



**Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Curso de Graduação em Farmácia**

PRISCILLA MARIA PEREIRA MACIEL

**Padronização da determinação da presença de óxido nítrico em plaquetas
humanas por citometria de fluxo**

JOÃO PESSOA - PB

2013

PRISCILLA MARIA PEREIRA MACIEL

**Padronização da determinação da presença de óxido nítrico em plaquetas
humanas por citometria de fluxo**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em
Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da
Universidade Federal da Paraíba, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. **Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras**

JOÃO PESSOA – PB

2013

M152p Maciel, Priscilla Maria Pereira.

Padronização da determinação da presença de óxido nítrico em plaquetas humanas por Citometria de fluxo / Priscilla Maria Pereira Maciel. - - João Pessoa: [s.n.], 2013.

54 f.: il. -

Orientador: Robson Cavalcante Veras.
Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. NO. 2. Plaquetas. 3. DAF. 4. Citometria de fluxo. 5. Padronização.

BS/CCS/UFPB

CDU: 547-311(043.2)

PRISCILLA MARIA PEREIRA MACIEL

**Padronização da determinação da presença de óxido nítrico em plaquetas
humanas por citometria de fluxo**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em
Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da
Universidade Federal da Paraíba, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Aprovada em ____/____/____

Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientador

Prof.^a. Dr.^a. Bagnólia Araújo Costa
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora interna

Prof. Mes. João Carlos Lima Rodrigues Pita
(Faculdade Maurício de Nassau)
Examinador externo

A minha mãe, minha maior incentivadora. Obrigada pelo eterno amor e estímulo em todos os momentos da minha vida, pela bondade, dedicação. Obrigada pela abdicação de tantos sonhos para que os meus pudessem ser realizados.

Aos meus irmãos e tia Fátima pelo amor, companheirismo e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua proteção, luz e bondade que me permitiram trilhar meu caminho.

Aos meus pais, avos e tias por todo o carinho, estímulo e oportunidades oferecidas para realização desse sonho.

Aos meus irmãos, Patricia, Panmella, AntônioFilho, meus melhores amigos, por todo amor, companheirismo e incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Robson Veras, pela oportunidade que me proporcionou em ingressar na iniciação científica, por todo incentivo, paciência, confiança depositada e conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Isac Almeida, pela oportunidade em ingressar no mestrado sob sua orientação.

À Prof^a. Bagnólia e ao Prof. João Carlos por terem aceitado participar da banca examinadora do meu Trabalho de Conclusão de Curso, contribuindo para a construção do mesmo.

Aos meus amigos da graduação, pela amizade e convivência animadora: Amanda Pedrosa, Caio Bonfim, Tarliane Pedrosa, Rômulo Pereira, Ayala Nara, Bruna Caldas, Geisa Nobre, Iara Luna, Priscilla Ramos, Alysson Santiago, Lindemberg Medeiros, Mayza Neves, Andressa Lira, Fernanda de Medeiros, Júlio César, Paulo César, Danilo, Thalisson Galberto, Demostenes Figueredo, Daniela Galdêncio, Luciana Ramalho.

À Natalia Tabosa e Valéria Lopes, duas grandes amigas, pelo conhecimento compartilhado, por estarem sempre dispostas a ajudar, mesmo estando atarefadas, pelos dias em que ficaram altas horas corrigindo os relatórios e apresentações para o ENIC.

À Priscilla Crispiniano, por toda amizade, disposição em ajudar sempre, incentivo, conforto nas horas de estresse.

Às pessoas maravilhosas que tive a oportunidade de conhecer e fazer amizade: Abrahão Filho, Maria do Carmo, Fabíola Fialho, Thyago Queiroz, Walma Vasconcelos, Thaís Amanda, Heloísa Mara, Mônica Almeida, Milena Ramos, Leônidas Mendes.

Aos professores: Núbia Kelly, Adalberto Coelho, Alba Caiaffo, Bagnólia Araújo, Robson Veras, Francisca Inês, Fábio Santos, João Vianney, Rossana Souto, Pablo Queiroz e Zélia Braz, Damião Borba e Mariana Sobral. Pela dedicação, disposição em ajudar sempre, compromisso, incentivo e ensinamentos.

RESUMO

As plaquetas desempenham papel central no processo hemostático normal e de eventos trombóticos. O óxido nítrico (NO) é uma das principais moléculas sinalizadoras responsáveis pela regulação da hemostasia. O estudo teve como objetivo padronizar e implantar a técnica de medida de óxido nítrico por citometria de fluxo no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba- UFPB e determinar as condições experimentais ótimas para avaliar a produção ou presença de NO em plaquetas humanas, utilizando a técnica de citometria de fluxo. Nos experimentos foi utilizado plasma rico em plaquetas (PRP) de sangue humano. As plaquetas foram incubadas com o diacetato diaminofluoresceína (DAF- 2DA) (diacetato diaminodifluorofluoresceína), uma sonda fluorescente específica para o NO, em duas concentrações (2,5 μ M e 10 μ M) e por tempos de incubação de 30 e 60 minutos. A intensidade de fluorescência emitida pelo DAF-2T foi determinada na presença de um clássico doador de NO, o nitroprussiato de sódio (NPS- 10 μ M), utilizado como padrão. A incubação com o DAF- 2DA demonstrou uma mudança significativa na intensidade de fluorescência em todos os tempos de incubação, sendo o efeito mais pronunciado observado na concentração de 10 μ M. Na presença do NPS a intensidade de fluorescência foi maior quando o DAF- 2DA (2,5 μ M) foi incubado por 30 minutos (aumento de $41\pm 1\%$) e a incubação o DAF- 2DA (10 μ M) demonstrou aumento da fluorescência em todos os tempos analisados. Com base nos resultados obtidos a partir da padronização da medida de NO, concluímos que a utilização da sonda DAF-2DA na concentração de 10 μ M e por um período de incubação de 30 minutos demonstrou melhor eficiência em quantificar os níveis de NO em tempo real, utilizando amostras de PRP humano. Dessa forma, de acordo com nossas condições de rotina laboratorial a sonda DAF- 2DA pode ser aplicada para a determinação dos níveis de NO em plaquetas.

Palavras- chaves: NO, plaquetas, DAF, citometria de fluxo. Padronização

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia das plaquetas humanas.....	19
Figura 2: Ilustração representativa dos mecanismos de adesão e ativação plaquetária.	23
Figura 3: Representação esquemática dos mecanismos moleculares de ativação plaquetária.	26
Figura 4: Representação esquemática dos mecanismos de inibição plaquetária via produção de óxido nítrico (NO).	28
Figura 5: Representação esquemática da medida dos níveis de NO a partir da formação de DAF- 2T..	32
Figura 6: Representação esquemática da sequencia de procedimentos realizados para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP).	38
Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental para medida de NO em três condições: suspensão de plaquetas incubadas apenas com DAF- 2DA, DAF- 2DA(2,5 µM) + NPS (10 µM) e DAF- 2DA(10 µM) + NPS (10 µM).....	39
Figura 8: Barras representativas da diferença percentual da intensidade de fluorescência da sonda DAF- 2DA entre as concentrações de 2,5 µM e 10 µM e na ausência da sonda..	42
Figura 9: Barras representativas do efeito do NPS (10 µM) sobre os níveis de NO expressos como diferença percentual de fluorescência em plaquetas (~ 3 x 10 ⁸ plaquetas/mL) usando o DAF-2DA (2,5 µM) incubado por 30 minutos.....	43
Figura 10: Barras representativas do efeito do NPS (10 µM) sobre os níveis de NO expressos como diferença percentual de fluorescência em plaquetas (~ 3 x 10 ⁸ plaquetas/mL) usando o DAF-2DA (2,5 µM) incubado por 60 minutos.....	44
Figura 11: Barras representativas do efeito do NPS (10 µM) sobre os níveis de NO expressos como diferença percentual de fluorescência em plaquetas (~ 3 x 10 ⁸ plaquetas/mL) usando o DAF- 2DA (10 µM) incubado por 30 minutos.....	45
Figura 12: Barras representativas do efeito do NPS (10 µM) sobre os níveis de NO expressos como diferença percentual de fluorescência em plaquetas (~ 3 x 10 ⁸ plaquetas/mL) usando o DAF-2DA (10 µM) incubado por 60 minutos.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da solução de HANK.....36

Tabela 2 - Composição da solução de ACD.....37

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

$[Ca^{2+}]_i$	Concentração de Ca^{2+} intracelular
ACD	Ácido cítrico dextrose
ADP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina triposfato
Ca^{2+}	Cálcio
sCG	Ciclase de guanilil solúvel
DCV	Doenças cardiovasculares
DAF- 2	3,4-diaminofluoresceína
DAF-2DA	Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína
DAF-2T	Triazolo-diaminofluoresceína
DAG	Diacilglicerol
FAD	Flavina adenina dinucleótideo
FCDP	Fator de crescimento derivado de plaquetas
FITIC	Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
GPIb -	Glicoproteína Ib
GTN	Trinitrato de gliceril
IP3	1,4,5-trisfosfato de inositol
MLC	Cadeia leve da miosina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
eNOS	Sintase do óxido nítrico endotelial
iNOS	Sintase do óxido nítrico induzível
nNOS	Sintase de óxido nítrico neuronal
NPS	Nitroprussiato de sódio
PAF	Fator ativador de plaquetas
PGI ₂	Prostaciclina
PKG	Proteína cinase dependente de GMPc
PRP	Plasma rico em Plaquetas
TXA ₂	Tromboxano A2

VWF Fator de Von Willebrand

OBS: as abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE HEMOSTASIA	17
1.2.1 Plaquetas.....	18
1.2.2 Plaquetas e Hemostasia primária.....	21
1.2.3 Ativação Plaquetária.....	23
1.2.4 Função do Óxido nítrico	26
1.3 Doadores de NO	28
1.4 Citometria de Fluxo	29
1.4.1 Sondas fluorescentes e medida de NO	31
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 OBJETIVO GERAL.....	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 MATERIAL	36
3.1.1 Sangue humano	36
3.1.2 Drogas.....	36
3.1.3 Soluções fisiológicas	36
3.2. METODOLOGIA.....	37
3.2.1 Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas (PRP).....	37
3.2.2 Determinação da fluorescência por citometria de fluxo.....	38
3.2.2.1 Incubação com DAF- 2DA.....	38
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42

6. CONCLUSÃO.....	48
7. REFERENCIA	50
8. ANEXOS	54
PARECER SUBSTANCIADO DO CEP- HULW- ANEXO I.....	55

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares e cerebrovasculares continuam a ser a principal causa de morte no mundo (NIESWANDT et al., 2005). A maioria dos eventos isquêmicos coronarianos e cerebrais ocorre por oclusão vascular, ativação plaquetária, trombose e ruptura da placa aterosclerótica (MATADAMAS-ZÁRATE et al., 2009). As plaquetas estão envolvidas em vários processos, como modulação da resposta inflamatória, cicatrização de feridas, defesa do hospedeiro, entretanto, desempenham papel central no processo fisiológico normal da hemostasia e nos transtornos trombóticos (JURK; KEHREL, 2005).

