanismo.

Tem sido relatado que plaquetas sintetizam NO através da NOS endotelial (Mehta e col., 1995; Chen e Mehta, 1996), sendo o NO um dos principais mediadores envolvidos em respostas inibitórias plaquetárias, através da ativação da guanilato ciclase solúvel e consequente aumentos dos níveis intracelulares de GMPc, que, por sua vez, estimula a proteína quinase dependente de GMPc, diminuindo a disponibilidade de cálcio (Schwarz e col., 2001). A presença de iNOS em plaquetas ainda não é clara, embora alguns grupos tenham mostrado a existência deste enzima em plaquetas (Lelchuk e col., 1992; Mehta e col., 1995; Wallerath e col., 1997). Sheu e colaboradores verificaram que o LPS inibiu a agregação plaquetária induzida por diversos agonistas por mecanismo envolvendo aumento intraplaquetário de GMPc, provavelmente pela ativação de uma iNOS (Sheu e col., 1998; 1999). Dessa maneira, resolvemos investigar se a inibição da adesão plaquetária pelo LPS seria devido a elevação dos níveis de GMPc. Nossos resultados mostraram que a incubação de plaquetas com LPS não provocou alterações significativas dos níveis GMPc intraplaquetários, notadamente quando o SNP aumentou marcadamente os níveis deste mensageiro, descartando, deste modo, a participação deste segundo mensageiro.

Outro importante nucleotídeo envolvido na inibição da adesão e da agregação plaquetária é o AMPc. A prostaciclina (PGI₂), quando adicionada a plaquetas promove inibição da adesão via ativação da adenilil ciclase, com subsequente aumento dos níveis intraplaquetários de AMPc (Schwarz e col., 2001). Por isso, investigamos se este nucleotídeo estaria envolvido na inibição plaquetária em resposta ao LPS. Entretanto, a incubação prévia de plaquetas com LPS não afetou os níveis de AMPc, indicando que a

inibição da adesão plaquetária induzida pela incubação com LPS ocorre de maneira independente de aumentos intracelulares deste nucleotídeo.

Trabalho prévio relacionando plaquetas e LPS mostrou que a incubação de LPS com plaquetas leva à geração de ânion superóxido, possivelmente, pela ativação das enzimas plaquetárias PKC e PI 3-K (Zieliski e col., 2001). Também foi demonstrado que a adesão de plaquetas às células endoteliais nas vênulas intestinais após exposição ao LPS é mediada pelo ânion superóxido, visto que a SOD reverte esta resposta (Cerwinka e col., 2002b). Entretanto, os efeitos das espécies reativas de oxigênio em plaquetas ainda são controversos. Recente trabalho publicado por nosso grupo mostrou que a incubação de plaquetas com SNP causa inibição da adesão de plaquetas ao fibrinogênio, por mecanismos dependentes e independentes de GMPc, sendo a formação de ânion superóxido um importante passo para esta resposta (Marcondes e col., 2006). Desta forma, resolvemos verificar o efeito da pré-incubação com SOD ou PEG-SOD (molécula permeável) na inibição da adesão plaquetária causada pelo LPS. Nossos resultados mostraram de forma clara que a pré-incubação de plaquetas com SOD ou PEG-SOD não foi capaz de alterar a resposta inibitória provocada pelo LPS na adesão de plaquetas ao fibrinogênio, indicando que a inibição na adesão causada pelo LPS não está relacionada com aumento na geração de ânion superóxido.

Passamos então a verificar a participação de outras espécies reativas de oxigênio. Nassem e col. (1996) demonstraram que o H_2O_2 inibe a agregação de plaquetas ao colágeno; além disso, observaram que a resposta inibitória da agregação mediada por NO e S-nitrosotióis é potencializada pela adição concomitante de H_2O_2 , por um mecanismo envolvendo geração de GMPc. Trabalho recente com plaquetas *ex vivo* de ratos tratados com LPS mostrou diminuição da agregação, de maneira dose-dependente, sendo que a adição de catalase atenuou esta resposta (Dong e col., 2005). Embora os reais efeitos gerados pelo H_2O_2 em plaquetas ainda não sejam claros, alguns trabalhos apontam para uma atividade pró-agregante plaquetária após exposição ao H_2O_2 e aumento da concentração intracelular de cálcio (Redondo e col., 2004a, b; 2005). Buscando elucidar a participação do H_2O_2 nas respostas inibitórias em plaquetas promovidas pelo LPS, utilizamos como ferramenta a PEG-Catalase (300 e 1000 U/ml), que decompõe esta espécie reativa de oxigênio em água e oxigênio. Além disso, esta substância pode

atravessar a membrana celular agindo no espaço intracelular. Nossos resultados com LPS mostraram que a resposta inibitória promovida por LPS não envolve a produção de H_2O_2 , pois a PEG-Catalase, em ambas as concentrações, foi incapaz de alterar significativamente esta resposta.