As plaquetas são células anucleadas, produzidas a partir dos megacariócitos da medula óssea cuja, principal função esta relacionada aos processos fisiológicos e patológicos da hemostasia. Embora circulem normalmente sem aderir ao endotélio vascular intacto, várias patologias, como aterosclerose, hipertensão arterial, síndromes inflamatórias induzem uma resposta endotelial não controlada, relacionada à lesão, disfunção e ativação endotelial. (D'AMICO; VILLAÇA, 2006b; CASTRO et al., 2006; JACOBSON, 2002). Essas condições levam a exposição da matriz subendotelial ao sangue, provocando o recrutamento de plaquetas que aderem rapidamente à parede vascular, desencadeando a ativação plaquetária, formação do tampão de plaquetas seguida de atividade coagulante e formação do coágulo de fibrina que oclui o local de lesão (MATADAMAS-ZÁRATE et al., 2009; BROOS et al., 2012; BROOS et al., 2011; SILVERTHORN, et al., 2011).

Em condições normais, o endotélio vascular forma uma superfície não trombogênica que impede a aderência e a ativação de plaquetas e restringe o tamanho do trombo aos locais de lesão vascular. Essa propriedade é conferida pela capacidade da superfície endotelial produzir e secretar vários mediadores tais como prostaciclina (PGI₂), óxido nítrico (NO), fator ativador de plaquetas (PAF), fator de Von Willebrand, fator tecidual, que realizam o controle molecular da agregação plaquetária, da coagulação e da fibrinólise. (CARVALHO et al., 2001; D'AMICO; VILLAÇA, 2006). O NO desempenha papel fundamental na manutenção da integridade vascular e do fluxo sanguíneo por meio da modulação das interações plaqueta-endotélio vascular (JIN; LOSCALZO, 2010).

As plaquetas são capazes de sintetizar o NO e torná-lo biodisponível na circulação, sendo este mediador sintetizado no interior das plaquetas por diferentes isoformas da enzima NO sintase (NOS), que incluem: NOS induzível (iNOS ou NOS II), NOS neuronal (nNOS ou NOS I) e NOS endotelial (eNOS ou NOS III) (KU et al., 2007; FORSTERMANN; SESSA, 2011). Essas três isoformas catalisam a conversão de L-arginina e uma molécula de oxigênio

em NO e L-citrulina. Um vez formado, o NO difunde-se e se liga a ciclase de guanil solúvel (CGs). O aumento da atividade CGs eleva o nível intracelular de GMPc (guanosina monofosfato cíclico) com concomitante estimulação da atividade da proteína quinase dependente de GMPc (PKG). A PKG atua por meio da fosforilação de diversas proteínas, que subsequentemente inibem o aumento intracelular de cálcio (Ca^{2+}), rearranjos do citoesqueleto, ativação das integrinas e secreção de grânulos denso (JIN; LOSCALZO, 2010; VANNI et al., 2007; BROOS et al., 2012).

A intensa investigação relacionada às ações biológicas do NO demandam fontes exógenas de NO como ferramentas de pesquisa e como fármacos. O nitroprussiato de sódio (NPS), um composto nitroso inorgânico que libera o NO espontaneamente, utilizado comumente para o tratamento de crises hipertensivas. O NPS também é uma droga de escolha em estudos pré-clínicos e clínicos, onde é reconhecido como o padrão ouro dependente de NO (IGNARRO et al., 1981; MILLER; MEGSON, 2007).

Diversos métodos têm sido utilizados para a medida de NO em células, entre eles a citometria de fluxo se destaca pela sua vasta aplicabilidade clínica e em projetos científicos. Essa técnica se baseia na análise célula a célula em fluxo contínuo, avaliadas em relação à intensidade de fluorescência (OLIVEIRA et al., 2007). Neste estudo buscou-se determinar as condições experimentais ótimas para avaliar a produção ou presença de NO em plaquetas humanas utilizando a técnica de citometria de fluxo e avaliar a liberação de NO por doadores de NO em plaquetas humanas.

1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE HEMOSTASIA

A hemostasia é um processo fisiológico que tem como objetivo manter o sangue em estado fluido e livre de coágulos dentro dos vasos sanguíneos normais, preservando a integridade do compartimento vascular e limitando a perda excessiva de sangue (GOLAN, 2009; REZENDE, 2010).

O sistema hemostático é um dos mecanismos de defesa mais básicos do organismo, sendo o processo hemostático normal regulado por um conjunto complexo de ativadores e inibidores que envolvem a participação do endotélio vascular, plaquetas, fatores da coagulação e o sistema fibrinolítico. Na vigência de qualquer lesão vascular, esses componentes são ativados, visando o reparo do dano e manutenção da integridade do compartimento vascular (VIEIRA; OLIVEIRA; SÁ, 2007).

A hemostasia possui três passos principais: resposta vascular, formação do tampão hemostático (ou hemostasia primária) e formação do coágulo fibrina ou hemostasia secundária (GASPARD, 2004; SILVERTHORN et al., 2011; HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008).

- Resposta vascular

O primeiro passo em resposta a injúria vascular é a contração imediata dos vasos danificados causada por substâncias vasoconstritoras do endotélio. Nas artérias e arteríolas subjacentes ao sítio da lesão, ocorre vasoconstrição reflexa, diminuindo temporariamente o fluxo sanguíneo para a região da lesão. A diminuição do fluxo sanguíneo permite a ativação de contato de plaquetas e fatores da coagulação.

- Hemostasia primária

É o termo atribuído à formação do tampão plaquetário primário, que bloqueia mecanicamente o sítio de lesão. Ocorre logo em seguida a resposta vasoconstritora exercendo o controle temporário do sangramento. A formação do tampão hemostático primário instável envolve três etapas: adesão plaquetária, secreção e agregação plaquetária.

- Hemostasia secundária

Compreende o início de uma série de reações enzimáticas conhecidas como cascata da coagulação, que culmina na consolidação do tampão hemostático primário em uma massa sólida de fibrina (tampão estável ou coágulo). Finalmente, quando o vaso danificado é reparado, o coágulo se retrai e é lentamente dissolvido pela enzima plasmina (GASPARD, 2004; SILVERTHORN et al., 2011; HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008).

As plaquetas são corpúsculos celulares especializados do sangue que desempenham papel central nos processos fisiológicos e patológicos da hemostasia, inflamação, defesa do hospedeiro e metástase tumoral (JURK; KEHREL, 2005).

1.2.1 Plaquetas

As plaquetas são fragmentos celulares anucleados produzidos na medula óssea pela fragmentação do citoplasma dos megacariócitos, figura 1. (D'AMICO; VILLAÇA, 2006a; CASTRO et al., 2006; JACOBSON, 2002). O principal regulador da produção de plaquetas é a trombopoetina, que induz o aumento do número e ritmo de maturação dos megacariócitos (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008).

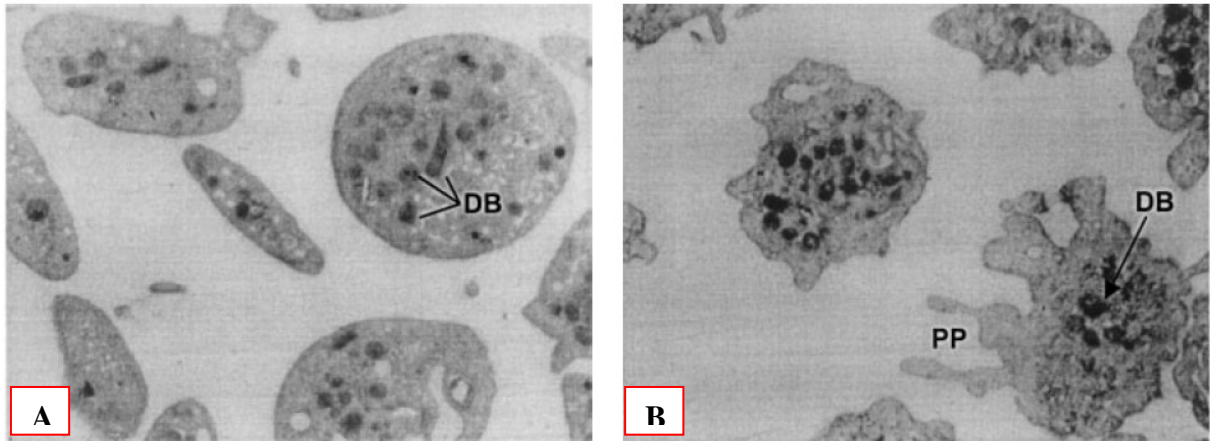


Figura 1: Morfologia das plaquetas humanas. A. Plaquetas inativas mostrando, forma discóide com grânulos uniformemente distribuídos. B. Plaquetas estimuladas, mostrando grânulos centralizados e formação de pseudópodes. DB, corpo denso, PP, pseudópodes.

Fonte: JURK, K.; KEHREL, B.E. Platelets: Physiology and Biochemistry. Seminars in Thrombosis and Hemostasis. v. 31, n. 4, 2005.

Nos indivíduos normais, a contagem de plaquetas é cerca de $250 \times 10^9/L$ (limites de 150 a $400 \times 10^9/L$) sendo que, aproximadamente, um terço da massa plaquetária total fica transitoriamente sequestrada no baço, permanecendo em equilíbrio com a circulação periférica. A vida média das plaquetas varia de sete a dez dias, durante esse período sua função normal é essencial, principalmente na fase inicial do processo hemostático, em que ocorrem às ações de aderência ao colágeno e agregação para formar o tampão hemostático no local da lesão vascular. (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008).

Apesar de sua aparência simples no esfregaço de sangue periférico, onde se apresentam como estruturas discóides e de aspecto granular, as plaquetas possuem elevada atividade bioquímica, uma vez que apresentam muitos dos componentes estruturais, metabólicos e sinalizadores presentes nas células nucleadas (GASPARD, 2004).

A plaqueta é morfologicamente subdividida em zonas estruturais (zona periférica, zona sol-gel e zona de organelas), cada qual relacionada a um aspecto funcional específico. A zona periférica esta envolvida primeiramente com a aderência, a zona sol-gel com a contração, e a zona de organelas com a secreção plaquetária (WHITE, 1976; RAPAPORT, 1990).

- Zona Periférica

A aderência de plaquetas a pontos de lesão vascular e entre plaquetas é uma fase crítica para formação de rolhas hemostáticas. A zona periférica das plaquetas está envolvida de modo crítico nesses fenômenos. Ela fornece o molde para interações químicas que geram a resposta plaquetária, o local físico para aderência de célula com célula e um mecanismo

desencadeador que transfere o estímulo do exterior das células para o interior plaquetário. A zona periférica pode ser ainda dividida em domínios diferentes: membrana superficial, membrana intermediária e região submembrana (WHITE, 1976; RAPAPORT, 1990; SPENCER; BECKER, 1997).

A membrana superficial é formada por um revestimento externo amorfo, o glicocálix, rico em glicoproteínas, que recobre a membrana intermediária e o sistema canalicular aberto que penetra na matriz plaquetária. O glicocálix é o local adesivo das plaquetas e, permanece sobre estas antes, durante e depois da agregação (WHITE, 1976; RAPAPORT, 1990).

As principais glicoproteínas presentes na superfície plaquetária, identificadas como essenciais para o funcionamento normal das plaquetas são as glicoproteína Ib (GPIb) e o complexo GPIIb/IIIa que se forma durante a ativação plaquetária. Essas glicoproteínas são proteínas transmembranas, que fornecem sítios de ligação na superfície externa e superfície interna (para filamentos de actina durante a ativação plaquetária) da membrana (RAPAPORT, 1990).