A mobilização intracelular de cálcio é importante para os processos de ativação plaquetários, participando de diversos eventos. Como exemplo, podemos citar a ativação da GPIIb/IIIa por diversos agonistas, passando de seu estágio de baixa afinidade para o de alta afinidade (“inside-out”), possibilitando dessa maneira uma firme adesão. Como citado anteriormente, a interação da trombina com seu receptor leva à ativação da fosfolipase C, PI 3-quinase, e conseqüentemente ao aumento da concentração intracelular de Ca^{+2} , ativação de uma série de enzimas dependentes de cálcio e inibição da formação de AMPc. Isto gera mudança da forma plaquetária, secreção dos grânulos, adesão e agregação (Brass, 2003). Por isso, resolvemos investigar se a mobilização intracelular de cálcio plaquetária seria afetada pela incubação com LPS. Para tanto, utilizamos uma técnica clássica, marcando plaquetas com Fura 2-AM (Pollock e Rink, 1986; Donato e col., 1996; López e col., 2006). Escolhemos a trombina como estímulo para mobilização intracelular de cálcio pois foi o agonista utilizado aos ensaios de adesão plaquetária. Em concordância com nossos resultados de inibição plaquetária, a mobilização total de cálcio promovida pela trombina está reduzida significativamente após a incubação com LPS. Entretanto, esta incubação não afetou a mobilização intracelular de cálcio, sugerindo que o LPS afeta o influxo de cálcio sem alterar a mobilização. A partir destes dados sugerimos que o LPS impede o transporte de cálcio do meio extracelular para o meio intracelular (esta seria a principal fonte de entrada deste cátion), não afetando a liberação de cálcio por parte do retículo endoplasmático (mobilização intracelular). Como um aumento na concentração intracelular de cálcio em plaquetas está intimamente relacionado à sua ativação, este nosso resultado está em concordância com a inibição da adesão e da agregação provocada pelo LPS, esclarecendo em parte o mecanismo de ação desta endotoxina.

A análise conjunta dos resultados obtidos nos testes de adesão, agregação e influxo intracelular de cálcio plaquetários nos permitiu supor que a resposta inibitória promovida pelo LPS envolveria a GPIIb/IIIa, que não estaria conseguindo uma ligação adequada ao

fibrinogênio. Isso poderia ser consequência da diminuição na disponibilidade intracelular de cálcio, conforme mostrado em nossos experimentos com o Fura-2. Desta forma, não haveria uma ativação completa deste receptor, pois como supracitado, um dos principais mecanismos envolvidos na sinalização inside-out é o aumento na concentração intracelular de cálcio. Por isso, resolvemos investigar a expressão de GPIIb/IIIa ativada em plaquetas após a incubação com LPS, utilizando um protocolo de citometria de fluxo com o anticorpo PAC-1, específico para este receptor em sua forma ativada. O PAC-1 é uma IgM imunoglobulina- κ pentamérica que se liga preferencialmente a plaquetas ativadas. O PAC-1 se liga minimamente a plaquetas não estimuladas, mas, quando as plaquetas são ativadas pela adição de ADP, adrenalina ou trombina ocorre um intenso aumento na ligação do PAC-1. Na ausência de agonistas, o PAC-1 não causa agregação plaquetária (Shattil e col., 1985). De fato, em nossos experimentos, após a adição de trombina houve um aumento marcante na expressão desta glicoproteína. Por outro lado, a ativação da GPIIb/IIIa não foi modificada após a incubação com LPS. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade que a capacidade de ligação ao fibrinogênio por este receptor esteja comprometida, pois a estrutura pentamérica do PAC-1 permite que este se ligue a mais de um sítio ao mesmo tempo, diferentemente do fibrinogênio, que possui um único sítio de ligação. Neste caso, poderia haver um comprometimento somente no sítio de ligação específico ao fibrinogênio (Shattil e col., 1985).

Em resumo, nossos dados nos permitem afirmar que a exposição de plaquetas ao LPS leva a inibição da adesão e da agregação, de maneira independente de aumentos nas concentrações dos nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc), da formação de proteínas neossintetizadas e de espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio). A inibição da função plaquetária pelo LPS envolveria diminuição da disponibilidade intracelular de cálcio, afetando somente o influxo de cálcio, sem modificar a mobilização intracelular. Além disso, o LPS não afetou a ativação da GPIIb/IIIa de seu estado de baixa afinidade para o de alta afinidade.

4.2. Enterotoxinas estafilocócicas

Nosso trabalho mostrou pela primeira vez que as enterotoxinas estafilocócicas SEA e SEB exercem efeito inibitório significativo sobre a adesão de plaquetas humanas a placas recobertas com fibrinogênio, por um mecanismo que envolveria parcialmente a produção de H₂O₂.

Existe na literatura um crescente número de trabalhos evidenciando que plaquetas estariam envolvidas na sepsis, contribuindo para a gravidade dos sintomas e prejudicando a prognóstico de recuperação (Klinger 1997; Yeaman 1997). Portanto, estudos visando a maior compreensão dos efeitos de bactérias e produtos de bactérias, como as toxinas estafilocócicas na função plaquetária são de grande valia. Estudo prévio mostrou que o ácido lipoteicóico produzido por *Staphylococcus aureus* reduz a agregação plaquetária induzida por vários agonistas como trombina e colágeno (Sheu e col., 2000a,b). Recente trabalho mostrou que a prévia incubação (30 a 90 min) de plaquetas humanas com SEB inibiu a agregação plaquetária induzida por trombina (Tran e col., 2006). Entretanto, nenhum estudo avaliou as enterotoxinas estafilocócicas na adesão de plaquetas humanas.

Em nossos estudos, a pré-incubação (5 a 120 min) de plaquetas humanas com SEA (0,01 pg – 1 µg/ml) ou SEB (0,0001 – 30 µg/ml) causou efeito inibitório não citotóxico, tanto sobre a adesão espontânea quanto sobre a adesão ativada por trombina. Entretanto, o efeito inibitório da SEA ou SEB sobre a adesão de plaquetas ativadas foi menor do que aquele observado na adesão espontânea. Desta maneira, sugerimos que o efeito inibitório menor da SEA (ou SEB) em plaquetas ativadas (comparado à adesão espontânea) deve-se ao fato que a trombina estaria induzindo a mudança do estado de ativação da GPIIb/IIIa, do estado de baixa afinidade para o de alta afinidade. Além disso, a ativação pela trombina levaria à liberação de outros ativadores plaquetários como o TXA₂ e o ADP (Savage e col., 1992; Brass, 2003). Baeado nestas evidências experientos adicionais foram realizados na tentativa de identificar o mecanismo pelo que a SEA e SEB inibem a adesão de plaquetas humanas.