A membrana intermediária é uma típica membrana trilaminar, essencial para a integridade da plaqueta. A área imediatamente abaixo da membrana intermediária, apropriadamente chamada de região submembrana, representa uma transição entre a zona periférica e a matriz do hialoplasma. Essa região contém distintas redes de microfilamentos que estão anatomicamente e funcionalmente associados tanto as glicoproteínas da membrana como aos extensos filamentos citoplasmáticos, desempenhando importante papel na manutenção da forma discoide da plaqueta, na formação e estabilização de pseudópodes e, auxiliando na retração de projeções superficiais durante a mudança de forma da plaqueta (WHITE, 1976).

- Zona sol-gel

A zona sol-gel é considerada uma divisão morfológica da célula relacionada à função contrátil. No exame em microscópio eletrônico, a matriz citoplasmática é formada por sistemas fibrosos, que variam seu estado de polimerização, conferindo relativa plasticidade a matriz citoplasmática durante a mudança de forma da plaqueta. Essa característica é essencial para a fusão dos grânulos plaquetários, contração de pseudopodes e retração de coágulo (WHITE, 1976).

- Zona de organelas

Uma variedade de organelas está distribuída ao acaso na matriz citoplasmática da plaqueta não estimulada. Elas incluem: Grânulos grandes (corpúsculos densos, grânulos alfa,

grânulos lisossomais), grânulos finos de glicogênio e mitocôndrias (WHITE, 1976; RAPAPORT, 1990; SPENCER; BECKER, 1997).

Os grânulos são importante fonte de substancias secretada durante a ativação plaquetaria. Os grânulos alfa são ricos em fibrinogênio, fator de Von Willebrand, fator V, fator de crescimento derivado de plaquetas (FCDP), fator plaquetário 4. Enquanto os corpúsculos densos são ricos em ATP, ADP, serotonina e íons cálcio (RAPAPORT, 1990).

- Sistemas internos de membrana

A plaqueta contém dois sistemas internos de membrana, o sistema canalicular aberto e o sistema tubular denso. O sistema canalicular aberto é formado por múltiplas invaginações da membrana plaquetária. Durante a ativação plaquetária, a parede secreta seus grânulos através destes canais. Além de que, o sistema canalicular aberto fornece membrana para a formação de pseudopodes após a ativação.

O sistema tubular denso é constituído de restos do retículo endoplasmático. Este sistema membranoso não se comunica com o exterior e serve como local depósito de íons cálcio (RAPAPORT, 1990).

1.2.2 Plaquetas e Hemostasia primária

Em condições normais, o endotélio vascular forma uma superfície não trombogênica que impede a aderência de plaquetas. Essa propriedade é conferida pela capacidade da superfície endotelial produzir e secretar vários mediadores tais como prostaciclina (PGI₂), óxido nítrico (NO), fator ativador de plaquetas (PAF), fator de Von Willebrand, fator tecidual, que realizam o controle molecular da agregação plaquetária, da coagulação e da fibrinólise (CARVALHO et al., 2001; D'AMICO; VILLAÇA, 2006a).

Na vigência de uma lesão vascular, a matriz subendotelial é exposta ao sangue, provocando o recrutamento de plaquetas que aderem rapidamente à parede vascular, a fim de limitar a hemorragia e promover cicatrização dos tecidos. A matriz subendotelial contém varias macromoléculas adesivas tais como o colágeno, fator de Von Willebrand (VWF), laminina, fibronectina e trombospondina, todos os quais servem de ligantes para os diferentes receptores da superfície das plaquetas. Entre estes substratos subendoteliais, o colágeno (fibrilas de colágeno tipo I e III) é o mais potente mediador da adesão plaquetaria, devido ao seu alto potencial ativador de plaquetas e afinidade pelo VWF (MATADAMAS-ZÁRATE et al., 2009; BROOS et al., 2011; BROOS et al., 2012).

A adesão estável das plaquetas à matriz subendotelial ocorre em um processo coordenado que envolve contato, rolamento, ativação e firme adesão ao sítio de lesão vascular, figura 2. As interações adesivas iniciais entre plaquetas e matriz subendotelial que culminam na adesão plaquetária dependem das condições reológicas locais, e ocorrem por diferentes mecanismos. Em baixas taxas de cisalhamento (como por exemplo, nas veias e grandes artérias) a adesão das plaquetas envolve principalmente a ligação ao colágeno, fibronectina e laminina. Em altas taxas de cisalhamento (tal como nas arteríolas), o VWF é essencial para desacelerar a velocidade de fluxo das plaquetas por meio da ligação reversível com a glicoproteína Ib α (GPIb α), componente do complexo GP Ib-V-IX, da superfície plaquetária.

Assim, a GP Ib-V-IX é a principal responsável pela adesão plaquetária ao subendotélio. Esta ligação inicial permite o estabelecimento de interações adicionais entre as plaquetas e a matriz subendotelial, como a ligação do colágeno aos receptores GPVI e $\alpha 2\beta 1$ (GPIa/IIa). Os receptores para o colágeno reforçam mutuamente suas atividades, garantindo ótima aderência das plaquetas e ativação pelo colágeno. A ligação do receptor $\alpha 2\beta 1$ (GPIa/IIa) ao colágeno, indiretamente resulta na ativação celular reforçando e melhorando a interação GPVI- colágeno, como também conduz à ativação da GPIIb/IIIa (α Ib β 3) (MATADAMAS-ZÁRATE et al., 2009; BROOS et al., 2011; BROOS et al., 2012).

A glicoproteína GPIIb/IIIa (α Ib β 3) é a mais abundante nas plaquetas, estando presente na superfície da membrana e nas membranas dos grânulos α . Quando há ativação plaquetária a densidade dessa glicoproteína, no estado ativo de alta afinidade por ligantes solúveis, aumenta na superfície da membrana plaquetária. Embora a GP Iib/IIIa seja considerado o principal receptor para agregação plaquetária, este também medeia a firme adesão de plaquetas através da ligação ao VWF e imobilização do fibrinogênio. (MATADAMAS-ZÁRATE et al., 2009; BROOS et al., 2011; BROOS et al., 2012).

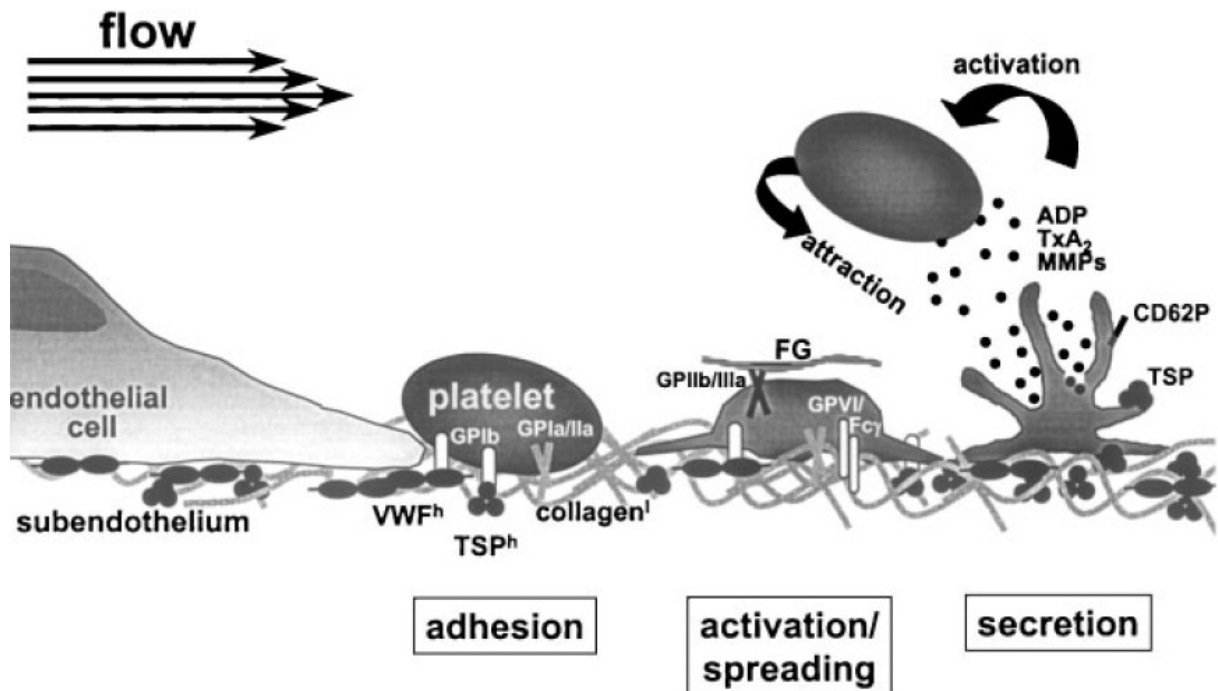


Figura 2: Ilustração representativa dos mecanismos de adesão e ativação plaquetária.

Fonte: JURK, K.; KEHREL, B.E. Platelets: Physiology and Biochemistry. Seminars in Thrombosis and Hemostasis. v. 31, n. 4, 2005.

1.2.3 Ativação Plaquetária

Da mesma forma que em outras células, as plaquetas podem ser ativadas por diferentes vias de transdução de sinais. Os receptores de adesão plaquetária são os principais iniciadores da ativação plaquetária nos locais de lesão vascular. Apesar de diferenças significativas em suas funções e vias de sinalização, os principais receptores de adesão plaquetária partilham muitas semelhanças em seus mecanismos de transdução de sinal, os quais envolvem principalmente a ativação de vias de sinalização associadas às quinases (tirosina quinase, serina/treonina quinases).

A ativação dessas vias de sinalização conduz a ativação da fosfolipase C γ (PC γ), com posterior mobilização do Ca²⁺. O aumento da concentração citosólica de Ca²⁺ resulta em uma infinidade de reações, incluindo ativação da fosfolipase A2 (PLA₂), alteração da forma das plaquetas, secreção dos grânulos e, finalmente, agregação plaquetária. Além desses efeitos, o aumento dos níveis de cálcio também é responsável pela exposição de fosfolípidios de membrana carregados negativamente (fosfatidilserina) na superfície da plaqueta, proporcionando uma superfície procoagulante com sítios de ligação para fatores da coagulação dependentes de vitamina K, co-fatores e seus substratos, os quais aceleram a cascata de coagulação (BROOS et al., 2012; LI et al., 2010).

Quando ocorre ativação plaquetária, as proteínas do citoesqueleto, particularmente a actina e a miosina, se reorganizam em microfilamentos, fornecendo a força contrátil que promove a mudança da forma plaquetária e a formação de pseudópodes. Durante esse processo, os microtúbulos também se contraem contribuindo para a forma esferoide das plaquetas ativas e reorganização dos grânulos secretórios no centro da célula (D'AMICO; VILLAÇA, 2006a). Estas alterações estruturais aumentam consideravelmente as interações interplaquetárias e com a parede vascular além de que, preparam as plaquetas para a secreção de seus grânulos (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008).

Os grânulos secretórios fundem suas membranas com as membranas do sistema canalicular aberto, fazendo com que o conteúdo granular seja secretado para o meio periplaquetário- primeiro a partir dos grânulos alfa e corpúsculos densos e, posteriormente dos grânulos lisossomais. A concentração local do conteúdo granular com atividade agonista sobre as plaquetas (ADP, TXA₂), resulta em um maior número de plaquetas ativadas e envolvidas no processo de formação do tampão hemostático primário (D'AMICO; VILLAÇA, 2006a; HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008).

A estimulação das plaquetas leva a um aumento da expressão de receptores ativos de GP IIb/IIIa, que fazem ligações cruzadas entre plaquetas, com o fibrinogênio fazendo o papel de ponte entre duas plaquetas. A agregação ou ligação interplaquetária resulta em conexões mais firmes, desenvolvimento do tampão e ativação progressiva das plaquetas. Entretanto, o tampão hemostático primário apresenta plaquetas frouxamente agregadas necessitando ser consolidado em tampões estáveis. A consolidação do tampão ocorre quando é formada sobre as plaquetas uma malha de fibrina, que aumenta a força da ligação entre as plaquetas, fazendo com que as plaquetas individuais percam suas bordas distintas e pareçam se fundir. Essa característica é conferida pela atividade pró-coagulante das plaquetas, que possibilita a ocorrência de reações enzimáticas sobre o tampão plaquetário, que culmina com a geração de trombina e consequente formação da rede de fibrina. (D'AMICO; VILLAÇA, 2006a; JURK; KEHREL, 2005; HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008; RAPAPORT, 1990).

A ativação plaquetária ocorre basicamente pelos mecanismos de adesão ao subendotélio em um local lesado, pela exposição ao colágeno, e à primeira trombina formada. À medida que as plaquetas são ativadas, liberam mediadores que ampliam a ativação plaquetária. Estas substâncias incluem os produtos de oxidação do ácido araquidônico formados pela via da ciclooxigenase (PGH₂ e tromboxano A₂), fator de ativação plaquetária ou PAF (indutor lipídico), difosfato de adenosina (ADP) (RANG et al., 2008).

O tromboxano A₂ (TXA₂) é gerado como consequência do aumento de Ca²⁺, que é necessário para ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂). A PLA₂ cliva ácidos graxos de fosfolipídios de membrana (fosfatidilcolina e fosfatidilserina), liberando o ácido araquidônico (ácido 5, 8, 11, 14- eicosatetraenóico), um substrato para a ciclo-oxigenase (COX-1 em plaquetas), formando endoperóxidos altamente instáveis PGG₂ e PGH₂ como os primeiros produtos. Estes são transformados pela tromboxano sintase em TXA₂. A liberação de TXA₂ induz contração das células musculares lisas e ativação adicional das plaquetas por atuar nos receptores TP (receptor prostanóide) das plaquetas.

O receptor TP é um receptor acoplado à proteína G (GPCR) que interage com a proteína Gq que tem a fosfolisase C (PLC) como principal molécula efetora. Os receptores para trombina (PAR-1 e PAR-4), ADP (P2Y₁), receptor para PAF-1, também estão acoplados a Gq-PLC (BROOS et al., 2011; BROOS et al., 2012).

A quebra de fosfolipídios de inositol da membrana é considerada evento chave para ativação plaquetária. Os agonistas plaquetários ligam-se a seus receptores específicos na membrana plaquetária, promovendo a ativação dos mesmos. Esses receptores atuam essencialmente por ativação da PLC via proteína Gq. A estimulação da fosfolipase C, leva a hidrólise do fosfolipídio de membrana, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂), em diacilglicerol (DAG) e inositol- 1, 4, 5-trifosfato (IP₃). O DAG e o IP₃ agem sinergicamente para produzir as respostas celulares da ativação plaquetária. O IP₃ age como um ionóforo de cálcio (Ca²⁺), aumentando a concentração transitória do cálcio no citoplasma, a partir do sistema tubular denso e exterior da plaqueta. O DAG, juntamente com o Ca²⁺, ativa a enzima proteína quinase C (PKC), desencadeando a fosforilação proteica, secreção granular e exposição de receptores para o fibrinogênio. O Ca²⁺ liga-se a calmodulina, ativando a cadeia leve da miosina (MLC) aumentando as interações da miosina e actina, produzindo mudanças da forma e atividade secretória das plaquetas. A secreção granular, em resposta a mobilização do Ca²⁺, conduz à liberação de ADP a partir dos corpos densos. O ADP liga-se de volta a seus receptores da membrana P2Y₁ e amplifica ativação plaquetária (RAPAPORT, 1990; D'AMICO; VILLAÇA, 2006a; JURK; KEHREL, 2005), figura 3.

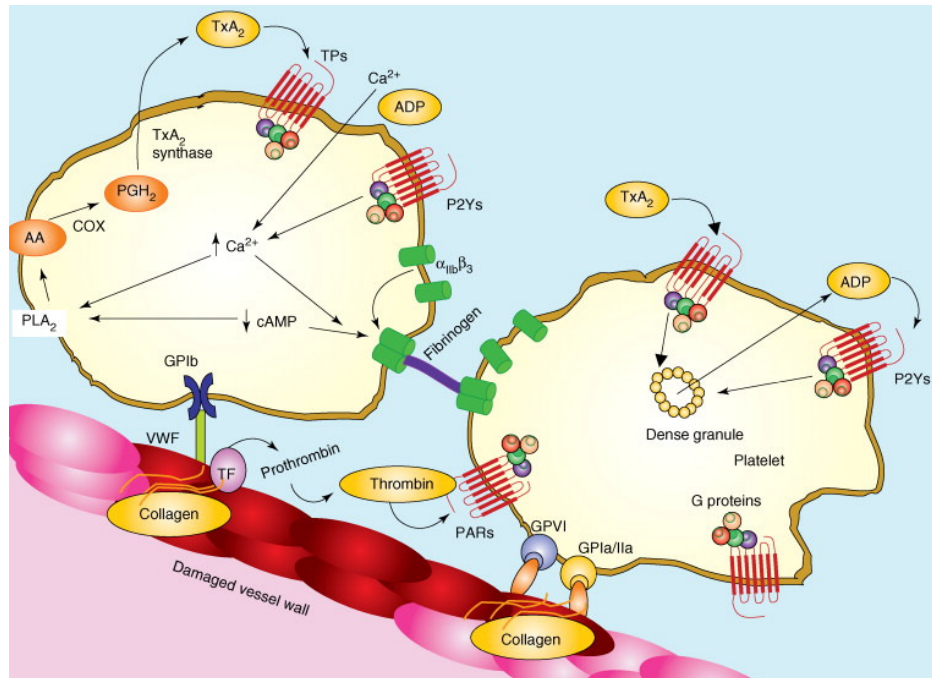


Figura 3: Representação esquemática dos mecanismos moleculares de ativação plaquetária. Fonte: GRESELE, P.; FALCINELLI, E.; MOMI, S. Potentiation and priming of platelet activation: a potential target for antiplatelet therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 29, p. 352–360, 2008.

1.2.4 Função do Óxido nítrico

Embora as plaquetas desempenhem um importante papel hemostático, na formação do tampão e cicatrização de feridas, a hiper-reatividade pode levar a trombose vascular e suas sequelas clínicas. Normalmente, as plaquetas circulam em um estado inativo, suprimida por três sistemas bioquímicos: prostaciclina, ecto-ADPase, e NO. A prostaciclina é o principal produto do metabolismo do ácido araquidônico nas células endoteliais, inibe as plaquetas através de mecanismo dependentes de AMPc (Adenosina monofosfato cíclico) que reduz diretamente a mobilização de Ca^{2+} e liberação dos grânulos. A Ecto-ADPase endotelial é responsável pela inativação do ADP liberado, devido à conversão enzimática do ADP em adenosina monofosfato (AMP), limitando a ativação plaquetária e a agregação induzida pelo ADP (JIN; LOSCALZO, 2010; JURK; KEHREL, 2005).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula estruturalmente simples que participa de vários eventos biológicos, incluindo o relaxamento do músculo liso vascular, a inibição da proliferação de músculo liso, neurotransmissão, e da agregação de plaquetas. Esse mediador desempenha papel fundamental na manutenção da integridade vascular e do fluxo sanguíneo através da modulação das interações plaqueta- endotélio vascular (JIN; LOSCALZO, 2010).

As plaquetas tem a capacidade de sintetizar o NO e torná-lo biodisponível na circulação. No interior das plaquetas o NO é sintetizado por diferentes vias, a partir da enzima NO sintase (NOS), da desnitrosação enzimática de S-nitrosotióis (S-nitrosoglutationa ou S-nitrosoalbumina) ou através de proteínas complexadas ao cobre (KU et al., 2007). Nos mamíferos, o NO pode ser gerado por três isoformas diferentes da NOS, que incluem: NOS induzível (iNOS ou NOS2), NOS neuronal (nNOS ou NOS1) e NOS endotelial (eNOS ou NOS3) (FORSTERMANN; SESSA, 2011).

Todas as isoformas da NOS são enzimas citosólicas solúveis que ligam o aminoácido L-arginina (substrato), o oxigênio molecular e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (co-substratos) e cálcio-calmodulina. A flavina adenina dinucleótido (FAD), flavina mononucleótido (FMN) e tetraidrobiopterina (BH4) funcionam como grupos prostéticos ligados. A atividade da NOS é regulada pelo complexo ativo cálcio-calmodulina, formado em função do aumento da concentração citoplasmática de íons cálcio. A L-arginina é oxidada gerando L-citrulina e NO pela ação da NOS. A sinalização fisiológica mais importante do NO envolve a ativação da enzima ciclase de guanil solúvel (sCG) e a produção do segundo mensageiro cGMP (RANG et al., 2008; FORSTERMANN; SESSA, 2011).

O cGMP é o principal determinante das ações inibitórias do NO nas plaquetas. Os efeitos inibitórios associados às ações desse segundo mensageiro ocorrem principalmente através da redução da concentração de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), modulação da expressão de receptores de superfície. A redução da $[Ca^{2+}]_i$ ocorre pela inibição da liberação de Ca^{2+} via receptor do sistema tubular denso, aumento da taxa de extrusão do Ca^{2+} , redução da entrada de Ca^{2+} a partir do meio extracelular, aumento da atividade da Ca^{2+} -ATPase do retículo endoplasmático, resultando em níveis menores de Ca^{2+} disponíveis para os mecanismos de ativação e agregação. Além da redução dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , o GMPc também reduz o número total de receptores GPIIb/IIIa conformacionalmente ativos sobre a superfície plaquetária, promovendo aumento da dissociação entre o fibrinogênio e o receptor GPIIb/IIIa, resultando em condições desfavoráveis para a agregação de plaquetária. Além disso, o GMPc regula a expressão de moléculas de adesão, como a P-selectina, na superfície das plaquetas e células endoteliais, promovendo a inibição da adesão. Outro mecanismo pelo qual o NO inibe a função plaquetária, é representada pela fosforilação do receptor de TXA2 que serve como um substrato para a PKG conduzindo a ação prejudicada do receptor em ativar e promover a agregação plaquetaria (JIN; LOSCALZO, 2010; VANNI et al., 2007) figura 4.

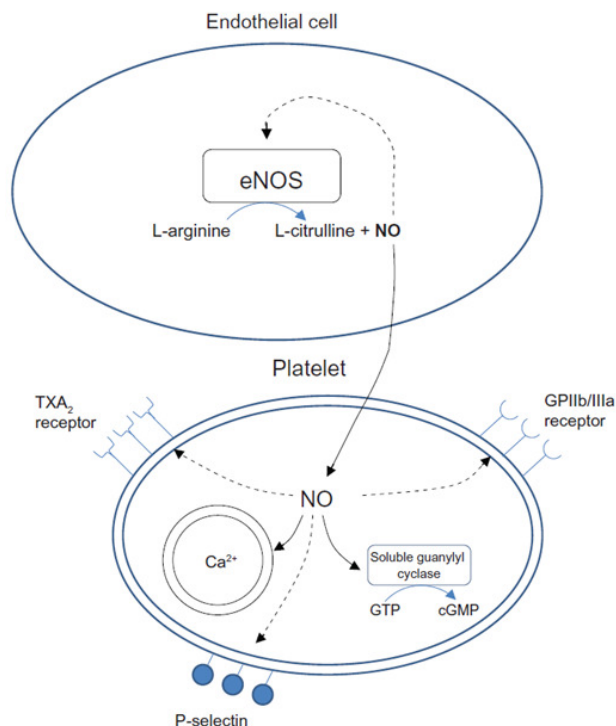


Figura 4: Representação esquemática dos mecanismos de inibição plaquetária via produção de óxido nítrico (NO).