Portanto, nós inicialmente hipotetizamos que a inibição da adesão plaquetária observada em nossos experimentos com as enterotoxinas estafilocócicas seria devido a proteínas neossintetizadas (incluindo citocinas) apartir do RNAm plaquetário com

propriedades inibitórias em plaquetas. Em nossos estudos, a puromicina não afetou a inibição da adesão plaquetária pela SEB, indicando que a neossíntese de proteínas não explica a resposta inibitória de SEB.

Já está bem estabelecido que o óxido nítrico (NO) tem um importante papel em inibir as funções plaquetárias por mecanismos envolvendo a ativação de guanilato ciclase solúvel e portanto acúmulo do segundo mensageiro GMPc que leva a ativação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG) (Schwarz e col., 2001). Estudos prévios reportaram que a SEB aumenta o influxo de neutrófilos e a permeabilidade vascular em camundongos por mecanismo dependente de NO (Franco-Penteado e col., 2001a e 2001b). Entretanto, a pré-incubação de plaquetas com SEA ou SEB não aumentou o conteúdo de GMPc acima de níveis basais em condições em que o doador de NO (SNP) elevou significativamente estes níveis, descartando, portanto, o envolvimento do GMPc na resposta inibitória plaquetária das enterotoxinas estafilocócicas. Além disso, nossos dados mostraram que a pré-incubação com SEA ou SEB falhou em aumentar significativamente os níveis de AMPc (em condições que o ativador de adenilato ciclase, iloprost, marcadamente aumentou este níveis), reiterando que nucleotídeos cíclicos não participam das ações inibitórias destas toxinas.

Trabalho prévio mostrou que a administração in vivo de SEB gera uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo O_2^- , que poderia estar envolvido na patogênese da pneumonia induzida por SEB em camundongos (Miyakawa e col., 2002). Além disso, nós havíamos mostrado que o SNP inibe a adesão plaquetária em placas recobertas com fibrinogênio via produção de O_2^- , um efeito parcialmente revertido pela adição do sequestrador de ânion superóxido, SOD (Marcondes e col., 2006). Todavia, nem a SOD ou a PEG-SOD afetou a inibição da SEB sobre a adesão de plaquetas humanas, indicando que O_2^- não tem um significativo papel nesta resposta. O H_2O_2 é outra espécie reativa de oxigênio envolvida na inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno (Nassem e col., 1996). Existem crescentes evidências mostrando que H_2O_2 pode ser gerado por outras fontes além da via xantina oxidase/superóxido dismutase. Assim sendo, recentes estudos tem envolvido mitocôndria como uma fonte de ROS (principalmente H_2O_2) responsável por mediar a dilatação induzida pelo fluxo em artérias coronarianas (Liu e col., 2003), e a comunicação intercelular em células da

musculatura lisa vascular submetida a estiramento (Ali e col., 2006). Além disso, a inibição da agregação plaquetária em resposta ao NO e S-nitrosoglutathiona foi fortemente aumentada pelo H₂O₂ (Nassem e col., 1996). Recentemente, um estudo usando plaquetas ex-vivo de ratos tratados com LPS mostrou uma redução da agregação plaquetária, que foi atenuada pela catalase (Dong e col., 2005). Em nossos estudos, a resposta inibitória da SEB na adesão de plaquetas foi significativamente revertida pelo pré-tratamento com PEG-catalase, indicando que elevação dos níveis H₂O₂ contribui para a atividade inibitória das enterotoxinas. Entretanto, mecanismos adicionais podem estar envolvidos, pois a resposta inibitória não é totalmente revertida pela adição de PEG-catalase.

Até o momento, as ações do H₂O₂ em plaquetas não estão inteiramente conhecidas. Sabetkar e col associaram a presença de H₂O₂ com aumento da fosforilação da fosfoproteína estimulante vasodilatadora (VASP), que pode ser um sítio de ação desta espécie reativa de oxigênio (Sabetkar e col., 2001). A exata função da VASP continua desconhecida (Halbrugge e col., 1992; Nolte e col., 1994), mas a fosforilação desta proteína pode bloquear sua interação com proteínas de adesão e proteínas de ligação a actina, assim como sua direta interação com a actina via domínios C-terminais da VASP (Huttelmaier e col., 1999). Isto tem sido considerado um importante mecanismo envolvido no rearranjo do citoesqueleto plaquetário durante o “shape change” e subsequente agregação (Sabetkar e col., 2001).

Em suma, nosso presente estudo mostra que a SEA e SEB inibem in vitro a adesão espontânea e adesão induzida por trombina de plaquetas humanas, por mecanismos envolvendo aumento intracelular dos níveis de H₂O₂ e possivelmente fosforilação da VASP.

5. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo nos permitem concluir que:

- i. A exposição de plaquetas humanas ao LPS inibe a adesão e agregação plaquetária, dose- e tempo-dependentes, inibindo o influxo externo de cálcio.
- ii. A incubação com SEA ou SEB inibe a adesão de plaquetas ao fibrinogênio, por um mecanismo envolvendo a formação de peróxido de hidrogênio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood* 1990;75:128-38.

Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulmé R, Lepage E, Le Gall R.. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 2002;28: 108–21.

Alexander C e Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and immunity. *J Endotoxin Res* 2001;7:167-202.

Ali MH, Mungai PT, Schumacker PT. Stretch-induced phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells: role of mitochondrial oxidants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L38-L45.

Alouf JE e Alouf HM. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int J Med Microbiol* 2003;292:429-40.

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.

Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KVJ, Patel KD, Kubes P. Platelets Express Functional Toll-Like Receptor-4 (TLR4). *Blood*. 2005;106(7):2417-23.

Anne D, Aegerter P, Jars-Guinestre MC, Guidet B. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;1687:165–72.