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

1.3 Doadores de NO

A intensa investigação relacionada às ações biológicas do NO demandam fontes exógenas como ferramentas de pesquisa e como fármacos. Os doadores de NO são substâncias farmacologicamente ativas utilizadas no tratamento de doenças cardiovasculares há mais de 150 anos. Estes compostos geralmente apresentam um grupo nitroso funcional em sua molécula e liberam o NO em condições *in vivo* e *in vitro*, reproduzindo a resposta do NO endógeno ou substituindo-a em situações de deficiência (FEELISCH, 1998; BATES et al., 1991).

Diferenças estruturais dos diversos doadores de NO têm levado a reatividades e mecanismos de liberação do NO consideravelmente variados. Geralmente esse processo ocorre de forma espontânea ou não-enzimática, enquanto outros necessitam de catálise enzimática para liberá-lo (BARRETO; CORREIA, 2005).

Um doador de NO de uso clínico corrente é o nitroprussiato de sódio (NPS), um composto nitroso inorgânico que libera o NO espontaneamente. O SNP é usado em hospitais para fornecer rápida redução da pressão arterial em crises hipertensivas. Além de ser também

uma droga de escolha em estudos pré- clínicos e clínicos, onde é reconhecido como o padrão ouro dependente de NO (IGNARRO et al.,1981; MILLER; MEGSON, 2007).

Ativação plaquetária intravascular é evidente em condições clínicas como, síndromes isquêmicas, hipertensão, diabetes mellitus, e insuficiência renal. Tais circunstâncias são caracterizadas pelo estresse oxidativo crônico, o que aumenta o risco cardiovascular, em parte, pela diminuição da disponibilidade de NO bioativo, permitindo a falha no controle da função plaquetária desencadeando eventos trombóticos (GORDGE; XIAO, 2010). Estas considerações fornecem uma justificativa para o uso de agentes doadores de NO, a fim de limitar o risco de eventos trombóticos.

1.4 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo (CF) é um método analítico que consiste na medida simultânea e, em seguida análise de várias características de células ou partículas individuais, quando estas se encontram suspensas em meio fluido. As propriedades medidas relacionam-se as características físicas e químicas de células coradas ou não com fluorocromos, estas incluem o tamanho da célula, granulosidade ou complexidade interna e intensidade de fluorescência relativa (BAKKE, 2001; OLIVEIRA et al., 2007)

O citômetro de fluxo é o aparelho utilizado para análise de células quando estas passam em fluxo laminar através de um feixe de luz. Citômetros mais modernas utilizam lasers como fonte de luz e transportam as células sob análise para interceptarem os lasers utilizando fluido ou ar (RAHMAN et al., 2006; BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual, 2006; Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide, 2000).

O citômetro de fluxo é composto por três sistemas principais: fluídicos, óptico e eletrônico (RAHMAN et al., 2006; BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual, 2006; Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide, 2000).

- **Fluídico**

No sistema fluídico a amostra a ser analisada é movida de forma ordenada, em uma corrente de células individuais, através de uma célula de fluxo, passando por um feixe de laser, que é crucial para o processamento de informações precisas sobre cada célula na amostra (RAHMAN et al., 2006; BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual, 2006; Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide, 2000).

- **Óptico**

Cada célula ao interceptar um ou mais feixes de luz, provoca a dispersão de luz ou emissão de fluorescência (se a célula analisada é marcada com um fluorocromo). A luz espalhada e emitida a partir dessas células fornece informações sobre o seu tamanho, forma, granulosidade e propriedades de fluorescência. Uma vez que as células se movem rapidamente através da célula de fluxo, a dispersão ou emissão de fluorescência tem uma duração muito curta, apenas alguns microssegundos. Este breve flash de luz é recolhido, filtrado e, em seguida, convertido em um sinal elétrico pelos detectores (RAHMAN et al., 2006; BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual, 2006; Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide, 2000).

Quando uma célula ou partícula passa através de um feixe de laser focado, a luz laser é dispersa em todas as direções. A Luz dispersa aproximadamente na mesma direção, chamada de dispersão frontal (FSC), indica as diferenças relativas no tamanho das células ou partículas e a luz dispersa perpendicularmente ao feixe de laser é chamado de dispersão lateral (SSC), indica diferenças relativas à complexidade interna ou granulosidade das células ou partículas (RAHMAN et al., 2006; BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual, 2006; Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide, 2000).

Quando as células ou partículas coradas com anticorpos conjugados com fluorocromos ou sondas fluorescentes passam através de um feixe de laser, os corantes podem absorver fótons (energia) e serem promovidos a um estado eletrônico excitado. Ao retornar ao seu estado fundamental, os corantes liberam energia, a qual é emitida como luz. Esta emissão de luz é chamada de fluorescência. A fluorescência é sempre um comprimento de onda maior (fótons de energia mais baixa) do que o comprimento de onda de excitação. Alguns compostos fluorescentes emitem a um comprimento de onda maior do que o seu comprimento de onda de excitação. PerCP absorve a luz azul (488 nm) e emite uma luz vermelha (675 nm); outros fluorocromos, como FITC, absorvem a luz azul (488 nm) e emitem luz verde (530 nm). Estas diferenças entre excitação e emissão permitem que um laser excite muitos fluorocromos (RAHMAN et al., 2006; BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual, 2006; Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide, 2000).

- **Eletrônicos**

O sistema eletrônico converte os sinais ópticos em sinais eletrônicos e digitaliza-os para análise no computador, transformando-os em dados estatísticos, que podem ser apresentados em vários formatos gráficos.

Existem dois principais tipos de detectores: o fotodiodo e o tubo fotomultiplicador (PMT). O fotodiodo é usado para detectar o sinal mais forte do FSC (gerado pela luz do laser

azul). Os PMTs mais sensíveis são usados para detectar os sinais mais fracos e SSC gerados por todos os canais de fluorescência ((RAHMAN et al., 2006; BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual, 2006; Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide, 2000).

1.4.1 Sondas fluorescentes e medida de NO

A quantificação do NO produzido constitutivamente pelas isoformas da NOS é um desafio devido à baixa produção desse mediador endógeno. Medidas dos níveis intracelulares de NO em muitos estudos, no entanto, dependem de métodos indiretos para prever as variações dos níveis intracelulares de NO, como avaliação da atividade da NOS (ensaio de citrulina e medida de cGMP) e determinação dos níveis de nitrato/nitrito (NO_x) e de métodos diretos como ensaios de quimiluminescência e espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica e métodos amperométricos com eletrodos específicos para NO. As principais desvantagens da maior parte desses métodos são a falta de especificidade para o NO ou a baixa sensibilidade que não permite a detecção de NO libertado constitutivamente (STRIJDOM; MULLER, LOCHNER, 2004; RÄTHEL et al., 2003) .

O método ideal para medida de NO deve ser capaz de detectar níveis baixos de NO e ser de fácil mensuração (RÄTHEL et al., 2003). A abordagem que mais se aproxima a estas exigências é a utilização de sondas de fluorescência. A sonda mais comumente utilizada é a 2-diacetato diaminofluoresceína (DAF- 2DA), um indicador em tempo real de NO intracelular permeável a membrana plasmática. O DAF-2DA é clivado, por meio da ação de esterases plasmáticas, em 3,4-diaminofluoresceína (DAF-2). O DAF-2 é retido na célula e reage com o NO na presença de oxigênio. Esta reação produz o triazolodiaminofluoresceína (DAF-2T), um produto altamente fluorescente, que quando excitado a um comprimento de onda de 488nm emite uma fluorescência em 515nm, permitindo quantificar a formação de NO, representado na figura abaixo (PLANCHET; KAISER, 2006; STRIJDOM; MULLER, LOCHNER, 2004; RÄTHEL et al., 2003; HALBACH, 2003).

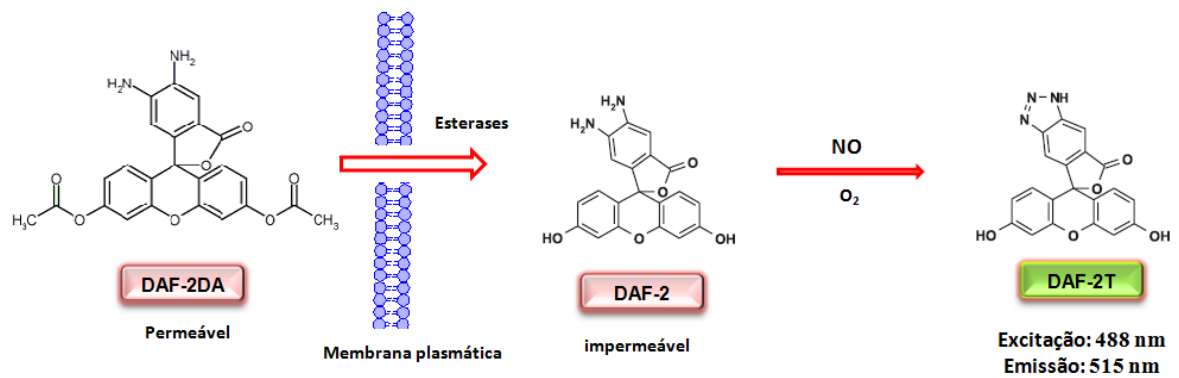


Figura 5: Representação esquemática da medida dos níveis de NO a partir da formação de DAF- 2T. DAF-2 DA permeia através da membrana plasmática e é hidrolisado por esterases intracelulares para DAF-2. DAF-2 reage com NO para formar a triazolodiaminofluoresceína. Adaptado de Halbach, O. V. B. Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. Nitric Oxide, v. 9, p. 217–228, 2003.

Objetivo

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar e implantar a técnica de medida de óxido nítrico por citometria de fluxo no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba- UFPB .

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar as condições ótimas para avaliar a produção ou presença de óxido nítrico (NO) em plaquetas humanas utilizando citometria de fluxo:

- Determinar a concentração e tempo de incubação da sonda DAF- 2DA para medida de NO em plaquetas humanas.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Sangue humano

Os protocolos realizados em plasma humano foram desenvolvidos utilizando sangue coletado, a ser descartado, de pacientes voluntários do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW). Todos os protocolos experimentais realizados foram aprovados pelo CEP- HULW sob o parecer nº 45813 (Anexo 1).

3.1.2 Drogas

Durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes substâncias: 2-diacetatodiaminofluoresceína (DAF- 2DA) e o nitroprussiato de sódio (NPS), todos obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo-SP, Brasil), as quais foram dissolvidas em água destilada.

3.1.3 Soluções fisiológicas

Foram utilizadas as soluções de ACD e HANK para lavagem e ressuspensão de plaquetas. A composição das soluções está descrita nas tabelas abaixo.