Aslam R, Speck ER, Kim M, Crow AR, Bang KW, Nestel FP, Ni H, Lazarus AH, Freedman J, Semple JW. Platelet Toll-like receptor expression modulates

lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood*. 2006;107(2):637-41.

Baker MD, Acharya KR. Superantigens: Structure-function relationships. *Int J Med Microbiol* 2004;293:529-37.

Belisario MA, Tafuri S, Di Domenico C, Squillacioti C, Della Morte R, Lucisano A, Staiano N. H₂O₂ activity on platelet adhesion to fibrinogen and protein tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 2000;1495(2):183-93.

Beller FK. The role of endotoxin in disseminated intravascular coagulation. *Thromb Diath Haemorrh Suppl* 1969;36:125-49.

Bergdoll MS, Reimann H, Bryan FL. Staphylococci and staphylococcal infections. Academic Press 1989; 462-512.

Bergdoll MS, Chesney PJ. Toxic shock syndrome. CRC press 1991;:51-73.

Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 2000;12:20-26.

Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Cotran RS, Gimbrone MA. Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J Exp Med*. 1984;160(2):618-23.

Bobak DA e Guerrant RL. New developments in enteric bacterial toxins. *Adv Pharmacol* 1992;23:85-101.

Booyse FM, Rafelson ME Jr. Stable messenger RNA in the synthesis of contractile protein in human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1967;145:188-90.

Brandtzaeg P. Significance and pathogenesis of septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;216:15-37.

Brass LF. Thrombin and platelet activation. *CHEST* 2003;124(3):18-25.

Brogren H, Karlsson L, Andersson M, Wang L, Erlinge D, Jern S. Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1. *Blood*. 2004;104(13):3943-48.

Calkins CM, Barsness K, Bensard DD, Vasquez-Torres A, Raeburn CD, Meng X, McIntyre RC. Toll-like receptor-4 signaling mediates pulmonary neutrophil sequestration in response to gram-positive bacterial enterotoxin. *J Surg Res*. 2002;104(2):124-30.

Cerwinka WH, Cooper D, Kriegelstein CF, Feelisch M, Granger DN. Nitric oxide modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002a;282(3):H1111-17.

Cerwinka WH, Cooper D, Kriegelstein CF, Ross CR, McCord JM, Granger DN. Superoxide mediates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002b;284:H535-41.

Chen LY e Mehta JL. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;27:154-58.

Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999;274:10689-92.

Cicala C, Santacroce C, Itoh H, Douglas GJ, Page CP. A study on rat platelet responsiveness following intravenous endotoxin administration. *Life Sci* 1997;60(2):PL31-8.

Clark RA, Klebanoff SJ. Neutrophil-platelet interaction mediated by myeloperoxidase and hydrogen peroxide. *J Immunol* 1980;124:399-405.

Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunology and Cell Biology* 2005;83:196-98.

Csako G, Suba EA, Elin RJ. Endotoxin-induced platelet activation in human whole blood in vitro. *Thrombo and Haemo* 1988;59(3):378-82.

Davis RB, Meeker WR, McQuarrie DG. Immediate effects of intravenous endotoxin on serotonin concentrations and blood platelets. *Circ Res* 1960;8:234-39.

Davis RB, Meeker WR, McQuarrie DG. Early changes in intravascular pressures, platelets, and serotonin after *E. coli* endotoxin administration. *Surg Forum* 1960;10:401-05.

Desouza IA, Hyslop S, Franco-Penteado CF, Ribeiro-Dasilva G. Mouse macrophages release a neutrophil chemotactic mediator following stimulation by staphylococcal enterotoxin type A. *Inflammation Research* 2001;50:206-212.

Desouza IA, Franco-Penteado CF, Camargo EA, Lima CSP, Teixeira SA, Muscará MN, De Nucci G, Antunes E. Inflammatory mechanisms underlying the rat pulmonary neutrophil influx induced by airway exposure to staphylococcal enterotoxin type A. *Br J Pharmacol.* 2005 Nov;146(6):781-91

Desouza IA, Franco-Penteado CF, Camargo EA, Lima CS, Teixeira SA, Muscará MN, De Nucci G, Antunes E. Acute pulmonary inflammation induced by exposure of the airways to staphylococcal enterotoxin type B in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;217(1):107-13.

Dinarelli CA. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *J Infect Dis* 1991;163(6):1177-84.

Donato JL, Marcondes S, Antunes E, Nogueira MD, Nader HB, Dietrich CP, Rendu F, de Nucci G. Role of chondroitin 4-sulphate as a receptor for polycation induced humn platelet aggregation. *Br J Pharmacol.* 1996 Dec;119(7):1447-53

Dong HP, Chen HW, Hsu C, Chiu HY, Lin LC, Yang RC. Previous heat shock treatment attenuates lipopolysaccharide-induced hyporesponsiveness of platelets in rats. *Shock* 2005;24(3):239-44.

Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, Swanson AK, Lees JR, Lentz SR, Stein CS, Nieswandt B, Wang Y, Davidson BL, Ratliff TL. Platelet-Mediated Modulation of Adaptive Immunity: A communication link between innate and Adaptive immune compartments. *Immunity* 2003;19: 9-19.

Fleischer B, Schrezenmeier H, Conradt HP. Cell stimulation by staphylococcal enterotoxins: Role of class II molecules and T cell surface structures. *Cell Immunol* 1989;119:92-101.

Florquin S, Aaldering L. Superantigens: a tool to gain new insight into cellular immunity. *Res Immunol* 1997;148:373-86.

Franco-Penteado CF, Desouza IA, Teixeira SA, De Nucci G, Ribeiro-Dasilva G, Antunes E. Role of nitric oxide on the increased vascular permeability and neutrophil

accumulation induced by staphylococcal enterotoxin type B into mouse paw. *Biochemical Pharmacology* 20012a;61:1305-11.

Franco-Penteado CF, Desouza IA, Teixeira SA, De Nucci G, Ribeiro-Dasilva G, Antunes E. Involvement of nitric oxide on the peritoneal neutrophil influx induced by staphylococcal enterotoxin B in mouse. *Toxicon* 2001b;39:1383-86.

Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S, Neumann FJ. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med* 1997;23:379-85.

Ginsberg MH, DU X, O'Toole ET, Loftus JC. Platelet Integrins. *Thrombo and Haemost* 1995;74(1):352-59.

Gnatenko DV, Dunn JJ, McCorkle SR, Weissmann D, Perrotta PL, Bahou WF. Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression. *Blood* 2003;101:2285-2293.

Golenbock DT, Hampton RY, Qureshi N, Takayama K, Raetz CR. Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J Biol Chem* 1991;266:19490-98.

Gutsmann T, Haberer N, Carroll SF, Seydel U, Wiese A. Interaction between Lipopolysaccharide (LPS), LPS-Binding Protein (LBP), and Planar Membranes. *Biol Chem* 2001;382:425-34.

Halbrugge M, Friedrich C, Eigenthaler M, Schanzenbacher P., Walter U. Stoichiometric and reversible phosphorylation of 46 kDa protein in human platelets in response to cGMP and cAMP elevation. *J Biol Chem* 1992;286:3088-92.

Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999;397:271-74.

Harker L. Platelet survival time: its measurement and use. *Prog Hemost Thromb* 1978;4:321-26.

Hartwig, JH, Burkalow K. Polyphosphoinositide synthesis and platelet shape change. *Curr Opin Hematol* 1997;4:351-56.

Haskó G, Virág L, Egnaczyk G, Salzman AL, Szabó C. The crucial role of IL-10 in the suppression of the immunological response in mice exposed to staphylococcal enterotoxin B. *Eur J Immunol* 1998;28:1417-25.

Heumann D e Roger T. Initial responses to endotoxins and gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta* 2002;323:59-72.

Holmsen H, Weiss HJ. Secretable pools in platelets. *Annu Rev Med* 1979;30: 119-30.

Hosoya T, Wada S, Suzuki S, Okumura Y, Akira S, Matsuda T, Nomura Y. Bacterial endotoxin induces IL-20 expression in the glial cells. *Molecular Brain Research* 2004;130:23–29.

Huang Q, Liu D, Majewski P, Schulte LC, Korn JM, Young RA, Lander ES, Hacohen N. The Plasticity of Dendritic Cell Responses to Pathogens and Their Components. *Science* 2001;294(5543):870-75.

Huttelmaier S, Harbeck B, Steffens NO, Messerschmidt T, Illenberger S, Jockusch M. Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP). *FEBS Lett* 1999;451: 68–74.

Iandolo JJ. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annual Rev Microbiol* 1989;43:375-402.

Isenberg WM, McEver RP, Phillips DR, Shuman MA, Bainton DF. The platelet fibrinogen receptor: an immunogold-surface replica study of agonist-induced ligand binding and receptor clustering. *J Cell Biol* 1987;104(6):1655-63.

Iuliano L, Colavita AR, Leo R, Pratico D, Violi F. Oxygen free radicals and platelets activation. *Free Radical Biol Med* 1997;22:999-1006

Jagneaux T, Taylor DE, Kantrow SP. Coagulation in sepsis. *Am J Med Sci*. 2004;328(4):196-204.

Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today* 1999;5:123-32.

Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med*. 2002;347(3):185-92.

Kieffer N, Guichard J, Farcet JP, Vainchenker W, Breton-Gorius J. Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *Eur j Biochem* 1987;164:189-95.

Klinger MHL. Platelets and inflammation. *Anat Embryol* 1997;196:1-11.

Kluger MJ. Fever, role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev* 1991;71:93-127.

LeClaire RD, Kell WM, Sadik RA, Downs MB, Parker GW. Regulation of staphylococcal enterotoxin B-elicited nitric oxide production by endothelial cells. *Infect Immunity* 1995;63:539-46.

Lee SB, Rao KA, Lee KH, Yang X, Boe YS, Ree SG. Decreased expression of phospholipase C-b2 isozyme in human platelets with impaired function. *Blood* 1996;88:1684-91.

Lelchuk R, Radomski MW, Martin JF, Moncada S. Constitutive and inducible nitric oxide synthase in human megakaryoblastic cell. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;262: 1220-24.

Levi MMD, Jonge EMD, van der Poll TMD. Sepsis and Disseminated Intravascular Coagulation. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 2003;16(1/2):43–47.

Levy-Toledano S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a “hierarchy”? *Haemostasis* 1999;29:4-15.

Linardi A, Costa SKP, DaSilva GR, Antunes E. Involvement of kinins, mast cells and sensory neurons on the plasma exudation and paw oedema induced by staphylococcal enterotoxin B in the mouse. *Eur J Pharmacol* 2000;399:235-42.

Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1b synthesis. *J Cell Biol* 2001a;154:485-90.

Lindemann S, Tolley ND, Eyre JR, Kraiss LW, Mahoney TM, Weyrich AS. Integrins regulate the intracellular distribution of eukaryotic initiation factor 4E in platelets. A checkpoint for translational control. *J Biol Chem* 2001b;276(36):33947-51.

Liu YP, Zhao HT, Li HW, Kalyanaraman B, Nicolosi Ac, Gutterman DD. Mitochondrial sources of H₂O₂ generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries. *Circ Res* 2003;19:573-580.

López JL, Redondo PC, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Two distinct Ca²⁺ compartments show differential sensitivity to thrombin, ADP and vasopressin in human platelets. *Cell Sign* 2006;18:373-81.