Tabela 1 - Composição da solução de HANK

Compostos	Concentração em g/L
NaCl	8,0 g
CaCl ₂	0,14 g
KCl	0,4 g
NaHCO ₃	0,35 g
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,1 g
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	0,06 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
MgSO ₄	0,06 g
Glicose	1,0 g

Tabela 1- Composição da solução de ACD

Compostos	Concentração em g/L
Citrato de sódio	22 g
Ácido cítrico	8 g
Glicose	24,5 g

3.2. METODOLOGIA

3.2.1 Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

O sangue coletado a vácuo foi depositado em tubo plástico siliconado contendo citrato de sódio a 3,8% na proporção de 9 partes de sangue para 1 de anticoagulante (9:1) (SUGIDACHI et al., 2001), em seguida foram levados à centrifugação em rotação de 130 g por 5 minutos, tendo por objetivo a separação do PRP dos demais sedimentos de maior peso que ficam no fundo do tubo.

O PRP sobrenadante foi coletado e depositado em tubo cônico para lavagem das plaquetas, utilizando para isso a solução de HANK/ACD (6:1). Para o procedimento de lavagem das amostras, foram adicionados duas partes de HANK/ACD em uma parte de PRP e levadas a centrifugação a 3000 rpm por 1 min, em seguida o sobrenadante foi retirado e desprezado e o pellet de plaquetas ressuspense em 1 mL de solução de HANK/ACD. O procedimento de lavagem foi repetido três vezes (3x) e ao final as plaquetas foram ressuspensas com a solução de HANK/ACD. As amostras foram consideradas viáveis por um período de até 3 horas após a coleta do sangue.

As plaquetas foram contadas em câmara de Neubauer e tiveram sua concentração ajustada para 3×10^8 plaquetas/mL, caso necessário. A figura 6 representa a sequência de eventos realizados para obtenção do PRP.

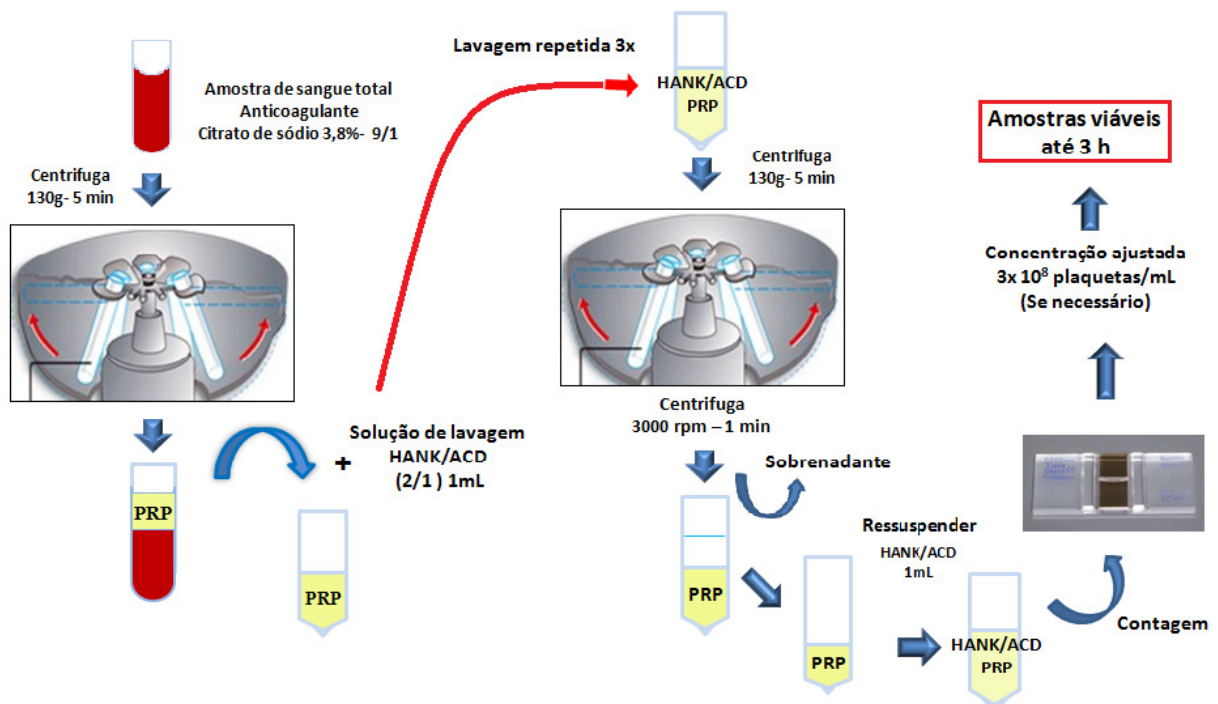


Figura 6: Representação esquemática da sequência de procedimentos realizados para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP).

3.2.2 Determinação da fluorescência por citometria de fluxo

3.2.2.1 Incubação com DAF- 2DA

A presença do NO nas plaquetas foi avaliada pelo DAF- 2T (emite fluorescência em 538nm, quando excitada a 488 nm) formado a partir do DAF- 2DA, uma sonda fluorescente que comumente indica a presença do NO (KOJIMA, NAKATSUBO et al., 1998; NAKATSUBO, KOJIMA et al., 1998), através da citometria de fluxo. Em cada análise foram coletados 10000 eventos, os quais foram excitados com laser de 488 nm e a fluorescência emitida coletada em canal FITC, que detecta sinais de fluorescência no intervalo de 515-545nm (FACS CantoII® Becton & Dickson, San Jose, CA, USA)

Inicialmente, a suspensão de plaquetas foi dividida em duas alíquotas, as quais foram incubadas com diferentes concentrações de DAF-2DA (2,5 μ M e 10 μ M). As medidas foram realizadas ao longo de 60 minutos em intervalos de 15 minutos. Nestes experimentos a fluorescência obtida no tempo zero foi considerada como sendo a basal.

Em seguida, a fluorescência emitida por DAF- 2T foi determinada na presença de NPS (10 μ M), um clássico doador de NO. Neste protocolo experimental, diferentes alíquotas de plaquetas foram incubadas com DAF- 2DA nas concentrações de 2,5 μ M e 10 μ M e em

diferentes tempos (30 e 60 minutos). Ao final deste período, NPS (10 μM) foi adicionado e a fluorescência medida em intervalos de 5 minutos, ao longo de 15 minutos, figura 7. Nestes experimentos a fluorescência obtida apenas na presença de DAF- 2DA foi considerada como sendo a basal e aquela obtida após a adição de NPS foi designada como sendo a pós-estímulo. Os resultados foram expressos como a porcentagem da diferença entre a fluorescência obtida após a estimulação (F1) e a fluorescência basal (F0), de acordo com a seguinte fórmula: $[(F1 - F0) \times 100 / F0]$.

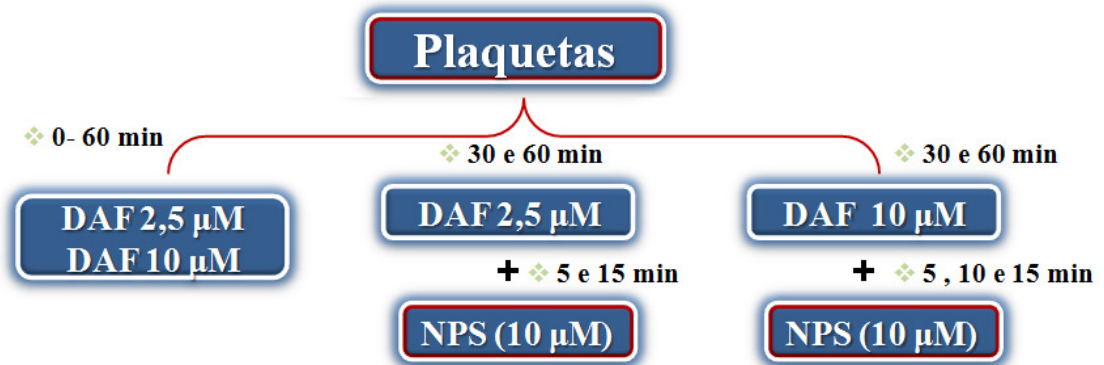


Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental para medição de NO em três condições: suspensão de plaquetas incubadas apenas com DAF- 2DA, DAF- 2DA(2,5 μM) + NPS (10 μM) e DAF- 2DA(10 μM) + NPS (10 μM).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Foram utilizados teste t e ANOVA one way, seguido do pós-teste de bonferroni para avaliar os resultados de três experimentos realizados em duplicata. Diferenças entre médias de diferentes grupos foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

Para obtenção dos resultados foram realizados três experimentos em duplicata.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento de técnicas laboratoriais com elevada sensibilidade e especificidade é essencial para correta medida de NO, contudo, as diferentes metodologias adotadas nos diferentes grupos de pesquisa levam a discrepâncias dos resultados obtidos. Dessa forma, a padronização da medida de NO é essencial para a reprodutibilidade do experimento, atribuindo confiabilidade as medidas de NO.

A chave do sucesso na medida da produção de NO em qualquer tipo de célula é a otimização das diferentes variáveis que afetam a intensidade de sinal. Uma dessas variáveis é a concentração ótima da sonda a ser introduzida na suspensão de plaquetas. Geralmente, vários pesquisadores utilizam a concentração de 10 μM de DAF-2DA para investigar a produção de NO, porém a fluorescência basal gerada pela sonda nesta concentração muitas vezes resulta em um sinal de fluorescência muito elevado e isto pode mascarar negativamente produções em pequena escala (KU et al., 2007). Para otimizar a emissão resultante da produção de NO, duas diferentes concentrações de DAF-2DA foram introduzidas a uma suspensão de plaquetas e a fluorescência mensurada a cada 15 minutos, figura 8.

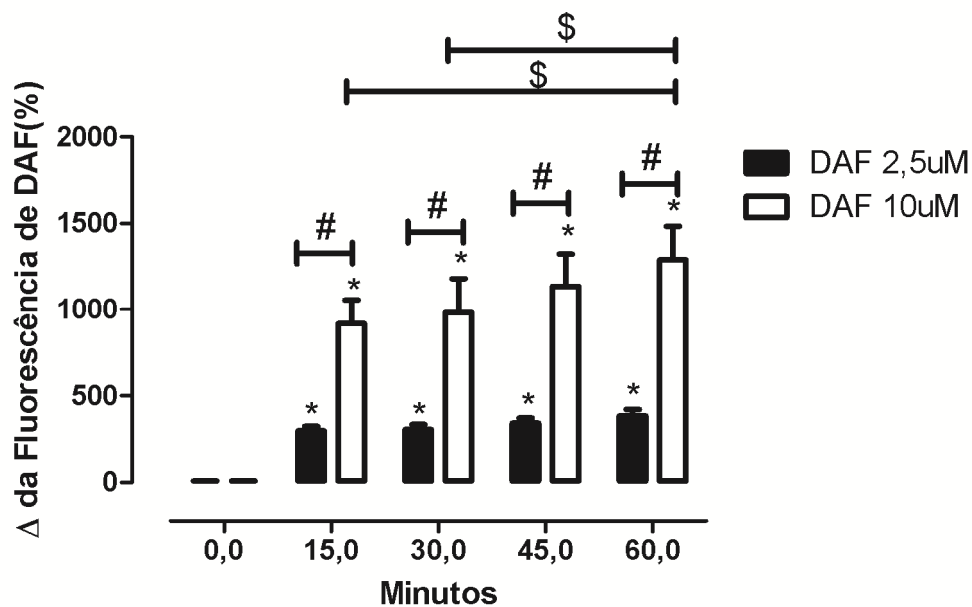


Figura 8: Barras representativas da diferença percentual da intensidade de fluorescência da sonda DAF-2DA entre as concentrações de 2,5 μM e 10 μM e na ausência da sonda. Medida dos níveis de NO produzido por plaquetas expressa como intensidade de fluorescência do DAF-2DA (2,5 μM e 10 μM) em função do tempo. Dados representativos de 3 n em duplicata. Valores expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ versus fluorescência basal (tempo 0), # versus DAF 2,5 μM , \$ versus DAF 10 μM (60 min).