Mavrommatis AC, Theodoridis T, Orfanidou A, Roussos C, Christopoulou-Kokkinou V, Zakyntinos S.. Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med* 2000;28:451-57

Malaguarnera L, Imbesi R, Di Rosa M, Scuto A, Castrogiovanni P, Messina A, Sanfilippo S. Action of prolactin, IFN-gamma, TNF-alpha and LPS on heme oxygenase-1 expression and VEGF release in human monocytes/macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2005;5(9):1458-69.

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* 2005;103(9):3434-39

Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990;248:705-11.

Martin GS, Mannino, D.M., Eaton, S., Moss, M. (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348: 1546-54.

Matera C, Falzarano C, Berrino L, Rossi F. Effects of tetanus toxin, *Salmonella typhimurium* porin, and bacterial lipopolysaccharide on platelet aggregation. *J Med* 1992;23(5):327-38.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-97.

Members of the American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure

and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit care Med* 1992;20:864-74.

Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med* 1995;125(3):370-77.

Micusan VV, Thibodeau J. Superantigens of microbial origin. *Seminars in Immunology* 1993;5:3-11.

Miyakawa H, Sato K, Shinbori R, Okamoto T, Gushima Y, Fujiki M, Suga M. Effects of inducible oxide synthase and xanthine oxidase inhibitors on SEB-induced interstitial pneumonia in mice. *Eur Respir J* 2002;19:447-57.

Montrucchio G, Bosco O, Del Sorbo L, Pecetto PF, Lupia E, Goffi A, Omede P, Emanuelli G, Camussi G. Mechanisms of the priming effect of low doses of lipopolysaccharides on leukocyte-dependent platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 2003;90:872-81.

Morris PE, Hite R D, Ohl C. Relationship Between the Inflammation and Coagulation Pathways in Patients with Severe Sepsis: Implications for Therapy with Activated Protein C. *Biodrugs* 2002;16(6):403-17.

Morrison DC e Ulevitch R.J. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. *Am J Pathol* 1978;93:526-617.

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

Mueller-Eckhardt C, Lüscher EF. Immune reactions of human blood platelets. IV. Investigations on the problem of an immunologically induced effect of endotoxin on human platelets. *Thromb Diath Haemorrh* 1968;20(3):336-44.

Munson SH, Tremaine MT, Betley MJ, Welch RA. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin type G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect and Immunity* 1998;66:3337-48.

Muzio M, Natoli G, Sacconi S, Levrero M, Mantovani A. The human Toll signaling pathway: divergence of nuclear factor κ B and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med* 1998;187: 2097-101.

Naik UP, Naik MU. Association of CIB with GPIIb/IIIa during outside-in signaling is required for platelet spreading on fibrinogen. *Blood* 2003;102(4):1355-62.

Nassem KM, Chirico S, Mohammadi B, Bruckdorfer KR. The synergism of hydrogen peroxide with plasma S-nitrosothiols in the inhibition of platelet activation. *Biochem J* 1996; 318:759-66.

Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1986;163(3):740-45.

Neame PB, Kelton JG, Walker IR, Stewart IO, Nessel HL, Hirsh J. Thrombocytopenia in septicemia: the role of disseminated intravascular coagulation. *Blood* 1980;56(1):88-92.

Newman PJ, Gorski J, White GC, Gidwitz S, Cretney CJ, Aster RH. Enzymatic amplification of platelet-specific messenger RNA using the polymerase chain reaction. *J Clin Invest*. 1988;82(2):739-43.

Nolte C, Eigentaler M, Horstrup K, Honig-Liedl P, Walter U. Synergistic phosphorylation of the focal adhesion-associated vasodilator-stimulated phosphoprotein in intact human platelets in response to cGMP- and cAMP elevating platelet inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1994;48:1569–75.

Nystrom ML, Barradas MA, Jeremy JY, Mikhailidis DP. Platelet shape change in whole blood: differential effects of endotoxin. *Thromb Haem* 1994;71(5):646-50.

Obergfell A, Eto K, Mocsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, Lowell CA, Shattil JS. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $[\alpha]IIB[\beta]3$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol* 2002;157:265-75.

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.

Ohtaki Y, Shimauchi H, Yokochi T, Takada H, Endo Y. In vivo platelet response to lipopolysaccharide in mice: proposed method for evaluating new antiplatelet drugs. *Thrombosis Research* 2003;108:303-09

Olas B, Wachowicz B, Juszczak-Saluk J, Zielinski T. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on platelet activation induced by endotoxin or thrombin. *Thrombo Research* 2002;107:141-45.

Opal SM. The clinical relevance of endotoxin in human sepsis: a critical analysis. *J Endotoxin Res* 2002;8(6):473-76.

Pabla R, Weyrich AS, Dixon DA, Bray PF, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Integrin dependent control of translation: engagement of integrin $\text{AlphaIIb}\beta3$ regulates synthesis of proteins in activated human platelets. *J Cell Biol* 1999;144:175-84.

Panes O, Matus V, Sáez CG, Quiroga T, Pereira J, Mezzano D. Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood*. 2007;109(12):5242-50.

Papageorgiou AC, Collins CM, Gutman DM, Kline JB, O'Brien SM, Tranter HS, Acharya KR. Structural basis for the recognition of superantigen streptococcal pyrogenic exotoxin A (SpeA1) by MHC class II molecules and T cell receptors. *EMBO J*. 1999;18:9-21.

Peerschke EI. Regulation of platelet aggregation by post-fibrinogen binding events. *Thromb Haemost* 1995;73:862-67.

Perera PY, Mayadas TN, Takeuchi O, Akira S, Zaks-Zilberman M, Goyert SM, Vogel SN. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J Immunol* 2001;166:574-81.

Pignatelli P, Pulcinelli FM, Lenti L, Gazzaniga PP, Violi F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood* 1998;91:484-90.

Pollock WK, Rink TJ, Irvine RF. Liberation of [³H]arachidonic acid and changes in cytosolic free calcium in fura-2-loaded human platelets stimulated by ionomycin and collagen. *Biochem J*. 1986;235(3):869-77.

Pratico D, Iuliano A, Ghiselli A, Alessandri C, Violi F. Hydrogen peroxide as trigger of platelet aggregation. *Haemostasis* 1991;21:169-74

Pu Q, Wiel E, Corseaux D, Bordet R, Azrin MA, Ezekowitz MD, Lund N, Jude B, Vallet B. Beneficial effect of glycoprotein IIb/IIIa inhibitor (AZ-1) on endothelium in *Escherichia coli* endotoxin-induced shock. *Crit Care Med*. 2001;29(6):1181-8

Pugin J, Schürer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *PNAS* 1993;90:2744-48.

Raetz CR e Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 2002;71:635-700.

Raij L, Keane WF, Michael AF. Unilateral Shwartzman reaction: cortical necrosis in one kidney following in vivo perfusion with endotoxin. *Kidney Int* 1977;12(2):91-95.

Rangel-Frausto MS, Pittet D, Hwang T, Woolson RF, Wenzel RP. The dynamics of disease progression in sepsis: Markov modeling describing the natural history and the likely impact of effective antisepsis agents. *Clin Infect Dis* 1998;27:185–90.

Ream VJ, Deykin D, Gurewich V, Wessler S. The aggregation of human platelets by bacterial endotoxin. *J Lab Clin Med* 1965;66:245-52.

Redondo PC, Salido GM, Rosado JA, Pariente JA. Effect of hydrogen peroxide on Ca²⁺ mobilisation in human platelets through sulphhydryl oxidation dependent and independent mechanisms. *Biochem Pharmacol*. 2004a;67(3):491-502.

Redondo PC, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Dual effect of hydrogen peroxide on store-mediated calcium entry in human platelets. *Biochem Pharmacol* 2004b; 67(6):1065-76.

Redondo PC, Jardin I, Hernandez-Cruz JM, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA. Hydrogen peroxide and peroxynitrite enhance Ca²⁺ mobilization and aggregation in platelets from type 2 diabetic patients. *Bioch and Bioph Res Com* 2005;333:794–802.

Renshaw BR, Fanslow WC, Armitage RJ, Campbell KA, Liggitt D, Wright B, Davison BL, Maliszewski CR. Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J Exp Med*. 1994;180(5):1889-900.

Rosenwald IB, Pechet L, Han A, Lu L, Pihan G, Woda B, Chen JJ, Szymanski I. Expression of translation initiation factors eIF-4E and eIF-2a and a potential physiologic role of continuous protein synthesis in human platelets. *Thromb Haemost* 2001;85:142-51.

Rietschel ET e Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am* 1992;267:54-61.

Rosenwald IB, Pechet L, Han A, Lu L, Pihan G, Wofda B, Chen JJ, Szymanski I. Expression of translation initiation factors eIF- 4E e eIF-2a and a potential physiologic role of continuous protein synthesis in human platelets. *Thromb Haemost* 2001;85:142-51.

Russwurm S, Vickers J, Meier-Hellmann A, Spangenberg P, Bredle D, Reinhart K, Losche W. Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock* 2002;17:263-68.

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

Sabetkar M, Naseem KM, Tullett JM, Friebe A, Koesling D, Bruckdorfer KR. Synergism between Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide in the Inhibition of Platelet Function: The Roles of Soluble Guanylyl Cyclase and Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein. *Biol Chem* 2001;5(3):233-42.

Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MK, Dower SK. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol* 2002;168:4701-10.

Saluk-Juszczak, Wachowics B, Wieslaw K. Stimulatory effects of endotoxin on the platelet secretory process. *Microbios* 1999;99:45-53.

Saluk-Juszczak, Wachowics B, Zielinski T, Wieslaw K. Adhesion of thrombin-stimulated and unstimulated blood platelets to collagen in the presence of *proteus mirabilis* lipopolysaccharides. *Platelets* 2001;12:470-75.

Savage B, Shattil SJ, Ruggeri ZM. Modulation of platelet function through adhesion receptors: a dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin α IIb β 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-VON Willebrand factor. *J of Biological Chem* 1992;267(16):11300-06.

Schumann RR, Rietschel ET, Loppnow H. The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin. *Med Microbiol Immunol* 1994;183:279-97.

Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Bioch Pharm* 2001;62:1153–1161.

Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb. IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem*. 1985;260(20):11107-14.

Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge JS. Adhesive signaling in platelets. *Curr Op Cell Biol* 1994a;6:695-704.

Shattil SJ, Haimovich B, Cunningham M, Lipfert L, Parsons JT, Ginsberg MH, Brugge SJ. Tyrosine phosphorylation of pp125FAK in platelets requires coordinated signaling through integrin and agonist receptors. *J Biol Chem* 1994b;269:14738-45.

Shattil SJ. Signaling through platelet integrin α IIb β 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb Haemost*. 1999 Aug;82(2):318-25

Sheagren JN. Staphylococcal infections of the skin and skin structures. *Cutis* 1985;15;36(5A):2-6.

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

Sheu JR, Hung WC, Su CH, Lin CH, Lee LW, Lee YM, Yen MH. The antiplatelet activity of *Escherichia coli* lipopolysaccharide is mediated through a nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Eur J Haematol* 1999;62:317-26.

Sheu JR, Hsiao G, Lee CR, Chang WC, Lee LW, Su CH, Lin CH. Antiplatelet activity of *Staphylococcus aureus* Lipoteichoic Acid is mediated through a cyclic AMP pathway. *Thromb Reser* 2000a;99:249-58.