Os dados da Figura 8 demonstram que as plaquetas incubadas tanto com 2,5 μM quanto com 10 μM de DAF-2DA demonstram uma mudança significativa na intensidade de fluorescência após a adição desta sonda em todos os diferentes tempos de incubação. A intensidade de fluorescência em todos os tempos de aquisição foi sempre maior nas plaquetas incubadas com 10 μM de DAF-2DA do que naquelas incubadas com 2,5 μM de DAF-2DA. Outro achado importante é que o tempo de incubação não influencia a intensidade de fluorescência quando as plaquetas são incubadas com 2,5 μM de DAF-2DA, mas não tem efeito similar nas plaquetas incubadas com 10 μM de DAF-2DA. Neste grupo de investigação, a intensidade de fluorescência obtida nos tempos de 15 e 30 minutos diferem significativamente daquela obtida com 60 minutos, a qual teve o maior percentual de aumento de fluorescência ($1290 \pm 193\%$). Desta forma, pode-se observar que será mais conveniente optar por tempos de incubação de 15 ou 30 minutos, não significativamente diferentes ($915 \pm 140\%$ e $980 \pm 200\%$, respectivamente, $p > 0,05$), do que o tempo de 60 minutos, pois neste tempo a fluorescência a ser considerada como basal será muito elevada podendo oferecer resultados falso-negativos para a produção de NO quando houver estimulação farmacológica sobre as plaquetas.

Uma determinação de fluorescência também foi realizada com a incubação de NPS (10 μM), figuras 9 e 10.

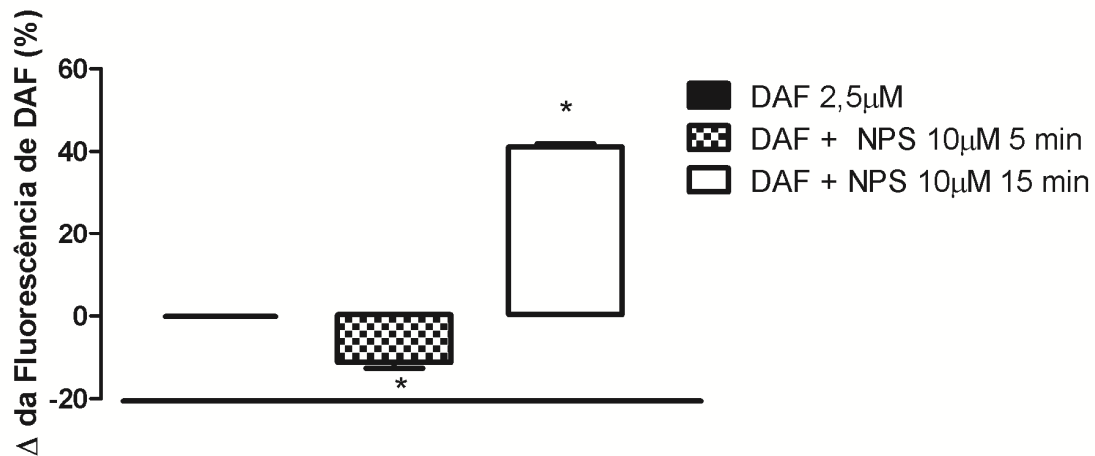


Figura 9: Barras representativas do efeito do NPS (10 μM) sobre os níveis de NO expressos como diferença percentual de fluorescência em plaquetas ($\sim 3 \times 10^8$ plaquetas/mL) usando o DAF-2DA (2,5 μM) incubado por 30 minutos. Dados representativos de 3 experimentos em duplicata. A produção basal foi considerada zero e a diferença de fluorescência foi expressa nos tempos de incubação do NPS (5 e 15 min). Valores expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ versus fluorescência basal DAF-2DA (2,5 μM).

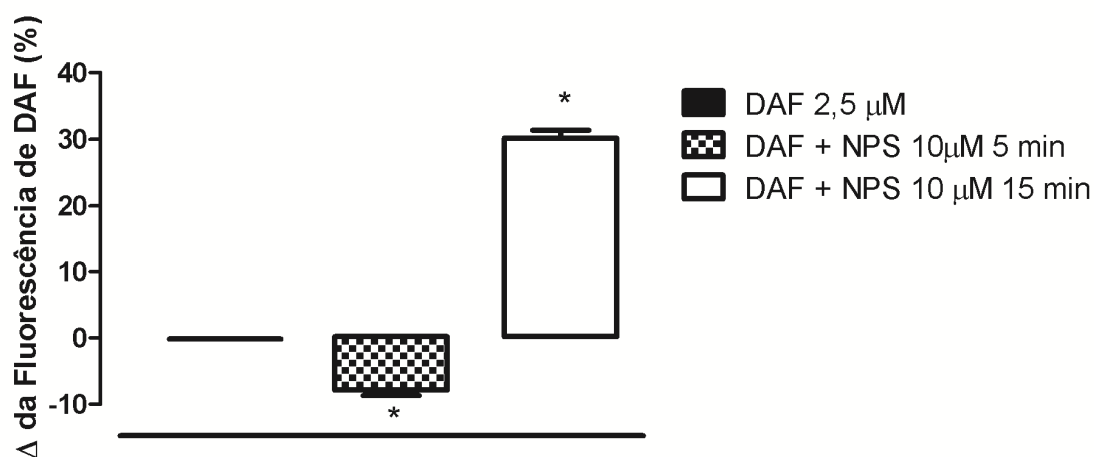


Figura 10: Barras representativas do efeito do NPS (10 μM) sobre os níveis de NO expressos como diferença percentual de fluorescência em plaquetas ($\sim 3 \times 10^8$ plaquetas/mL) usando o DAF-2DA (2,5 μM) incubado por 60 minutos. Dados representativos de 3 experimentos em duplicata. A produção basal foi considerada zero e a diferença de fluorescência foi expressa nos tempos de incubação do NPS (5 e 15 min). Valores expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ versus fluorescência basal DAF-2DA (2,5 μM).

Na presença deste clássico doador de NO e utilizando a pré-incubação de 2,5 μM de DAF-2DA, a diferença significativa do sinal de fluorescência versus o basal (apenas DAF-2DA) apenas foi evidenciada aos 15 minutos após a incubação do NPS, a qual foi maior quando o DAF foi incubado por 30 minutos (aumento de $41 \pm 1\%$) do que aquela obtida quando DAF foi pré-incubado por 60 minutos (aumento de $30 \pm 1,2\%$), figuras 9 e 10.

Ao utilizar o mesmo procedimento experimental com DAF-2DA a 10 μM, obtiveram-se resultados semelhantes, nos quais se observa que a incubação excessiva de DAF-2DA por 60 minutos prejudica a obtenção de sinais de fluorescência, quando comparado a resultados obtidos com DAF-2DA pré-incubado por apenas 30 minutos, figuras 11 e 12.

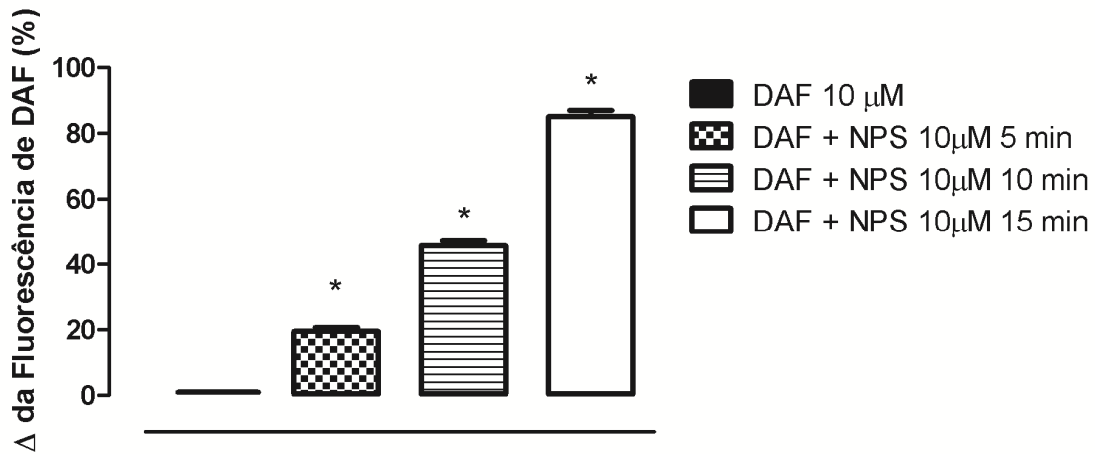


Figura 11: Barras representativas do efeito do NPS (10 μM) sobre os níveis de NO expressos como diferença percentual de fluorescência em plaquetas ($\sim 3 \times 10^8$ plaquetas/mL) usando o DAF-2DA (10 μM) incubado por 30 minutos. Dados representativos de 3 experimentos em duplicata. A produção basal foi considerada zero e a diferença de fluorescência foi expressa nos tempos de incubação do NPS (5, 10 e 15 min). Valores expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ versus fluorescência basal DAF-2DA (10 μM).

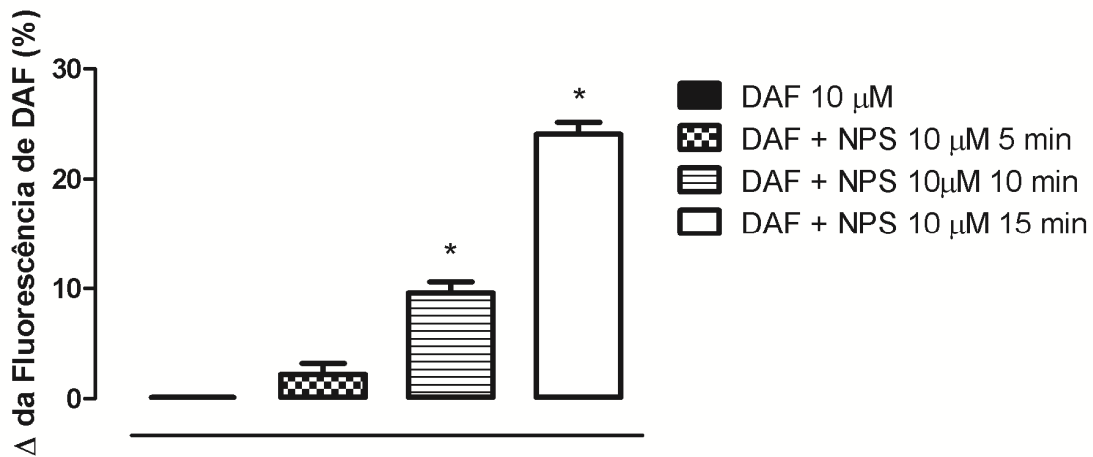


Figura 12: Barras representativas do efeito do NPS (10 μM) sobre os níveis de NO expressos como diferença percentual de fluorescência em plaquetas ($\sim 3 \times 10^8$ plaquetas/mL) usando o DAF-2DA (10 μM) incubado por 60 minutos. Dados representativos de 3 experimentos em duplicata. A produção basal foi considerada zero e a diferença de fluorescência foi expressa nos tempos de incubação do NPS (5, 10 e 15 min). Valores expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ versus fluorescência basal DAF-2DA (10 μM).

A intensidade de fluorescência gerada pela presença de NPS (10 μM) foi superior aos 5 minutos ($19 \pm 1,2\%$ vs $2,2 \pm 1,2\%$), aos 10 minutos ($45 \pm 1,5\%$ vs $9,6 \pm 1,2$) e aos 15 minutos ($85 \pm 2\%$ vs $24 \pm 1,1\%$) quando o DAF-2DA foi pré- incubado durante 30 e 60 min, respectivamente, figuras 11 e 12.

O uso da citometria de fluxo e o uso de sondas fluorescentes para se medir produção de NO pode ser extremamente vantajosa frente a outras técnicas tais como a amperometria, porque uma vez ativadas, as plaquetas adquirem a habilidade de aderir drasticamente às superfícies e na amperometria as medidas tornam-se muito irregulares e isto não ocorre na citometria de fluxo.

No sistema *In vivo*, essa habilidade de aderir a superfícies é responsável por reparar lesões, estimular a coagulação sanguínea localizada e formar trombos na parede interna dos vasos. Caso isto ocorra de forma desordenada pode ser desencadeado um processo de trombose e bloqueio do fluxo sanguíneo, levando a uma isquemia e desenvolvimento de processo de arteriosclerose. Desta forma, o monitoramento da presença de NO nas plaquetas, o qual age como um antiagregante pode ser extremamente útil para se monitorar futuros eventos trombóticos, principalmente em pacientes hipertensos, diabéticos, portadores de esclerose múltipla e fibrose cística.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

A técnica de medida de NO padronizada neste trabalho, demonstrou que as variáveis, concentração e tempo de incubação da sonda DAF- 2DA são fatores críticos para mensuração da produção de NO em sistemas biológicos.

Conforme com os resultados obtidos concluímos que a utilização da sonda DAF- 2DA na concentração de 10 μM e incubada por um tempo de 30 minutos oferece sensibilidade satisfatória para medida de NO produzido constitutivamente assim como na presença de um doador de NO de liberação espontânea.

Referencia

7. REFERENCIA

BAKKE, A. C. The Principles of Flow Cytometry. **Laboratorymedicine**. v. 32(4), p. 207-211, 2001.

BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, n.6, p. 1046 -1054, 2005.

BATES, J. N.; BAKER, M. T.; GUERRA, J. R. R.; HARRISON, D. G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochemical Pharmacology**, v. 42 (Suppl), p. S157 – S165, 1991.

BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual. **BD Biosciences** San Jose, CA, p. 13-158, 2006.

BROOS, K; FEYS, H. B; MEYER, S. F.; VANHOORELBEKE, K.; DECKMYN, H. Platelets at work in primary hemostasis. **Blood Reviews**, v. 25, p. 155–167, 2011.

BROOS, K; MEYER, S. F.; FEYS, H. B.; VANHOORELBEKE, K.; DECKMYN, H. Blood platelet biochemistry. **Thrombosis Research**, v.129, p. 245–249, 2012.

CARVALHO, M. H. C.; NIGRO, D.; LEMOS, V. S.; TOSTES, R. C. A.; FORTES, Z. B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.8, p. 76- 88, 2001.

CASTRO, H. C. *et al.* Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, p. 321-332, 2006.

D'AMICO, E. A; VILLAÇA, P. R. Fisiologia da Hemostasia. In:___ **Atlas de Hematologia: Clínica Hematológica Ilustrada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.139- 163, 2006a.

D'AMICO, E. A; VILLAÇA, P. R. Fisiopatologia da Hemostasia. In:___ **Atlas de Hematologia: Clínica Hematológica Ilustrada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 587-601, 2006b.

FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 358, p. 113 – 122, 1998.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829 - 837, 2011.

GASPARD, K. J. Alterações na Hemostasia. In:___ **Fisiopatologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 250- 260, 2004.

GOLAN, D. E. Farmacologia da Hemostasia e Trombose. In:___ **Princípios de Farmacologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 356- 383, 2009.

GORDGE, M. P.; XIAO, F. S-nitrosothiols as selective antithrombotic agents – possible mechanisms. **British Journal of Pharmacology**. v. 159, p. 1572–1580, 2010.

GRESELE, P.; FALCINELLI, E.; MOMI, S. Potentiation and priming of platelet activation: a potential target for antiplatelet therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, p. 352–360, 2008.

HALBACH, O. V. B. Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. **Nitric Oxide**, v. 9, p. 217–228, 2003.

HOFFBRAND, A. V; MOSS, P. A. H; PETTIT, J. E. Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia. In:___ **Fundamentos em hemostasia**, 5º ed, Porto Alegre: Editora Artmed, p. 274-288, 2008.

IGNARRO, L J; LIPPTON, H; EDWARDS, J. C; BUCOS, W. H; HYMAN, A. L; KADOWRRZ, P. J; GRUEI'RZA, C. A.: Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 218, p. 739-749, 1981.

Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. **BD Biosciences**. San Jose, CA, 2000

JACOBSON, J. Óxido Nítrico: Propriedades Protetoras das Plaquetas Durante a Circulação Extracorpórea/ECMO. **The journal of extracorporeal technology**, v. 34, p. 144-147, 2002.

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

JURK, K.; KEHREL, B.E. Platelets: Physiology and Biochemistry. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**. v. 31, n. 4, 2005.

KOJIMA, H.; NAKATSUBO, N.; KIKUCHI, K. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. **Anal. Chem.** , v. 70, p. 2446-2453, 1998.

KU, C.; KARUNARATHNE, W.; KENYON, S.; ROOT, P.; SPENCE, D. Fluorescence determination of nitric oxide production in stimulated and activated platelets. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 2421- 2426, 2007.

LI, Z.; DELANEY, M. K.; O'BRIEN, K. A.; DU, X. Signaling during platelet adhesion and activation. **Arterioscler, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, p. 2341–2349, 2010.

MATADAMAS-ZÁRATE, C.; HERNÁNDEZ-JERÓNIMO, J.; EDUARDO PÉREZ, C.; MAJLUF-CRUZ, A. Alteraciones plaquetarias en la diabetes mellitus tipo 2. *Archivos de Cardiología de México*, v. 79, p.102-108, 2009.

MILLER, M. R.; MEGSON, I. L Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 305-321, 2007.

NAKATSUBO, N.; KOJIMA, H.; KIKUCHI, K. Detection and imaging of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. **FEBS Lett**, v. 427, p. 263-266, 1998.

NIESWANDT, B.; AKTAS, B.; MOERS, A.; SACHS, U. J. H. Platelets in atherothrombosis: lessons from mouse models. **Journal of Thrombosis and haemostasis**, v. 3, p. 1725–36, 2005.

OLIVEIRA, R. A. G.; MAURINO, B. B.; PEREIRA, J.; OSHIRO, M. Automação em hematologia: contadores multiparamétricos. In: ___ **Hemograma: como fazer e interpretar**, 2º ed, São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, p. 115- 164, 2007.

PLANCHET, E.; KAISER, W. M. Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 3043–3055, 2006

RANG, H. P.; DALE, M.M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. Hormônios locais, inflamação e reações imunológicas. In:___ **Farmacologia**, 6 ed, Rio de Janeiro: Elsevier, p. 202- 225, 2007.

RAPAPORT, S. I. Mecanismos de hemostasia. In:___ **Introdução a hematologia**, 2º ed, São Paulo: Livraria Roca, p. 330- 358, 1990.

RÄTHEL, T. R; LEIKERT, J. F; VOLLMAR, A. M; DIRSCH, V. M. Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells in vitro. **Biological Procedures Online**, v. 5, p. 136-142, 2003.

REZENDE, S. M. Distúrbios da hemostasia: doenças hemorrágicas. **Revista de Medicina Minas Gerais**, v. 20, n.4, p. 534-553, 2010.

RAHMAN, M.; LANE, A.; SWINDELL, A.; BARTRAM, S. Introduction to Flow Cytometry. **Serotec Ltd**. p. 1-33, 2006.

SILVERTHORN, D. U.; JOHNSON, B. R.; OBER, W. C.; GARRISON, C. W.; SILVERTHORN, A. C. Sangue. In:___ **Fisiologia Humana: Uma abordagem integrada**, 5^o ed, Porto Alegre: Editora Artmed, p. 547- 567, 2011.

SPENCER, F. A.; BECKER, R. C. Platelets: Structure, and their fundamental contribution to hemostasis and pathologic thrombosis. **Developments in Cardiovascular Medicine**, v. 193, p. 31-49, 1997.

SUGIDACHI, A.; ASAI, F.; YONEDA, K., IWAMURA, R.; OGAWA, T.; OTSUGURO, K.; KOIKE, H. Antiplatelet action of R-99224, an active metabolite of a novel thienopyridine-type Gi-linked P2T antagonist, CS-747. **British Journal of Pharmacology**, v. 132, p. 47-54, 2001.

STRIJDOM, H.; MULLER, C.; LOCHNER, A. Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diamino fluorescein. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 37, p. 897–902, 2004.

VANNI, D. S.; HORSTMANN, B.; BENJO, A. M.; DAHER, J. P. L.; KANAAN, S.; SLEIMAN, M. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 181- 189, 2007.

VIEIRA, C. S; OLIVEIRA, L. C. O; SÁ, M. F. S. Hormônios Femininos e Hemostasia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n.10, p. 538-47, 2007.

WANG, Y.; HAMMES, F.; ROY, K.; VERSTRAETE, W; BOON, N. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. **Trends in Biotechnology**. v. 28, n. 8, p. 416-424, 2010.

WHITE, J. G. Morfologia das plaquetas. In:___ **Hematologia**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 825- 838, 1976.

ANEXOS

PARECER SUBSTANCIADO DO CEP- HULW- ANEXO I

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

PROJETO DE PESQUISA

Título: Estudo da Atividade Antiagregante Plaquetária e Antitrombótica de Compostos de Origem Natural e/ou Sintética

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Pesquisador: Robson Cavalcante Veras

Versão: 1

Instituição: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

CAAE: 02722012.5.0000.5183

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 45813

Data da 29/05/2012

Apresentação do Projeto:

A agregação plaquetária é um processo central no desenvolvimento de complicações isquêmicas tanto após intervenções coronárias como também em outros vasos, pois gera a formação de trombos muitas vezes ainda no ambiente intravascular e estes são de difícil tratamento agudo. O óxido nítrico parece apresentar um efeito antiagregante e antitrombótico.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a atividade de drogas doadoras de nitratos orgânicos derivados do álcool tetra-hidrofurfurílico sobre a agregação plaquetária.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos presumíveis. A identificação de novas possibilidades terapêuticas contribuirá para uma melhor abordagem do paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Racionalidade extremamente consistente e procedimentos metodológicos apropriados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Proposta muito bem estruturada em termos de fundamentação teórica e metodológica e com a clareza desejável para o julgamento dos aspectos éticos.

Recomendações:

Rever TCLE (acessar modelo online disponível na página do CEP - Hospital Universitário Lauro Wanderley e adaptá-lo à pesquisa específica).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Favorável ao desenvolvimento da investigação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Ratificamos o parecer de aprovado. Solicitamos o atendimento às recomendações do CEP-HULW,