Sheu JR, Hsiao G, Lee CR, Chang WC, Lee LW, Su CH, Lin CH. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of *staphylococcus aureus* lipoteichoic acid in human platelets. *Thromb Haemost* 2000b;83:777-84.

Shibazaki M, Nakamura M, Endo Y. Biphasic, organ-specific, and strain-specific accumulation of platelets induced in mice by lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and its possible involvement in shock. *Infec Immun* 1996;64:5290-94.

Shibazaki M, Kawabata Y, Yokochi T, Nishida A, Takada H, Endo Y. Complement-Dependent Accumulation and Degredation of Platelets in the Lung and Liver Induced by injection of Lipopolysaccharides. *Infection and Immunity* 1999;67(10):5186-91.

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2 Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. *J Exp Med* 1999;189:1777-82.

Ståhl AL, Svensson M, Mörgelin M, Svanborg C, Tarr PI, Mooney JC, Watkins SL, Johnson R, Karpman D. Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic *Escherichia coli* binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2006;108(1):167-76.

Stohlawetz P, Folman CC, von dem Borne AE, Pernerstorfer T, Eichler HG, Panzer S, Jilma B. Effects of endotoxemia on thrombopoiesis in men. *Thromb Haemost* 1999;81:613-17.

Strauss R, Wehler M, Mehler K, Kreutzer D, Koebnick C, Hahn EG. Thrombocytopenia in patients in the medical intensive care unit: Bleeding prevalence, transfusion requirements, and outcome. *Crit Care med* 2002;30:1765-71

Taylor FB, Collier BS, Chang AC, Peer G, Jordan R, Engellener W, Esmon CT. 7E3 F(ab')₂, a monoclonal antibody to the platelet GPIIb/IIIa receptor, protects against microangiopathic hemolytic anemia and microvascular thrombotic renal failure in baboons treated with C4b binding protein and a sublethal infusion of *Escherichia coli*. *Blood*. 1997;89(11):4078-84.

Tran U, Boyle T, Shupp JW, Hammamieh R, Jett M. Staphylococcus enterotoxin B initiates protein kinase C translocation and eicosanoid metabolism while inhibiting thrombin-induced aggregation in human platelets. *Mol Cell Bioch* 2006; 288(1-2):171-8.

Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, Kikuchi T, Iwami K, Nagai Y, Takeuchi O. Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol* 2002;169:2026-33.

Vanderschueren S, De Weerd A, Malbrain M, et al. Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Crit Care Med* 2000;28:1871-76

Villavicencio RT, Wall MJ. The pathogenesis of *Staphylococcus aureus* in the trauma patient and potential future therapies. *Am J Surg*. 1996;172(3):291-6.

Vink A, Schoneveld AH, van der Meer JJ, van Middelaar BJ, Sluijter JP, Smeets MB, Quax PH, Lim SK, Borst C, Pasterkamp G, de Kleijn DP. In vivo evidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation* 2002;106(15):1985-90.

Xia Y, Li J, Bertino A, Kuter DJ. Thrombopoietin and the TPO receptor during platelet storage. *Transf* 2000;40:976—87.

Yeaman MR. The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clin Infect Dis* 1997;25:951-70.

Wallerath T, Gath I, Aulitzky WE, Pollock JS, Kleinert H, Förstermann U. Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets. *Thromb Haemost*. 1997;77(1):163-67.

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.

Weyrich AS, Dixon DA, Pabla R, et al. Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3 in activated human platelets. *PNAS* 1998;95:5556-61.

Whitworth NH, Barradas MA, Mikhailidis DP, Dandona P. An investigation into the effects of bacterial lipopolysaccharide on human platelets. *Eur J Haematol* 1989;43:112-19.

Won SJ, Huang WT, Lai YS, Lin TM. Staphylococcal enterotoxin A acts through nitric oxide synthase mechanisms in human peripheral blood mononuclear cells to stimulate synthesis of pyrogenic cytokines. *Infection and Immunity* 2000;68:2003-08.

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990;249:1431-33.

Zeuke S, Ulmer AJ, Kusumoto S, Katus HA, Heine H. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc Res* 2002;56:126-34.

Zielinski T, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Kaca W. The generation of superoxide anion in blood platelets in response to different forms of proteus mirabilis lipopolysaccharide: effectes of staurosporin, wortmannin, and indomethacin. *Thromb Research* 2001;103:149-55.

Zielinski T, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Kaca W. Polysaccharide part of Proteus mirabilis lipopolysaccharide may be responsible for the stimulation of platelet adhesion to collagen. *Platelets* 2002;13:419-24.



CEP, 28/08/06.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 272/2006 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0203.0.146.000-06

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "MECANISMO DE AÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS E DO LIPOPOLISSACÁRIDE NA AGREGAÇÃO E NA ADESÃO DE PLAQUETAS HUMANAS"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Rafael Prada Morganti

INSTITUIÇÃO: Departamento de Farmacologia/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 04/07/2006

II - OBJETIVOS

Investigar os efeitos induzidos pelo LPS, SEA e SEB na adesão plaquetária ao fibrinogênio, bem como o mecanismo de ação envolvido nestas respostas.

III - SUMÁRIO

Será coletado sangue venoso de 80 voluntários saudáveis de ambos os sexos, entre 21 e 45 anos, em geral pertencentes à comunidade local da FCM/HC/UNICAMP (alunos, docentes e funcionários). O sangue será coletado na presença de ACDC (3,13%; 1:10) e imediatamente processado para a separação das plaquetas e realizados os ensaios experimentais. Estes serão ressarcidos com R\$10,00 (dez reais) para cobrir custos eventuais com transporte e/ou lanche.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O presente projeto encontra-se nos termos da resolução 196/96 e complementares, e é grande importância para uma melhor investigação. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi readequado estando adequado às normas.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.



VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

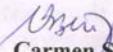
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de julho de 2006.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP