



ANA CAROLINA ANTUNES NAIME

**EFEITO DA PRAVASTATINA NA AGREGAÇÃO E
NÚMERO DE PLAQUETAS CIRCULANTES EM RATOS
TRATADOS E NÃO TRATADOS COM LPS**

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

ANA CAROLINA ANTUNES NAIME

**EFEITO DA PRAVASTATINA NA AGREGAÇÃO E NÚMERO DE
PLAQUETAS CIRCULANTES EM RATOS TRATADOS E NÃO TRATADOS
COM LPS**

Orientadora: Profa. Dra. Sisi Marcondes Paschoal

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ANA CAROLINA ANTUNES NAIME E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. SISI MARCONDES PASCHOAL.

Assinatura da Orientadora

Campinas
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Juliana Ravaschio Franco de Camargo - CRB 8/6631

N143e Naime, Ana Carolina Antunes, 1987 -
Efeito da pravastatina na agregação e número de plaquetas
circulante em ratos tratados e não tratados com LPS / Ana Carolina
Antunes Naime. – Campinas, SP: [s.n.], 2014.

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

1. Plaquetas. 2. Sepse. 3. Lipopolissacarídeos. 4. Pravastatina. 5.
Inibidores de hidroximetilglutaril-CoA redutases. I. Paschoal, Sisi
Marcondes, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of aggregation in pravastatin and current number of plates
in rats treated and untreated with LPS

Palavras-chave em inglês:

Blood platelets

Sepsis

Lipopolysaccharides

Pravastatin

Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestra em Farmacologia

Banca examinadora:

Sisi Marcondes Paschoal [Orientador]

Gabriel Forato Anhô

Claudio Chrysostomo Werneck

Data de defesa: 27-01-2014

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

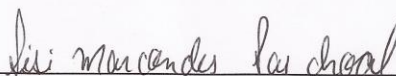
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ANA CAROLINA ANTUNES NAIME

Orientador (a) PROF(A). DR(A). SISI MARCONDES PASCHOAL

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). SISI MARCONDES PASCHOAL



2. PROF(A). DR(A). GABRIEL FORATO ANHÊ



3. PROF(A). DR(A). CLÁUDIO CHRYSOSTOMO WERNECK



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

Data: 27 de janeiro de 2014

Dedicatória

Aos meus pais, Silvana e José Maria, minha referência de vida, exemplos de dedicação, inteligência, humildade e alegria. Eternamente grata pelos incentivos e esforços infinitos para minha formação.

A minha irmã, Iris, pelo companheirismo, amor incondicional e apoio constante.

A minha família, que mesmo distante, estava presente com carinho e incentivo.

Aos amigos que conheci durante minha jornada e aos amigos de Nepomuceno, Alfenas e Campinas, obrigada pelo apoio, carinho, amizade e pelas eternas lembranças boas que me proporcionaram.

Às meninas da Pensão e da República Chavascasa por terem me acolhido tão bem, pelo companheirismo nos momentos alegres e difíceis e por me proporcionarem momentos inesquecíveis.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Sisi Marcondes, pela confiança, exemplo profissional, amizade e pela oportunidade. Minha admiração e gratidão;

Aos meus queridos amigos do laboratório de “Reatividade plaquetária” Dra. Elisa, Gisele, Pedro, Nádia e Débora, que me ajudaram nos experimentos e com os quais eu desenvolvi uma grande amizade;

Aos colegas da “Bioquímica”, “Célula”, “Cascata” e “Edema”, em especial à Dra. Gláucia, Dra. Marina, Dra. Dalize, Dr. Lineu, Diana e Camila pelos ensinamentos, amizade e por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável e alegre;

Aos Profs. Dr. Edson, Dr. Stephen Hyslop, Dr. Gabriel Anhê e Dra. Elen pelos laboratórios e ensinamentos científicos;

Aos Profs. José Vassalo Dra. Carmen Silvia Passos Lima pela colaboração científica e por cederem o uso do microscópio óptico. Ao técnico do laboratório de investigação em patologia, Paulo Latuf, por confeccionar as lâminas e ajudar na leitura destas;

Ao Toninho, da Galeno, pela colaboração técnica;

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Unicamp pela atenção, ajuda e paciência;

À FAPESP e à CNPq pelo apoio financeiro;

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

Sumário

LISTA DE MATERIAIS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Septicemia e Lipopolissacarídeo.....	17
1.2 Lipopolissacarídeo e Espécies Reativas de Oxigênio.....	20
1.3 Lipopolissacarídeo e Plaquetas.....	22
1.4 Estatinas e Sepse.....	25
2 OBJETIVO.....	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Animais.....	29
3.2 Grupos experimentais.....	29
3.3 Obtenção de plaquetas lavadas.....	29
3.4 Contagem diferencial e total de leucócitos.....	30
3.5 Contagem de plaquetas no sangue total.....	30
3.6 Contagem de megacariócitos.....	30
3.7 Determinação de Trombopoetina.....	31
3.8 Determinação de TNF- α	31
3.7 Agregação plaquetária.....	31
3.9 Determinação de GMPc intraplaquetário.....	31
3.10 Determinação de EROs por citometria de fluxo.....	32
3.11 Determinação da superóxido dismutase (SOD).....	32
3.12 Determinação da Glutathione Peroxidase (GPx).....	32
3.13 Determinação da Glutathione Redutase (GR).....	32

3.14 Análise estatística.....	32
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Efeito do tratamento da pravastatina no número de leucócitos totais e na porcentagem de neutrófilos e linfócitos em ratos injetados com LPS.....	34
4.2 Efeito do tratamento da pravastatina no número de plaquetas circulantes, no número de megacariócitos e na concentração de trombopoetina de ratos injetados com LPS.....	35
4.3 Efeito da pravastatina sobre os níveis plasmáticos de TNF- α	36
4.4 Efeito da pravastatina na agregação plaquetária e nos níveis de GMPC de plaquetas lavadas.....	37
4.5 Efeito da pravastatina na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e em sistemas de plaquetas lavadas.....	38
5 DISCUSSÃO.....	59
6 CONCLUSÕES.....	59
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

Lista de materiais

Substância	Procedência
ADP	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
DCFH-DA	Sigma- Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
LPS	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
Pravastatina	Pharma Nostra – Lote 11114129F (Campinas, Brasil)

Lista de abreviaturas

ADP	Adenosina di-fosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
DCFH-DA	2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GCs	Guanilil cilase solúvel
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GTPase	Guanosina trifosfatase
GPIIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
GPIbα	Glicoproteína Ib α
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativadora de mitógeno

MC	Megacariócitos
NADPH oxidase	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo (fosfato) oxidase
NF-κB	Fator nuclear κB
NO	Óxido Nítrico
c-NOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
e-NOS	Óxido nítrico sintase endotelial
i-NOS	Óxido nítrico sintase induzível
n-NOS	Óxido nítrico sintase neuronal
O₂^{•-}	Ânion superóxido
OH[•]	Radical hidroxila
ONOO^{•-}	Peroxinitrito
PAF	Fator de ativação plaquetária
PGI₂	Prostaciclina
PI3K	Fosfatidilinositol 3- quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PLC	Fosfolipase C

P. mirabilis

Proteus mirabilis

SOD

Superóxido desmutase

TLR4

Toll-like receptor 4

TNF- α

Fator de necrose tumoral α

TXA₂

Tromboxano A₂

vWf

Fator de von Willebrand

XD

Xantina desidrogenase

XO

Xantina oxidase

XOR

Xantina óxido redutase

Lista de figuras

Figura 1: Efeito da pravastatina no número de leucócitos em sangue periférico de ratos tratados com salina ou LPS.

Figura 2 - Efeito da pravastatina na porcentagem de neutrófilos e linfócitos em sangue periférico de ratos tratados com salina ou LPS.

Figura 3 – Efeito da pravastatina nos níveis plasmáticos de trombopoetina e no número de plaquetas e megacariócitos em ratos injetados com salina ou LPS.

Figura 4 - Efeito da pravastatina no número de megacariócitos na medula óssea de fêmures de animais infectados com salina ou LPS.

Figura 5 - Efeito da pravastatina nos níveis plasmáticos de TNF- α .

Figura 6 - Efeito da pravastatina na agregação plaquetária e nos níveis de GMPc de plaquetas lavadas.

Figura 7- Efeito da pravastatina na liberação de EROs em plaquetas lavadas.

Figura 8 - Efeito da pravastatina na atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR) de plaquetas lavadas.

Resumo

A sepse leva a uma alta taxa de mortalidade em hospitais de todo o mundo e por se tratar de um quadro clínico muito complexo ainda não há tratamento eficaz para o mesmo. Nas últimas décadas tem-se dado destaque para o papel das plaquetas na sepse, já que a gravidade do quadro correlaciona-se com o número de plaquetas circulantes e seu estado de ativação. Uma vez que as estatinas têm sido usadas clinicamente com muito sucesso no tratamento de doenças inflamatórias, decidimos investigar o efeito da pravastatina em plaquetas de ratos saudáveis e em modelo experimental de sepse induzida por lipopolissacarídeo (LPS). Para tanto, ratos foram tratados com solução salina ou pravastatina 20 mg/kg (gavagem, uma vez ao dia durante 7 dias). No sexto dia, os ratos de ambos os grupos receberam uma única injeção de salina ou de LPS (1 mg/kg, i.p.) e após 48h o sangue arterial foi coletado. A determinação plasmática de TNF- α e trombopoietina foi feita por ELISA. O número de megariócitos foi determinado pela histologia da medula óssea. A agregação plaquetária foi induzida por ADP (1-10 μ M). A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e GMPc foi analisada em plaquetas por citometria de fluxo utilizando a sonda fluorescente DCFH-DA e por kit comercial, respectivamente. Também foi avaliada a atividade enzimática da SOD e glutathione peroxidase (GPx) em plaquetas através de kits comerciais. Nos ratos injetados com salina, a pravastatina aumentou 3,7 vezes os níveis plasmáticos de TNF- α . Além disso, a pravastatina reduziu 36% o número de plaquetas circulantes. A agregação plaquetária induzida por ADP foi significativamente reduzida por esta estatina, a qual foi acompanhada de uma redução dos níveis intraplaquetários de GMPc. Apesar do aumento marcante da atividade enzimática da SOD e da GPx, a pravastatina aumentou 2,4 vezes a quantidade de EROs em plaquetas de ratos injetados com salina. A pravastatina reduziu o número aumentado de leucócitos

totais observado em ratos injetados com LPS para os mesmos valores encontrados em ratos injetados com salina. A concentração plasmática aumentada de TNF- α também foi reduzida pelo pré-tratamento com pravastatina, mas ainda permaneceu significativamente maior do que a observada em ratos injetados com salina. O LPS reduziu 6.8 vezes o número de plaquetas circulantes, o qual foi acompanhado por aumento do número de megacariócitos e redução de trombopoetina. O pré-tratamento com pravastatina restaurou os valores de trombopoetina e megacariócitos, mas não preveniu a queda do número de plaquetas circulantes. A agregação plaquetária induzida por ADP foi inibida por LPS e restaurada pela pravastatina. A quantidade de EROs em plaquetas de ratos injetados com LPS foi 2,2 vezes maior do que a observada em ratos injetados com salina, o qual foi acompanhado por um aumento significativo da atividade enzimática da SOD e da GPx. O pré-tratamento com pravastatina dos ratos injetados com LPS não modificou a quantidade de EROs intraplaquetária, mas reduziu de forma marcante a atividade enzimática da SOD e da GPx. Portanto, nossos resultados mostram que a administração de pravastatina em animais saudáveis, além de levar a trombocitopenia e estresse oxidativo plaquetário, promove um aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α , o que poderia incorrer em danos teciduais a longo prazo. A pravastatina restaura a agregação plaquetária e melhora o quadro inflamatório dos ratos injetados com LPS. Entretanto, esta estatina não previne a queda acentuada do número de plaquetas circulantes, marcador importante para avaliação da gravidade da sepse, e nem reduz o estresse oxidativo plaquetário, o que poderia contribuir para a disfunção de diferentes tecidos. Sendo assim, a pravastatina não parece ser uma boa opção no tratamento da sepse.

Abstract

Sepsis is still a cause of high mortality in hospitals all over the world. It is a very complex clinical condition and up to now there is no effective treatment. In the last decades works have been published describing the important role of platelets in sepsis, since the severity of the condition is correlated to the number of circulating platelets and their activation state. Statins, besides their action on lowering the cholesterol levels, have been successfully used in the treatment of inflammatory diseases. Therefore, in the present study we decided to investigate the effect of pravastatin in platelets of healthy rats and in model of experimental sepsis induced by lipopolysaccharide (LPS). Rats were treated with saline or pravastatin (20 mg/kg, gavage once daily for 7 days). On the sixth day, the rats in both groups received a single injection of saline or LPS (1 mg / kg, i.p.) and after 48h the arterial blood was collected. Plasmatic TNF- α and thrombopoietin concentrations were measured by ELISA. The number of megakaryocytes was determined by histology of the bone marrow. Platelet aggregation was induced by ADP (1-10 mM). The formation of reactive oxygen species (ROS) and cGMP in platelets was analyzed by flow cytometry using DCFH-DA and by commercial kits, respectively. We also analyzed the enzymatic activity of SOD and glutathione peroxidase (GPx) in platelets using commercial kits. In rats injected with saline, pravastatin increased 3.7 fold the plasma levels of TNF- α . Furthermore, pravastatin reduced 36% the number of circulating platelets. Platelet aggregation induced by ADP was significantly reduced by this statin, which was accompanied by a reduction in the intraplatelet cGMP levels. Despite the marked increase in enzymatic activity of SOD and GPx, pravastatin increased 2.4 fold the amount of ROS in platelets of saline-injected rats. Pravastatin reduced the increased number of total leukocytes in LPS-injected to the same values found in rats injected with saline. Increased TNF- α plasma concentration was also reduced by pre-treatment with pravastatin, but it still remained significantly higher than that observed in saline-injected rats. LPS reduced 6.8 fold the number of circulating platelets, which was accompanied by increased numbers of megakaryocytes and reduced thrombopoietin concentration. Pre-treatment with pravastatin restored the values of thrombopoietin and megakaryocytes, but did not prevent the drop in circulating platelets. ADP-induced platelet aggregation was inhibited by LPS and restored by pravastatin. The amount of ROS in platelets of LPS-injected rats was 2.2 fold higher

than that observed in rats injected with saline, which was accompanied by significant increase in SOD and GPx activity. The pretreatment with pravastatin of LPS-injected rats did not change the amount of intraplatelet ROS but markedly reduced SOD and GPx activity. Therefore, our results show that administration of pravastatin in healthy animals, in addition to lead thrombocytopenia and platelet oxidative stress, it promotes an increase in TNF- α levels, which could result in tissue injury in long-term. Pravastatin restores platelet aggregation and improves the inflammatory condition of LPS-injected rats. However, this statin does not prevent sharp drop in the number of circulating platelets, an important marker for evaluating the severity of sepsis, and neither reduces platelet oxidative stress, which could contribute to the dysfunction of different tissues. Thus, pravastatin does not seem to be a good option in the treatment of sepsis.

1- Introdução

1.1 Septicemia e lipopolissacarídeo (LPS)

A sepse bacteriana é uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo. A sepse envolve uma resposta inflamatória sistêmica controlada pelas células hospedeiras que podem resultar em falência múltipla de órgãos e à morte (Ramachandran, 2013), sendo um dos problemas mais frequentes e mais sérios com que os clínicos se deparam (Araújo et al., 2005). Em 2011, segundo dados do DATASUS, ocorreram 80.758 internações para tratamento da sepse no SUS, sendo que 41,58% destes pacientes vieram a óbito (DATASUS, 2011).

Normalmente a sepse é causada por uma infecção bacteriana, mas também pode ser causada por outros microorganismos como vírus e fungos (Bochud and Calantra, 2003). De modo geral, a sepse caracteriza-se por uma diminuição da atividade cardiocirculatória resultante da liberação descontrolada de cininas, prostaglandinas, citocinas e óxido nítrico (NO) e, além disso, ocorre também a redução simultânea do débito cardíaco. Dessa forma, há o colapso do sistema vascular, quadro denominado de 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, juntamente com a reação inflamatória, acaba gerando danos funcionais nos sistemas renal, hepático e pulmonar, que podem culminar na disfunção múltipla de órgãos (Brandtzaeg, 1996).

As bactérias gram-negativas mais comuns presentes na sepse severa e no choque séptico são a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Klebsiella* que desencadeiam a maior parte de seus efeitos através do lipopolissacarídeo (LPS) presente na

parede desses organismos (Bochud and Calantra, 2003). O lipopolissacarídeo, componente estrutural exclusivo da membrana externa das bactérias gram-negativas, é um glicolípídeo complexo constituído de uma porção lipídica denominada lipídeo A, uma região central que possui, em geral, estrutura similar dentro de um gênero ou espécie de bactéria, e cadeias laterais O-específicas que conferem uma identidade sorológica única às espécies de gram-negativas. O lipídeo A parece ser o principal componente responsável pelas manifestações da atividade da endotoxina em pacientes com septicemia por bactérias gram-negativas (Alexander and Rietschel, 2001; Golenbock et al., 1991). Vários estudos mostram que a administração de LPS em animais e humanos leva a vários sinais observados na sepse como trombocitopenia, leucopenia, febre, aumento de concentração de interleucinas circulantes, aumento da produção de NO e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Stohlawtz et al., 1999, Brandtzaeg, 1996, Harker, 1978).

O LPS pode ativar muitos tipos de células, incluindo leucócitos polimorfonucleares, monócitos, macrófagos, células endoteliais e plaquetas, através da ativação de receptores TLR (toll-like receptor) (Andonegui et al., 2005; Sabroe et al., 2002; Amura et al., 1998). O TLR4 é responsável pelo reconhecimento da maioria das bactérias gram-negativas. O complexo CD14/TLR leva a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) através de uma cascata de fosforilações desencadeada por uma família de quinases denominada proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Jean-Batiste, 2007). A ativação do NF- κ B está envolvida na ativação de inúmeros genes inflamatórios que codificam proteínas como citocinas, quimiocinas, proteínas de adesão, proteínas do sistema complemento e enzimas incluindo a cicloxigenase 2 (COX2) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Abraham, 2003; Heuman and Roger, 2002).

Vários trabalhos revelaram que o TNF- α é um dos primeiros mediadores liberados por macrófagos na presença de endotoxina (Flohé et al., 1991; Rietschel & Brade, 1992; Ferreira et al., 1993; Ebisui et al., 1994). Foi verificado que o TNF- α mimetiza várias das respostas atribuídas às endotoxinas, incluindo febre e, em altas doses, choque irreversível e morte. O TNF- α também pode atrair várias células de defesa para os sítios de infecção e destruir células tumorais. Substâncias que inibem a produção de TNF- α , ou que suprimem sua ação, podem prevenir a febre causada pelo LPS em voluntários humanos e a morte de animais (Rietschel & Brade, 1992). É sabido também, que os corticóides são inibidores da produção de TNF- α e protegem contra o choque endotóxico em modelos animais. Tem se tornado evidente porém, que o TNF- α é um efector necessário, mas não suficiente para desencadear a letalidade em animais de experimentação (Flohé et al., 1991).

1.2 Lipopolissacarídeo e Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas nas células por diversos estímulos fisiológicos e ambientais, tais como infecções, radiação UV e poluentes. Entre as EROs mais comuns podemos citar o radical ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$). Há várias fontes que podem gerar as EROs como a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, a ativação das enzimas xantina oxidase e NADPH oxidase, e a partir do metabolismo do ácido araquidônico (DeLeo et al., 1998). Alguns trabalhos sugerem que a NADPH oxidase seja uma das principais fontes geradoras de O_2^- no organismo (Krause, 2007; Somers et al., 2000). A família das NADPH oxidases compreende 7 membros – NOX 1 a 5 e DUOX/THOX 1 e 2 (Brandes and Schröder, 2008). A NOX 2 é o protótipo das NADPH oxidases, sendo originalmente

identificada em fagócitos e, mais tarde sua presença também foi descrita em monócitos, plaquetas, células endoteliais, tecido adiposo e cardiomiócitos (Brandes and Schröder, 2008). A NADPH oxidase 2 é um complexo enzimático formado pela flavocitocromo b_{558} , um heterodímero presente na membrana plasmática composto pelas subunidades $gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$, e 4 subunidades citosólicas, a $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ e uma GTPase de pequeno peso molecular, a RAC1 ou RAC2. A ativação da enzima envolve a fosforilação e a translocação dos componentes citosólicos para a flavocitocromo b_{558} . (Bokoch et al., 2009; Bokoch, 1994).

Sob condições fisiológicas, ocorre um equilíbrio entre a formação de espécies reativas e a remoção destas substâncias por compostos antioxidantes e enzimas (Schafer and Buettner, 2001). Em alguns processos patológicos, como na sepse, há uma quebra neste equilíbrio podendo haver aumento excessivo da geração de espécies reativas e/ou redução dos mecanismos antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase, vitaminas C e E e glutathione reduzida (GSH) (Bhattacharyya, 2004). Este estado é chamado de estresse oxidativo e pode resultar em danos celulares e teciduais dependendo da intensidade e se ocorrer por tempo prolongado (Freedman, 2008). O reparo da lesão ocorrida é feita através do ácido ascórbico, glutathione-redutase (GR) e GPx (Ferreira e Matsubara, 1997)

Há várias evidências indicando a participação de EROs na patogênese da sepse levando a disfunção múltipla de órgãos (Bhattacharyya et al., 2004). Pacientes com sepse apresentam aumento da atividade da enzima xantina oxidase, bem como dos níveis plasmáticos de malondialdeído (marcador do stress oxidativo), quando comparado a indivíduos normais (Huet et al., 2007, Galley et al., 1996). Em 1999, Salvemini e

colaboradores demonstraram que o O_2^- e o peroxinitrito têm um papel importante na injúria intestinal observada durante a endotoxemia.

Uma importante espécie reativa de nitrogênio (ERN) é o óxido nítrico (NO). A síntese do NO se dá a partir da oxidação do nitrogênio do grupo guanidino da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Esta reação é dependente da NADPH e O_2 , além de vários cofatores que incluem a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), a flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH_4) (Andrew and Mayer, 1999). As isoformas de NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS) e a NOS induzível (i-NOS). A c-NOS é dependente de íons cálcio e de calmodulina, produz pequenas quantidades de NO e está envolvida na sinalização celular (Marletta, 1993). A isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal (n-NOS, tipo I), presente normalmente nos neurônios, e a NOS endotelial (e-NOS, tipo III), primeiramente descrita em células endoteliais vasculares (Moncada et al., 1991). Por outro lado, a i-NOS independente dos íons cálcio e não é expressa sob condições normais, mas é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, como macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condrócitos e neutrófilos (Marletta, 1993, Moncada et al., 1991, Chen and Mehta, 1996). O NO é um radical reativo abundante que age como um importante sinalizador molecular oxidativo em uma diversidade de processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa, relaxamento do músculo liso, inibição da atividade plaquetária e regulação imunológica (Vincent, 2010, Napoli and Ignarro, 2009, Moncada and Higgs, 2006, Bredt and Snyder, 1994). Seus efeitos biológicos são iniciados através da ativação da enzima heterodimérica guanilil ciclase solúvel (GCs) e/ou através de outras reações químicas que independem

dessa enzima (Bian and Murad, 2003). A ativação de GCs resulta na produção de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), um segundo mensageiro que inicia várias cascatas bioquímicas de sinalização (Liaudet et al., 2000, McDonald and Murad , 1996).

O NO é responsável por várias características da sepse como hipotensão (Hallemesch et al., 2003) e diminuição da respiração celular (Stuehr and Nathan, 1989). Adicionalmente, o NO se liga ao O_2^- formando outra ERN - o peroxinitrito ($ONOO^-$), potente agente oxidante, que pode levar diretamente a morte celular, bem como estimular a produção de H_2O_2 pela mitocôndria (Radi et al., 1994). Recentemente foi demonstrado que o aumento da formação de $ONOO^-$ está relacionado a danos pulmonares e cardíacos observados na sepse (Celes et. al., 2010; Chen et al., 2010).

1.3 Lipopolissacarídeo (LPS) e plaquetas

As plaquetas são células que tem origem a partir de megacariócitos, células sanguíneas formadas na medula óssea, são anucleadas com 2-3 μ m de diâmetro e estão numa concentração de 150.00 – 350.000 células/ μ l de sangue. Estes elementos permanecem na circulação por volta de dez dias sendo retiradas pelas células reticuloendoteliais do baço e do fígado (Andrews and Bernt, 2004). A formação de plaquetas representa o estágio final de desenvolvimento do megacariócito. Uma vez que a célula poliplóide atinge a maturação, ela forma extensões pró-plaquetárias a partir das quais as plaquetas são liberadas (Italiano e Shivdasani, 2003). A polimerização dos microtúbulos e actina são passos importantes na formação das plaquetas (Tablin et al., 1990; Rojnuckarin e Kaushansky, 2001).

O hormônio Trombopoetina (TPO), produzido nos hepatócitos e sinusóides hepáticos, e em células do túbulo proximal do rim possui a função de maturação dos megacariócitos, levando a formação das plaquetas. Embora a TPO seja a maior reguladora da maturação de megacariócitos, ela não é suficiente para levar ao desenvolvimento dos megacariócitos. Outras substâncias como fator de crescimento e desenvolvimento de megacariócito (MGDF) e IL-3 também são importantes para este processo (Choi et al., 1996; Lourenço, 2004; Panerganti et al., 2013).

A função básica das plaquetas é prevenir a hemorragia causada por lesão nas paredes dos vasos sanguíneos, formando um tampão hemostático no local ferido. (Roskan et al., 1959). Além disso, estes elementos estão envolvidos diretamente em processos patológicos como na trombose arterial, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. (Gawaz et al., 1999).

As plaquetas podem ser estimuladas por diferentes agonistas fisiológicos como o difosfato de adenosina (ADP), trombina, tromboxano A₂ e colágeno. A ativação plaquetária induzida por ADP é mediada por dois receptores acoplados à proteína G; P2Y1 e P2Y12 (Jin e col., 1998; Hollopeter e col., 2001; Zhang e col., 2001). O receptor P2Y1 está acoplado à proteína Gq, ao passo que o receptor P2Y12 está acoplado a proteína Gi (Savi e col., 1998; Hechler e col., 1998; Ohlmann e col., 1995; Jantzen e col., 2001). A ativação de ambos os receptores é necessária para se induzir a secreção plaquetária e agregação irreversível em resposta ao ADP (Jin e Kunapuli, 1998; Jantzen e col., 1999).

A sequência de sinalização desencadeada durante a ativação plaquetária induzida pela trombina e outros agonistas é conhecida como sinalização *inside-out* (Shatill e col., 1998). Esta sinalização promove a mudança de estado de baixa afinidade para o estado de

alta afinidade do receptor $\alpha\text{IIb}\beta 3$ pelo seu ligante, o fibrinogênio. A ligação do fibrinogênio ao seu receptor plaquetário resulta em uma segunda cascata de sinalização denominada *outside-in* (Shatill e col., 1994).

A reatividade plaquetária é fortemente modulada por substâncias bastante conhecidas como a prostaciclina (PGI_2) e o NO que inibem a ativação plaquetária através do aumento de AMPc e GMPc, respectivamente (Geiger, 2001). O NO ativa a GCs aumentando os níveis de GMPc em plaquetas, inibindo a adesão destas ao subendotélio e prevenindo a formação de trombos plaquetários (Danielewski e col., 2005; Priora e col., 2011).

Nos últimos anos vêm aumentando as evidências que sugerem um papel importante das plaquetas em reações inflamatórias, incluindo a sepse. O evento que ocorre mais precocemente na fase inicial da endotoxemia é a diminuição significativa do número de leucócitos e plaquetas no sangue periférico. Um estudo clínico demonstrou que há uma queda de 15% do número de plaquetas circulantes já na primeira hora após a administração endovenosa de LPS em voluntários sadios (Stohlawetz et al., 1999). A injeção de LPS em camundongos causa, ao mesmo tempo, diminuição do número de plaquetas circulantes e acúmulo desses elementos no fígado e pulmão, sendo que neste último encontram-se retidos cerca de 80% das plaquetas perdidas da circulação (Shibazaki et al., 1996). Em humanos, o número de plaquetas acumuladas em órgãos periféricos e o grau de ativação destas plaquetas, determinado através da expressão de proteínas na membrana plaquetária como a CD62P e o receptor de fibrinogênio (integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$), apresentam correlação positiva com gravidade da sepse e, por conseguinte, com o desenvolvimento da disfunção múltipla de órgãos (Russwurm et al., 2002, Gawaz et al., 1997).

Vários efeitos do LPS, apesar de bastante controversos, têm sido observados em plaquetas, no entanto, somente em 2005 foi descrito pela primeira vez a presença do receptor funcional de LPS – “toll-like receptor-4” – nestes elementos (Andonegui et al., 2005). O LPS derivado da bactéria *Proteus mirabilis*, de modo geral, leva à ativação plaquetária. A incubação de LPS com plaquetas de porco por 2 min já é capaz de induzir a liberação do conteúdo dos grânulos densos e alfa, bem como de levar à síntese de TXA₂ (Saluk-Juszczak et al., 2004, Saluk-Juszczak et al., 1999 Wachowicz et al., 1998). O aumento da síntese de TXA₂ também foi observado quando plaquetas humanas foram incubadas com LPS proveniente de *P. mirabilis*; entretanto, este aumento foi detectado somente após 3 h de incubação (Young et al., 1996). Também já foi demonstrado que a incubação de plaquetas humanas com LPS de *P. mirabilis* aumenta significativamente os níveis de nitrato e nitrito, metabólitos estáveis do NO, o qual é acompanhado de aumento discreto, mas significativo, da nitratação de proteínas (Saluk-Juszczak et al., 2007). Zhang e colaboradores mostraram que o LPS de *E. coli* estimula a secreção dos grânulos densos e alfa de plaquetas humanas, bem como potencializa a agregação induzida por trombina e colágeno em baixas concentrações (Zhang et al., 2009).

Em estudos de adesão plaquetária *in vitro*, o LPS de *P. mirabilis* aumenta a adesão espontânea de plaquetas ao colágeno, mas curiosamente, inibe a adesão de plaquetas estimuladas por trombina (Zielinski et al., 2002, Saluk-Juszczak et al., 2001).

Experimentos *in vivo* de microscopia intravital mostraram que o LPS de *E. coli* aumenta a adesão de plaquetas a vênulas de intestino de camundongo (Cerwinka et al., 2002), entretanto este efeito parece ser mediado por neutrófilos através da liberação de ânion superóxido (Cerwinka et al., 2003). Outro grupo de pesquisadores também

demonstrou que o LPS de *E. coli* é capaz de aumentar a adesão plaquetária em vênulas de mesentério de ratos através do efeito direto da endotoxina aumentando a expressão da P-selectina do endotélio e da GP Ib α da membrana plaquetária (Katayama et al., 2002).

Por outro lado, a agregação de plaquetas humanas e de coelho induzida por colágeno é inibida, de forma dependente da concentração, por LPS de *E. coli*, sendo este efeito acompanhado de aumento de GMPc, inibição da mobilização de Ca⁺² intracelular e inibição da ativação da proteína quinase C (Sheu et al., 1998; 1999). E ainda, a agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno, tromboxano e ácido araquidônico está diminuída em pacientes com sepse (Yaguchi et al., 2004).

Recentemente, o nosso grupo demonstrou que a incubação de plaquetas humanas com LPS de *E. coli* inibe a adesão plaquetária ao fibrinogênio envolvendo a inibição do influxo de Ca⁺⁺, mas de forma independente da geração de GMPc ou da redução da ativação do receptor de fibrinogênio GPIIb/IIIa (Morganti et al., 2010). Ainda, demonstramos que o tratamento de ratos com LPS inibe a adesão de plaquetas ativadas com trombina ao fibrinogênio (Casarin et al. 2011). O tratamento de ratos com LPS também inibe a agregação de plaquetas ativadas por ADP (Lopes - Pires et al, 2011). Neste trabalho, mostramos que há um aumento da produção de EROs nas plaquetas, principalmente via ativação de NADPH oxidase, entretanto, este aumento não está envolvido no efeito inibitório do LPS na agregação plaquetária (Lopes – Pires, 2011).

1.4 Estatinas e sepse

As estatinas foram isoladas a partir de uma cultura da colônia *Penicillium citrinium*. A primeira estatina estudada foi a mevastatina, que demonstrou o potencial terapêutico

dessa classe de fármacos (Goodman e Gilman, 2003). Algumas estatinas são produtos naturais, isoladas a partir do metabolismo de fungos, como a mevastatina, a lovastatina, a pravastatina e a sinvastatina (fármaco semi-sintético), outras são sintéticas como a atorvastatina, a cerivastatina e a fluvastatina (Bastarda et al., 2005).

As estatinas podem ser hidrofílicas (pravastatina e rosuvastatina) ou lipofílica (atorvastatina, sinvastatina e fluvastatina), e há evidências de que os diferentes tipos podem ter diferentes ações (Merx et al., 2005). A estatina utilizada no presente estudo foi a pravastatina, cuja estrutura química está apresentada na figura 1.

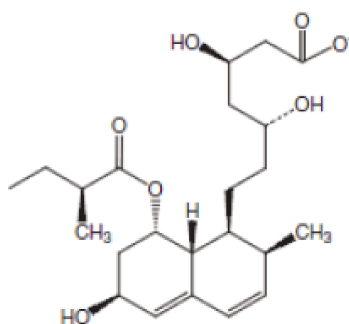
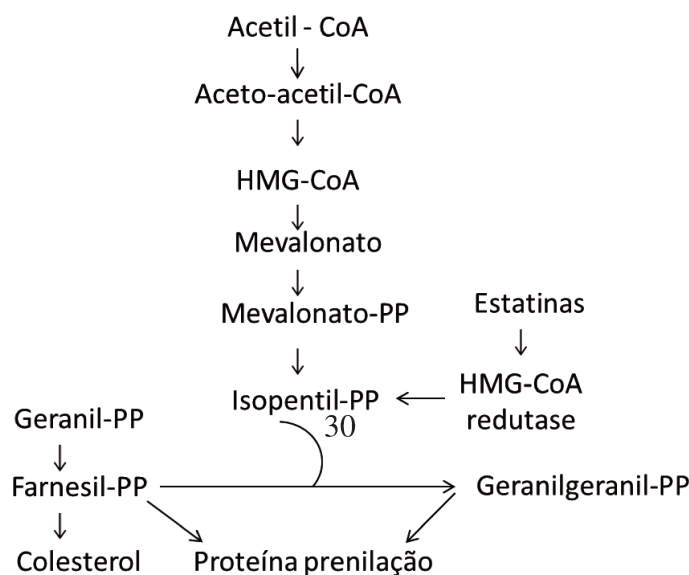


Figura 1. Estrutura química da pravastatina.

As estatinas são fármacos hipolipemiantes, pois são inibidores competitivos de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG – CoA) redutase, enzima responsável por catalisar a etapa inicial e limitante da velocidade na biossíntese do colesterol (Figura 2).



(Singla and Jacobson, 2012)

Figura 2: Mecanismo de ação das estatinas. As estatinas agem inibindo a HMG-CoA redutase, enzima que converte o composto HMG-CoA à mevalonato. O mevalonato é convertido em colesterol e nos intermediários isoprenóides farnesil pirofosfato (PP) e geranylgeranyl pirofosfato, responsáveis por modificações pós-translacionais em proteínas.

Vários estudos relatam benefícios clínicos associados à terapia com as estatinas que são independentes da redução de colesterol, são os chamados efeitos pleiotrópicos. Estes podem ser descritos como anti-inflamatório, antioxidante, imunomodulador, anti-apoptótico, antiproliferativo, antitrombótico, antimicrobiano e protetor do endotélio (Blanco-Colio et al., 2003; Almuti et al., 2006). Em virtude dos seus efeitos pleiotrópicos, alguns autores sugerem que as estatinas podem ser úteis como agentes auxiliares no tratamento da septicemia (Liappis et al., 2001 ; Kruger et al., 2006 ; Hackan et al., 2006)

Estudos experimentais demonstraram que a cerivastatina atenua a produção de citocinas inflamatórias como o TNF-alfa e a interleucina -1 beta em camundongos injetados com LPS (Ando et al., 2000;). Da mesma forma, a lovastatina inibe a produção de TNF-alfa, IL-1 beta, IL-6, bem como a expressão da iNOS e a produção de NO (Pahan et al., 1997)

Em uma das primeiras evidências do benefício do uso de estatinas em pacientes com sepse, Liappis e col (2001) avaliaram, retrospectivamente, 388 internações por bacteremia (*S aureus* e *Gram-*) em hospital de Washington, entre 1995 e 2000. A mortalidade hospitalar foi de 6% no grupo que utilizou a sinvastatina e de 28% no grupo sem estatina. Estudos posteriores confirmaram os resultados obtidos por Liappis e col (2001), mostrando que pacientes que faziam uso de estatinas antes da internação tiveram uma menor prevalência de sepse ou uma menor mortalidade em decorrência deste quadro (Kruger et al., 2006 ; Hackan et al., 2006 ; Thomsen et al., 2006).

Em um hospital de ensino universitário (Princess Alexandra Hospital, em Brisbane, Austrália), um estudo utilizando 438 pacientes internados por bacteremia mostrou que pacientes que usavam estatinas previamente, mesmo sendo mais idosos e com maior número de comorbidades, apresentavam um índice de mortalidade de 10,6 % versus 23,1 % no grupo sem estatinas (Kruger et al., 2006). Resultados semelhantes foram obtidos na Dinamarca por Thomsen e colaboradores (2006), que mostraram que a mortalidade de pacientes com sepse, e que não faziam uso de estatinas, foi cerca de duas vezes maior do que a de pacientes que faziam uso deste fármaco previamente a sua internação.

Já Hackan e colaboradores (2006) analisando os dados de pacientes internados em seis hospitais do Canadá entre os anos de 1997 e 2002. Observaram que a prevalência de sepse no grupo que usava estatina foi de 71,2 eventos/10000 pacientes/ano versus 80 eventos/10000 pacientes/ano no grupo controle.

Portanto, considerando os estudos acima e, que as estatinas apresentam um potencial anti-inflamatório significativo, é de grande relevância estudos sobre os efeitos

destes fármacos em diferentes células na sepse com o objetivo de melhorar o tratamento deste quadro clínico.

2 – Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com pravastatina na reatividade plaquetária, enfatizando o número de plaquetas circulantes, a agregação e o estado redox intraplaquetário de ratos saudáveis e tratados com LPS.

2.2. Objetivos Específicos

Para tanto, os seguintes aspectos foram avaliados em ratos saudáveis e injetados com LPS:

- Número de leucócitos e plaquetas circulantes;
- Determinação da concentração plasmática de Trombopoetina e o número de megacariócitos na medula óssea;
- Agregação plaquetária induzida por ADP;
- Determinação dos níveis intraplaquetários de GMPC;
- Determinação de formação de EROs em plaquetas, bem como a atividade enzimática da SOD, glutathione redutase e glutathione oxidase.

3 Materiais e métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, pesando 250-340g, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – Unicamp, protocolo número 2097-1). Os animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia (Faculdade de Ciências Médicas), onde foram mantidos a 24°C, com iluminação diária de 12 h e com água e alimentação *ad libitum*.

3.2 Grupos experimentais

Os ratos foram divididos em 4 grupos como descrito abaixo e como ilustrado na figura 3 para melhor compreensão:

- Grupo I: Os animais foram tratados por 7 dias com solução fisiológica (300µL, gavagem, 1 vez por dia). No sexto dia os ratos foram injetados com salina (i.p., 300µL) e após 48h o sangue foi coletado.
- Grupo II: Os animais foram tratados por 7 dias com pravastatina (20mg/Kg, gavagem, 1 vez por dia). No sexto dia os ratos foram injetados com salina (i.p., 300µL) e após 48h o sangue foi coletado.

- Grupo III: Os animais foram tratados por 7 dias com solução fisiológica (300µL, gavagem, 1 vez por dia). No sexto dia os ratos foram injetados com LPS (*Escherichia coli* 0111B4 1mg/Kg, i.p.) e após 48h o sangue foi coletado.

- Grupo IV: Os animais foram tratados por 7 dias com pravastatina (20mg/Kg, gavagem, 1 vez por dia). No sexto dia os ratos foram injetados com LPS (*Escherichia coli* 0111B4 1mg/Kg, i.p.) e após 48h o sangue foi coletado.

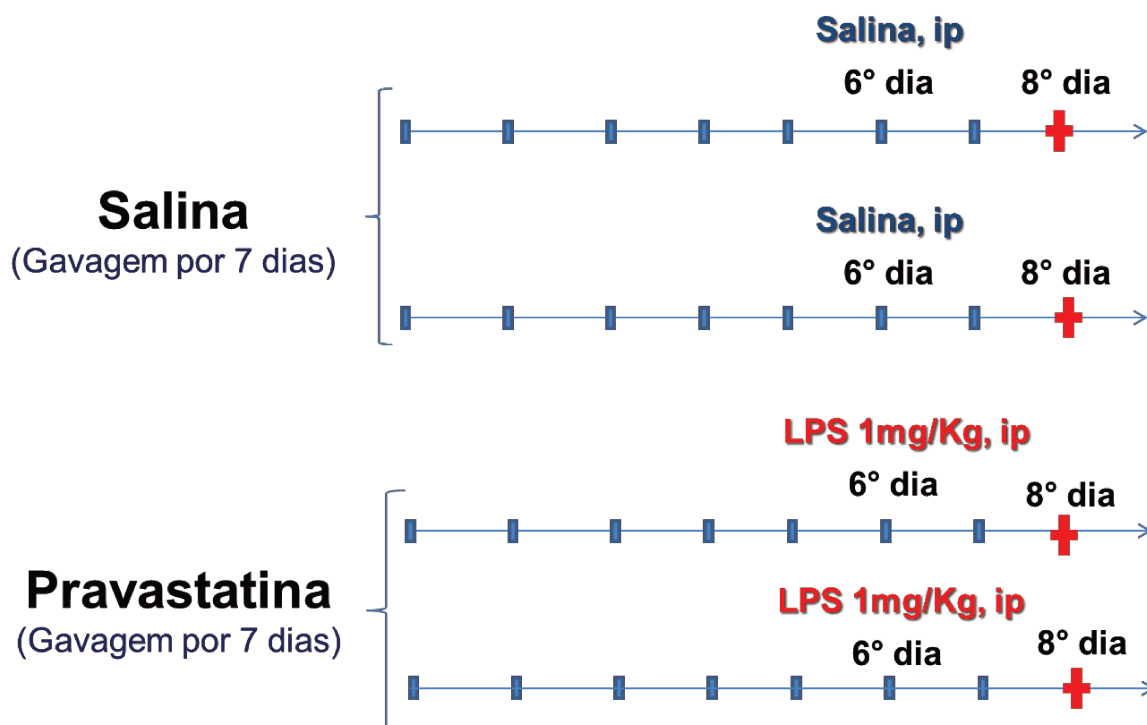


Figura 3: Grupos experimentais

Os animais foram anestesiados com isoflurano e uma incisão longitudinal no abdômen foi feita para a coleta de sangue arterial obtido do ramo descendente da artéria aorta. Os ratos foram eutanasiados com uma overdose de anestésico.

3.3 Obtenção de plaquetas lavadas

O sangue dos ratos controle ou tratados com LPS foi coletado em ACD-C (citrato de sódio 12.4 mM, ácido cítrico 13 mM e glicose 11 mM) (9:1 v/v). Primeiramente o PRP foi obtido por centrifugação do sangue total a 200 g em temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, o tampão de lavagem (NaCl 140 mM, KCl 0.5 mM, citrato trisódico 12 mM, glicose 10 mM e sacarose 12.5 mM, pH 6) na proporção 7:5 (tampão/plasma) foi adicionado ao PRP e centrifugados por 13 min a 800 g. O precipitado plaquetário foi ressuspensão em tampão de lavagem e novamente centrifugado a 800 g por 13 min. Finalmente, as plaquetas foram ressuspensas em solução de Krebs-Ringer desprovida de Ca^{2+} e o número de plaquetas foi ajustado para $1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml através de contagem manual utilizando-se câmara de Neubauer. Ao final, foi adicionado cloreto de cálcio à suspensão plaquetária para uma concentração final de 1mM.

3.4 Contagem total e diferencial de leucócitos

Imediatamente após a coleta do sangue arterial, um volume mínimo de sangue (10 µl) foi destinado à contagem total de células em Câmara de Neubauer (diluídos em 190 µl de solução de Turk) e à confecção da lâmina (esfregaço) para posterior contagem diferencial dos leucócitos (Panótipo Rápido).

3.5 Contagem de plaquetas do sangue total

Imediatamente após a coleta do sangue arterial, 10 µl de sangue foram adicionados a 190 µl de oxalato de amônio 1%. Após 10 min, foi realizada a contagem das plaquetas em Câmara de Newbauer.

3.6 Contagem de Megacariócitos

O fêmur direito e esquerdo de cada animal foi retirado e armazenado em formalina tamponada a 10%, para fixação. Estas peças foram descalcificadas em ácido nítrico a 5% e posteriormente cortadas em micrótomo, de 5 a 10 mm de espessura na área de interesse para facilitar sua inclusão em parafina. Através de critérios morfológicos e da coloração da linhagem megacariocítica com hematoxilina/eosina (HE) as lâminas foram analisadas ao microscópio óptico com amplificação da imagem de 40x. Foram analisados 10 campos/lâmina.

3.7 Determinação de Trombopoetina

A concentração plasmática de trombopoetina foi determinada utilizando o método ELISA kit USCN Life Science Inc (Houston, EUA).

3.8 Determinação de TNF – α

A concentração plasmática de TNF- α foi determinada utilizando o método ELISA kit de BioLegend (San Diego, EUA).

3.9 Agregação plaquetária

A suspensão plaquetária (400µl) 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% (suspensão de plaquetas lavadas) e 100% (solução de Krebs-Ringer). A agregação foi monitorada por 10 min após adição de ADP (1-10µM).

3.10 Determinação de GMPc intraplaquetário

As plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foram incubadas com inibidor de fosfodiesterases - 3 - isobutil-1-metil-xantina (IBMX, 2mM) por 15 min a temperatura ambiente. Em seguida, as plaquetas foram ativadas com ADP (10µM). A reação foi interrompida 30 min após a adição de ADP por etanol absoluto acidificado gelado em uma concentração final de 67% (v/v) e as amostras foram rigorosamente agitadas por 30s.

As amostras foram incubadas no gelo por 30 min e centrifugadas a 4000 g por 30 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e separados e os precipitados foram lavados com 0.5 ml de etanol acidificado 67% (v/v) antes da centrifugação de 14000 g por 5 min a temperatura ambiente. Os sobrenadantes desta última centrifugação foram coletados e adicionados aos sobrenadantes coletados da centrifugação anterior e foram secos a 55-60°C em banho-maria sob uma corrente de nitrogênio. As amostras foram armazenadas a -20°C até que a determinação do GMPc fosse realizada. O GMPc foi medido utilizando-se o kit da Cayman (Ann Arbor, MI, EUA) seguindo as instruções do fabricante e as concentrações foram determinadas por ELISA. Cada amostra foi quantificada em duplicata e os resultados expressos em pmol/ml.

3.11 Determinação de EROS por citometria de fluxo

A determinação dos níveis de EROs em plaquetas foi realizada como descrito por Swith e Weidemann, 1993. Brevemente, à suspensão de plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foi adicionado $5 \mu\text{M}$ de 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA). A suspensão plaquetária ($500 \mu\text{l}$) foi transferida para os tubos de citometria e incubada com ADP ($10 \mu\text{M}$) por 20 min.

Em seguida, a suspensão plaquetária foi centrifugada a 800g em temperatura ambiente por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o pellet plaquetário ressuspense em $500 \mu\text{l}$ de solução de Krebs-Ringer. Uma amostra contendo somente a suspensão plaquetária, na ausência de DCFH-DA, foi utilizada como controle negativo, enquanto que o controle positivo foi realizado adicionando-se H_2O_2 (8mM) à suspensão. A liberação de EROS foi quantificada usando um citômetro de fluxo (FACSCalibur Becton Dickinson, NJ, EUA) equipado com 488nm wavelength argon laser, 525 e 575nm band pass filters. As plaquetas foram identificadas pelos sinais *forward and side scatter*. Dez mil eventos específicos plaquetários foram analisados pelo citômetro.

3.12 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

As plaquetas foram isoladas como descrito anteriormente (item 3.3) e ressuspensas em solução de Krebs-Ringer para uma concentração final de $1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL. As plaquetas foram ativadas com ADP ($10 \mu\text{M}$) por 5 minutos. Em seguida, 2 mL da suspensão de plaquetas ativadas foi centrifugada a 2000 g por 10 minutos à 4°C . O pellet plaquetário foi ressuspense em tampão gelado (HEPES 20 mM, EGTA 1 mM, manitol 210 mM, sacarose 70 mM, pH 7,2) e sonicado por 10 segundos em gelo. A suspensão do lisado plaquetário foi centrifugada a 1500 g por 5 minutos à 4°C e o sobrenadante foi estocado à -80°C até a dosagem. A determinação da atividade da SOD foi feita em

duplicata para cada amostra utilizando-se Kit comercial da Cayman (MI, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante.

3.13 Determinação da atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

As plaquetas foram isoladas como descrito anteriormente (item 3.3) e ressuspensas em solução de Krebs-Ringer para uma concentração final de $1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL. As plaquetas foram ativadas com ADP ($10\mu\text{M}$) por 5 minutos. Em seguida, 2 mL da suspensão de plaquetas ativadas foi centrifugada a 2000 g por 10 minutos à 4°C. O pellet plaquetário foi ressuspenso em tampão gelado (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, DTT 1 mM, pH 7,5) e sonificado por 10 segundos em gelo. A suspensão do lisado plaquetário foi centrifugada a 1000 g por 15 minutos à 4°C e o sobrenadante foi estocado à -80°C até a dosagem. A determinação da atividade da GPx foi feita em duplicata para cada amostra utilizando-se Kit comercial da Cayman (MI, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante.

3.14 Determinação da atividade da Glutathione Redutase (GR)

As plaquetas foram isoladas como descrito anteriormente (item 3.3) e ressuspensas em solução de Krebs-Ringer para uma concentração final de $1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL. As plaquetas foram ativadas com ADP ($10\mu\text{M}$) por 5 minutos. Em seguida, 2 mL da suspensão de plaquetas ativadas foi centrifugada a 2000 g por 10 minutos à 4°C. O pellet plaquetário foi ressuspenso em tampão gelado (KH_2PO_4 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) e sonificado por 10 segundos em gelo. A suspensão do lisado plaquetário foi centrifugada a 10000 g por 15 minutos à 4°C e o sobrenadante foi estocado à -80°C até a dosagem. A determinação da atividade da GR foi feita em duplicata para cada amostra utilizando-se Kit comercial da Cayman (MI, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante.

3.15 Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias $\pm$ erro padrão das médias (EPM) de n experimentos. Diferenças estatísticas significativas foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 Resultados

4.1 Efeito do tratamento da pravastatina no número de leucócitos totais e na porcentagem de neutrófilos e linfócitos em ratos injetados com LPS

A figura 3 mostra que o número total de leucócitos do sangue periférico de ratos tratados com pravastatina (20mg/Kg) está significativamente reduzido em relação ao grupo salina (32% de redução). Por outro lado, o tratamento de ratos com LPS (1mg/kg) causou um aumento significativo do número de leucócitos totais (75% de aumento). A pravastatina reduziu o número de leucócitos de ratos tratados com LPS (36% de redução), para níveis semelhantes aos observados nos ratos injetados com salina.

O tratamento de ratos com pravastatina não alterou a porcentagem de neutrófilos, assim como a de linfócitos, de ratos tratados com salina (figura 4A e 4B). O tratamento de ratos com LPS aumentou significativamente a porcentagem de neutrófilos comparada ao grupo de ratos tratado com salina (13.6% e 29% de neutrófilos para os grupos tratados com salina e com LPS, respectivamente) (figura 4A). Por outro lado, ratos injetados com LPS apresentaram diminuição na porcentagem de linfócitos comparada aos ratos injetados com salina (87% e 73% de linfócitos para ratos injetados com salina ou com LPS, respectivamente). O tratamento com pravastatina diminuiu a porcentagem o número de neutrófilos (50% de redução) e aumentou a de linfócitos (16% de aumento) em ratos injetados com LPS, para valores semelhantes aos observados no grupo controle (figura 4A e 4B).

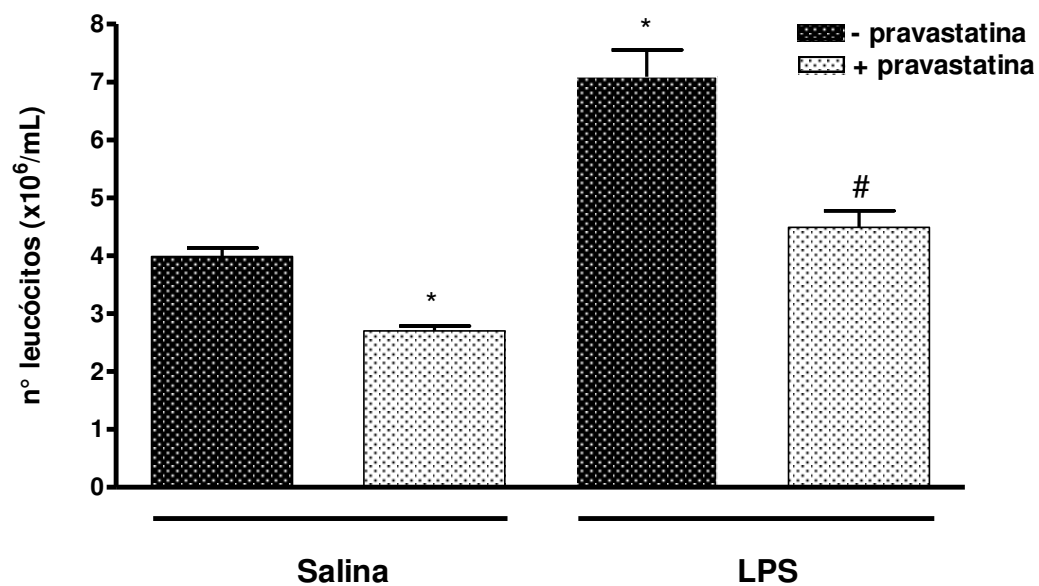


Figura 3: Efeito da pravastatina no número de leucócitos em sangue periférico de ratos tratados com salina ou LPS. Os ratos foram tratados com solução salina ou com pravastatina 20 mg/kg (gavagem, uma vez ao dia por 7 dias). No sexto dia, os ratos de ambos os grupos receberam uma única injeção de salina ou de LPS (1 mg/kg, i.p.) e após 48h o sangue arterial foi coletado. A contagem de leucócitos totais foi realizada no sangue periférico * $P < 0,05$ comparado ao grupo salina sem pravastatina, # $p < 0,05$ comparado ao grupo somente injetado com LPS. $n = 6-8$.

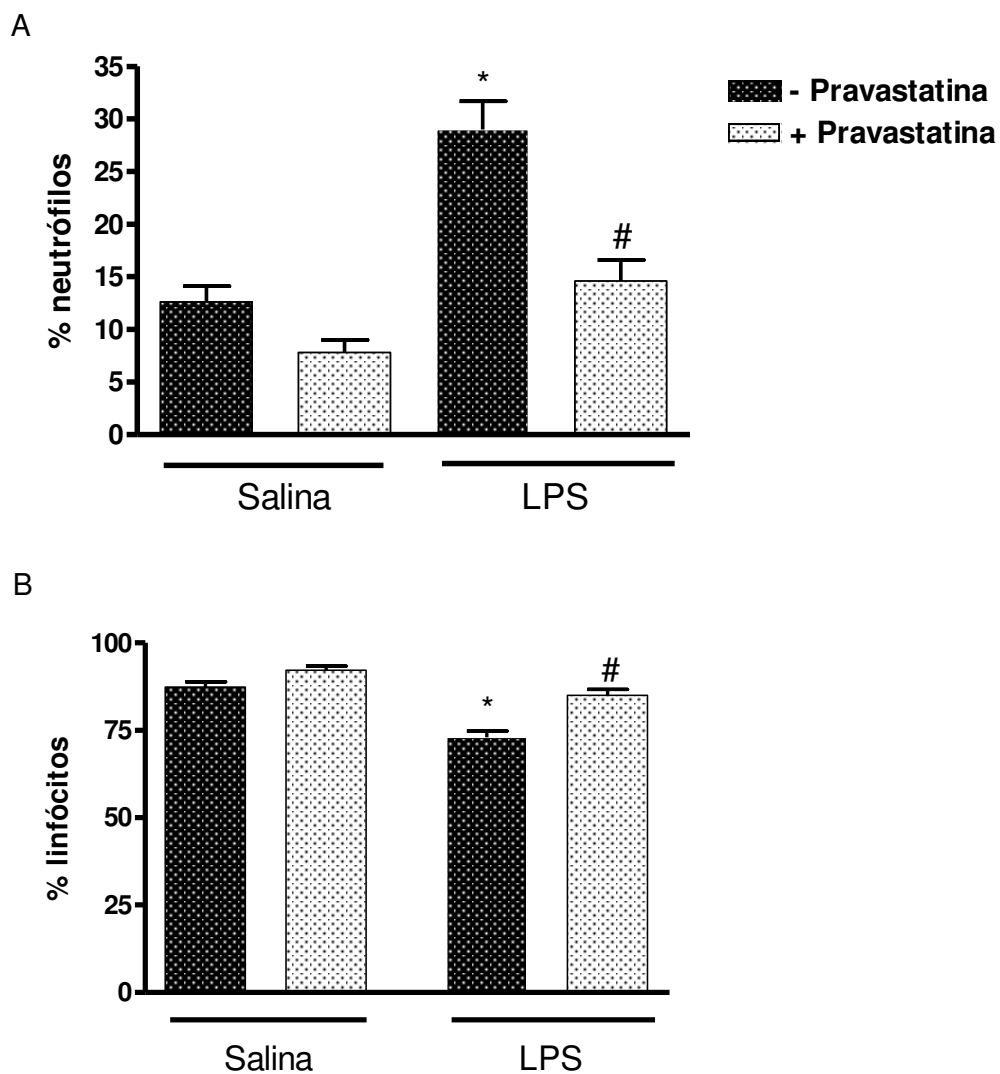


Figura 4 - Efeito da pravastatina na porcentagem de neutrófilos e linfócitos em sangue periférico de ratos tratados com salina ou LPS. Ratos Wistar machos foram tratados com solução salina ou com pravastatina 20 mg/kg (gavagem, uma vez ao dia por 7 dias). No sexto dia, os ratos de ambos os grupos receberam uma única injeção de salina ou de LPS (1 mg/kg, i.p.) e após 48h o sangue arterial foi coletado. O painel A mostra a porcentagem de neutrófilos e o painel B a porcentagem de linfócitos. * $P < 0,05$ comparado ao grupo salina sem pravastatina, # $p < 0,05$ comparado ao grupo somente injetado com LPS. $n = 6-8$.

4.2 Efeito do tratamento da pravastatina no número de plaquetas circulantes, no número de megacariócitos e na concentração plasmática de trombopoetina de ratos injetados com LPS

A figura 3A mostra que o tratamento de ratos com pravastatina (20mg/Kg, gavagem, por 7 dias) reduziu significativamente o número de plaquetas no sangue periférico de ratos injetados com salina (redução de 38%). A injeção de LPS em ratos (1mg/Kg; i.p.) reduziu 6,8 vezes o número de plaquetas circulantes quando comparado aos ratos injetados com salina. Entretanto, o pré-tratamento de ratos com pravastatina aumentou significativamente o número de plaquetas no sangue periférico nos ratos injetados com LPS (aumento de 198%), mas ainda assim o número de plaquetas circulantes foi 2,4 vezes menor do que o observado nos ratos pré-tratados e injetados com salina.

A análise histológica da medula óssea dos fêmures dos ratos mostrou que a pravastatina aumentou em 40% o número de megacariócitos com relação aos ratos somente injetados com salina (figura 3B). O LPS aumentou com magnitude similar ao observado nos ratos tratados com pravastatina e injetados com salina, o número de megacariócitos na medula óssea.

Entretanto, é interessante notar que o pré-tratamento dos animais com pravastatina reduziu o número de megacariócitos no grupo injetado com LPS para os mesmos observados no grupo pré-tratado e injetado com salina (figura 4B). A figura 4 é representativa da análise histológica da medula óssea do fêmur de 1 animal de cada grupo experimental – pré-tratado e injetado com salina (6A), pré tratado com pravastatina e injetado com salina (6B), pré-tratado com salina e injetado com LPS (6C) e pré tratado com pravastatina e injetado com LPS (6D).

A figura 5C mostra que a concentração de trombopoetina de ratos tratados com salina foi reduzida em 40% após o tratamento com pravastatina. O tratamento com LPS diminuiu em 42% os

níveis do hormônio e a pravastatina aumentou de forma significativa a concentração de trombopoetina de ratos injetados com LPS.

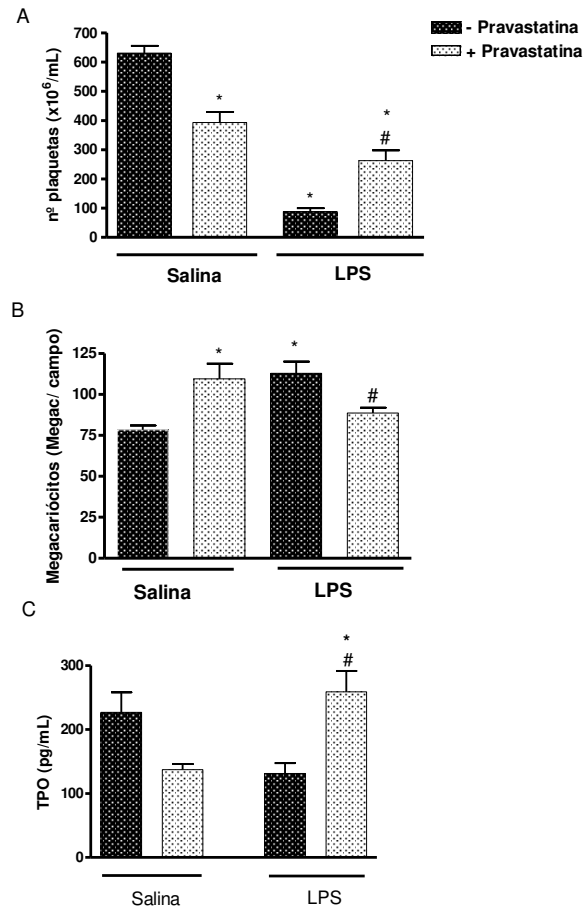


Figura 5 – Efeito da pravastatina nos níveis plasmáticos de trombopoetina e no número de plaquetas e megacariócitos em ratos injetados com salina ou LPS. Os ratos foram tratados com solução salina ou com pravastatina 20 mg/kg (gavagem, uma vez ao dia - 7 dias). No sexto dia, os ratos de ambos os grupos receberam uma única injeção de salina ou de LPS (1 mg/kg, i.p.) e após 48h o sangue arterial foi coletado e os fêmures direito e esquerdo foram extraídos. (A) Contagem de plaquetas no sangue periférico, n= 6-8. (B) Os megacariócitos foram quantificados em 10 campos/lâmina com auxílio de microscopia óptica com aumento de 40 vezes, n= 6-8. (C) Determinação plasmática de trombopoetina realizada por ELISA com o kit USCN Life Science Inc (Houston, EUA),

n=6-8. * P <0,05 comparado ao grupo salina sem pravastatina, # p <0,05 comparado ao respectivo grupo controle injetado com LPS.

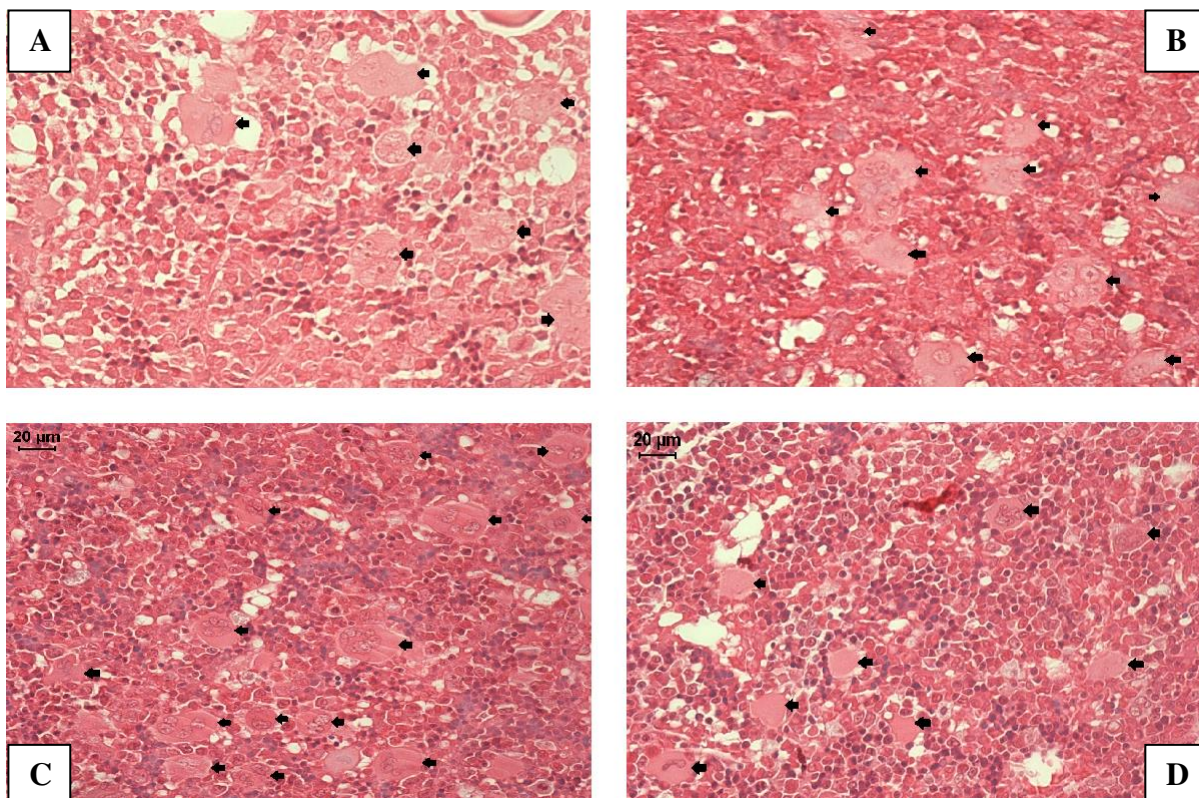


Figura 6 - Efeito da pravastatina no número de megacariócitos na medula óssea de fêmures de animais infectados com salina ou LPS. As lâminas foram confeccionadas como descrito na metodologia (item 3.6) e coradas com hematoxilina/eosina. Foram analisados 10 campos por lâmina. (A) Animais pré-tratados e injetados com salina; (B) Animais pré-tratados com pravastatina e injetado com salina; (C) Animais pré-tratados com salina e injetado com LPS e (D) Animais pré-tratados com pravastatina e injetado com LPS. As imagens foram obtidas de microscópio óptico, com um aumento de 40 vezes. As setas pretas indicam os megacariócitos.

4.3 Efeito da pravastatina sobre os níveis plasmáticos de TNF- α

Os níveis plasmáticos de TNF- α de ratos injetados com salina foram significativamente aumentados pela pravastatina (aumento de 4,3 vezes) em comparação com ratos pré-tratados e injetados com salina). A injeção com LPS aumentou em 64 vezes os níveis de TNF- α , comparado aos

ratos injetados à injeção com salina. Já o tratamento com pravastatina reduziu drasticamente os níveis de TNF- α de plaquetas de ratos injetados com LPS (redução de 14 vezes), mas os mesmos ainda continuaram significativamente maiores do que os observados nos ratos pré-tratados e injetados com salina (figura 7).

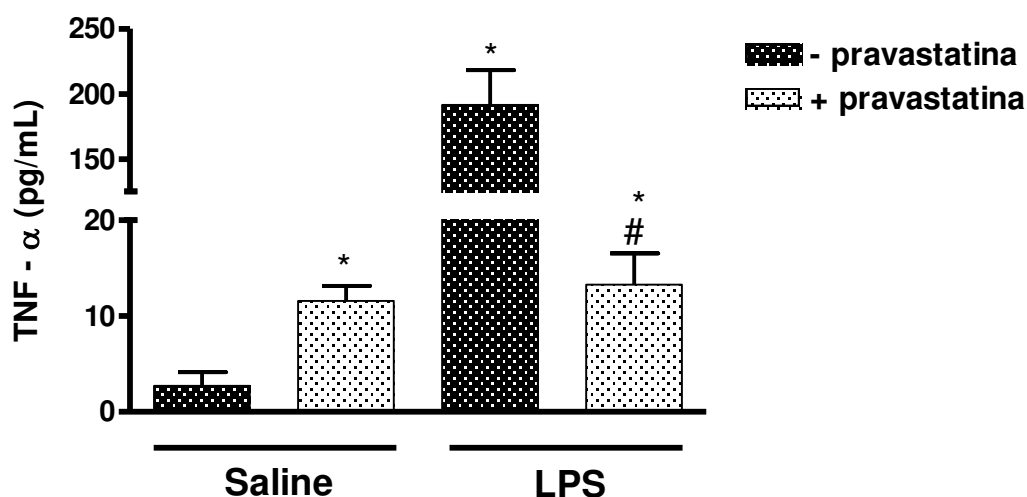


Figura 7 - Efeito da pravastatina nos níveis plasmáticos de TNF- α . Os ratos foram tratados com solução salina ou com pravastatina 20 mg/kg (gavagem, uma vez ao dia - 7 dias). No sexto dia, os ratos de ambos os grupos receberam uma única injeção de salina ou de LPS (1 mg/kg, i.p.) e após 48h o sangue arterial foi coletado. A determinação da concentração de TNF- α foi realizada no plasma dos animais pelo método ELISA * P <0,05 comparado ao grupo salina sem pravastatina, # p <0,05 comparado ao grupo injetado com LPS. n = 4-8.

4.4 Efeito da pravastatina na agregação plaquetária e nos níveis intraplaquetários de GMPc

A adição de ADP à suspensão de plaquetas lavadas levou a uma significativa agregação de forma dependente da concentração do agonista ($10.4\pm3\%$; $36\pm6\%$; $49.7\pm6\%$; $65\pm2\%$ de agregação para ADP 1, 3, 5 e $10\mu\text{M}$ respectivamente).

A pravastatina diminuiu significativamente a agregação plaquetária dos animais injetados com salina (69%, 39%, 36% e 40.9% de redução de agregação induzida por ADP 1, 3, 5 e $10\mu\text{M}$, respectivamente) (figura 8A).

De forma semelhante, a injeção de ratos com LPS diminuiu de forma marcante a agregação plaquetária comparada ao grupo de ratos injetados com salina (83%, 64%, 66% e 63% de redução de agregação induzida por ADP 1, 3, 5 e $10\mu\text{M}$, respectivamente) (figura 8A).

A figura 8B mostra que os níveis de GMPc intraplaquetário de ratos injetados com LPS foi 45% maior do que em plaquetas de ratos injetados com salina. A pravastatina diminuiu em 63% a quantidade de GMPc em plaquetas de ratos tratados com salina. Além disso, a pravastatina também reduziu os níveis de GMPc em plaquetas de ratos injetados com LPS para níveis semelhantes aos observados em ratos pré-tratados e injetados com salina.

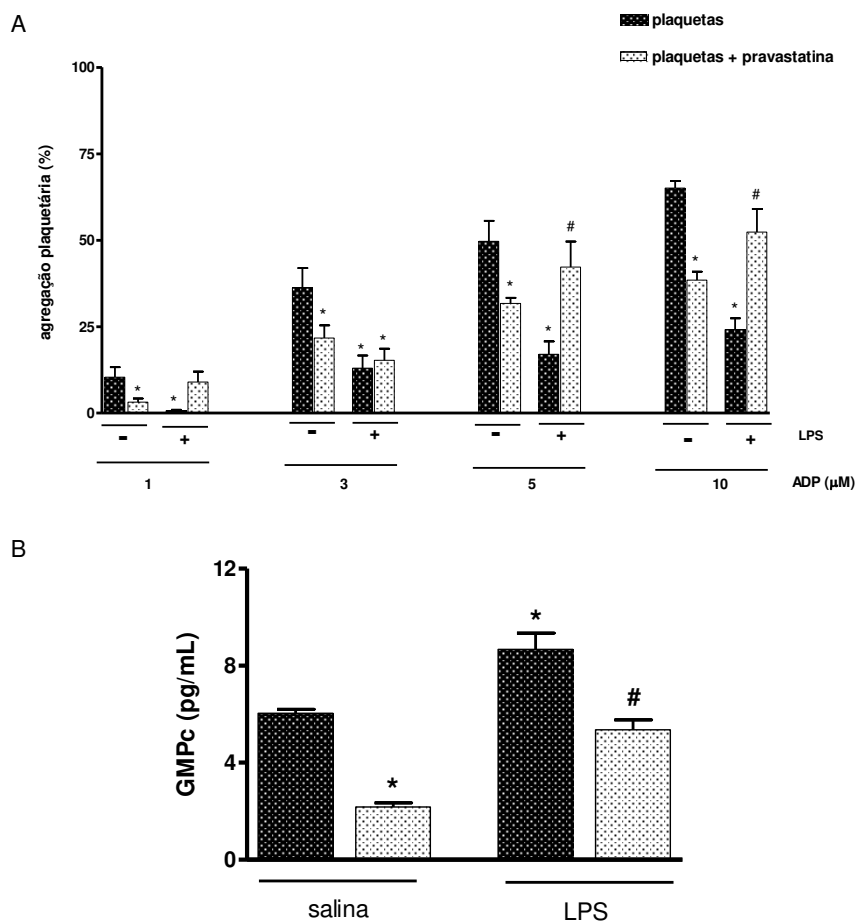


Figura 8 - Efeito da pravastatina na agregação plaquetária e nos níveis de GMPC de plaquetas lavadas. Os ratos foram tratados com solução salina ou com pravastatina 20 mg/kg (gavagem, uma vez ao dia - 7 dias). No sexto dia, os ratos de ambos os grupos receberam uma única injeção de salina ou de LPS (1 mg/kg, i.p.) e após 48h o sangue arterial foi coletado. (A) Agregação plaquetária induzida por ADP (1-10 μM). (B) Os níveis de GMPC foram determinados após as plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) serem ativadas por ADP (10 μM) por 15 min. * P < 0,05 comparado aos respectivos controles de ratos injetados com salina, sem pravastatina, # p < 0,05 comparado à plaquetas de ratos injetados com LPS, sem pravastatina.

4.5 Efeito da pravastatina na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e em sistemas antioxidantes de plaquetas lavadas

A figura 9 mostra que o LPS aumentou em 2.4 vezes a produção de EROs em plaquetas quando comparado aos ratos injetados com salina. A pravastatina também aumentou a formação de EROs em plaquetas de ratos injetados com salina (aumento de 2.2 vezes). O pré-tratamento com pravastatina não modificou a formação de EROs em plaquetas de ratos injetados com LPS.

A atividade enzimática da SOD em plaquetas foi significativamente aumentada tanto pelo pré-tratamento com pravastatina dos ratos injetados com salina (aumento de 36%) quanto pela injeção de LPS (aumento de 71%). No entanto, a pravastatina reduziu significativamente a atividade da SOD em plaquetas de ratos injetados com LPS (a atividade da SOD foi 4,6 vezes menor do que a observada em plaquetas de ratos pré-tratados e injetados com salina) (figura 8A).

Semelhante ao observado com a SOD, o LPS aumentou em 3 vezes a atividade enzimática da GPx em plaquetas ativadas quando comparada ao grupo injetado com salina (figura 8B) .

O pré-tratamento dos ratos com pravastatina também levou a um aumento da atividade da GPx em plaquetas de ratos injetados com salina (aumento de 89%), mas reduziu a atividade enzimática em plaquetas de ratos injetados com LPS para o mesmo nível encontrado em plaquetas de ratos pré-tratados e injetados com salina (figura 8B).

Em plaquetas de ratos injetados com LPS, a atividade da GR foi marcadamente reduzida (4,6 vezes menor do que em plaquetas de ratos injetados com salina) (figura 10C). A pravastatina também reduziu significativamente a atividade da GR em plaquetas de ratos injetados com salina, enquanto que em ratos injetados com LPS esta foi aumentada em 85%. (figura C).

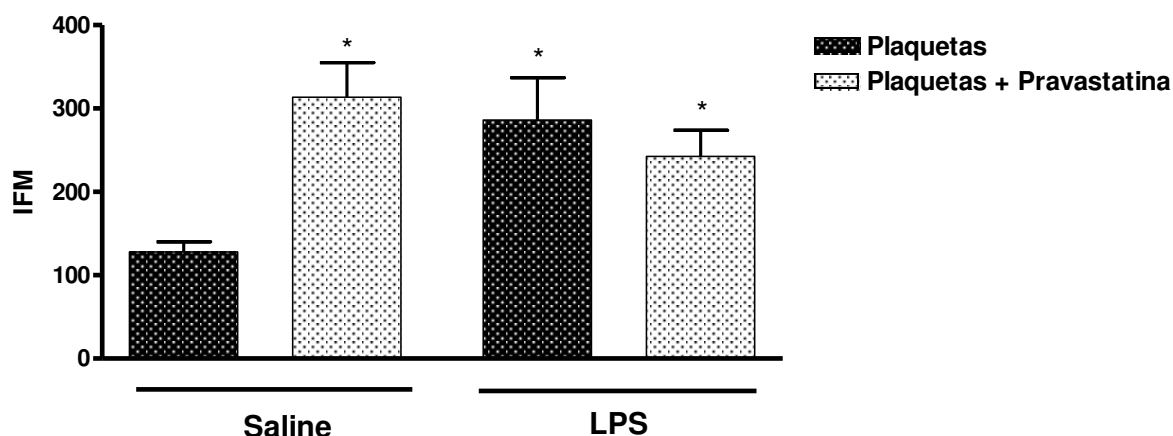


Figura 9 - Efeito da pravastatina na liberação de EROs em plaquetas lavadas. Os ratos foram tratados com solução salina ou com pravastatina 20 mg/kg (gavagem, uma vez ao dia - 7 dias). No sexto dia, os ratos de ambos os grupos receberam uma única injeção de salina ou de LPS (1 mg/kg, i.p.) e após 48h o sangue arterial foi coletado. A geração de EROs foi quantificada por citometria de fluxo utilizando-se o DCFH-DA (5 μ M) em plaquetas lavadas (1,2 x 10⁸ plaquetas/mL) ativadas com ADP (10 μ M). * P <0,05 comparado ao grupo salina sem pravastatina. IFM = índice de fluorescência média. n = 5-6.

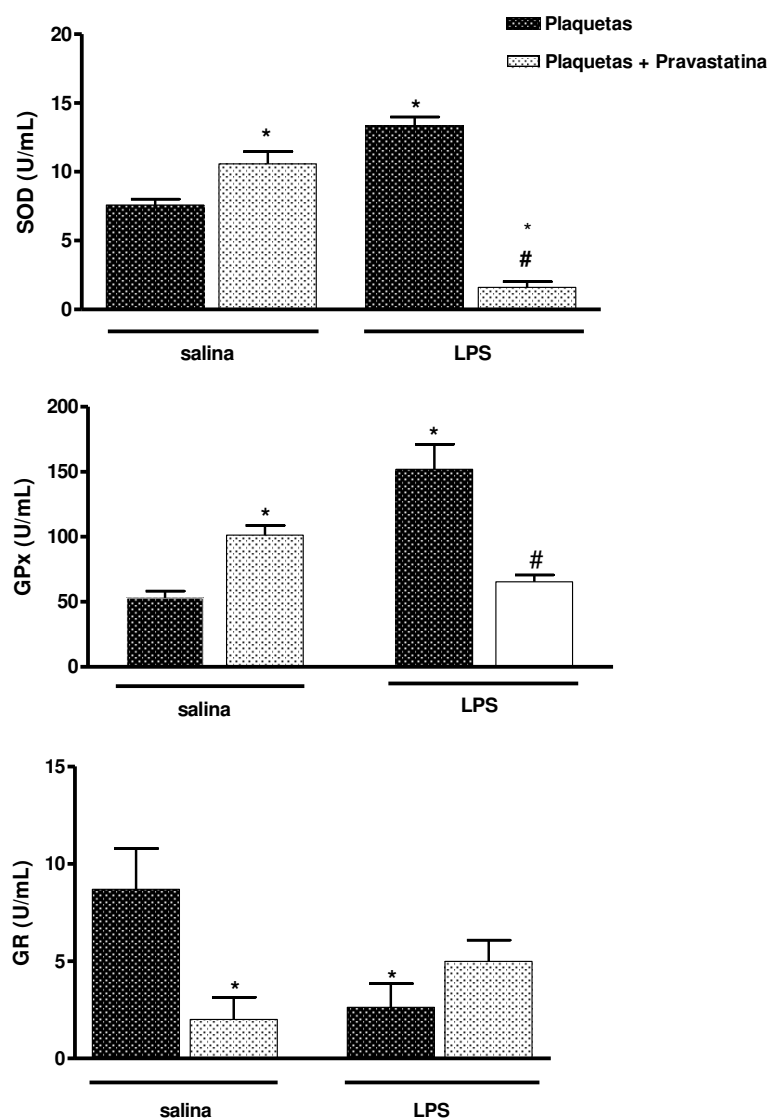


Figura 10 - Efeito da pravastatina na atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR) de plaquetas lavadas. Os ratos foram tratados com solução salina ou com pravastatina 20 mg/kg (gavagem, uma vez ao dia - 7 dias). No sexto dia, os ratos de ambos os grupos receberam uma única injeção de salina ou de LPS (1 mg/kg, i.p.) e após 48h o sangue arterial foi coletado. A atividade enzimática da SOD, GPx e GR foi determinada em plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) ativadas com ADP (10 μ M) utilizando kit enzimático (Cayman) * P <0,05 comparado ao grupo salina sem pravastatina, # p <0,05 comparado ao grupo injetado com LPS. n = 4-9.

5 Discussão

A sepse é uma resposta inflamatória sistêmica a uma infecção que leva à disfunção endotelial e disfunção múltipla dos órgãos. Ainda não há um tratamento efetivo para o controle da sepse, sendo esta, uma das condições que mais contribuem para a mortalidade nas unidades de tratamento intensivo (Marshall et al, 2005).

As estatinas, inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMGCoA), foram introduzidas na prática clínica em 1980, tornando-se os medicamentos mais utilizados na diminuição do colesterol plasmático (Liao et al., 2005). Vários estudos relatam benefícios clínicos associados à terapia com as estatinas de forma independente da redução de colesterol (efeito pleiotrópicos), como ação anti-inflamatória, antioxidante, imunomoduladora, anti-apoptótica, antiproliferativa, antitrombótica, antimicrobiana e protetora do endotélio (Blanco-Colio et al., 2003; Almuti et al., 2006). Sendo assim, esta classe de medicamento poderia contribuir de maneira significativa para o tratamento da sepse.

Vários estudos mostram que a administração de LPS em animais leva à vários sinais observados na sepse como trombocitopenia, leucopenia na fase precoce e leucocitose na fase mais tardia, febre, aumento de concentração de interleucinas circulantes, aumento da produção de NO e EROS (Brandtzaeg, 1996; Stohlawtz, 1999). Além disso, alguns trabalhos mostram que em paciente com sepse, ou em animais administrados com LPS, ocorre uma diminuição da agregação plaquetária (Saba et al, 1984; Sheu et al, 1999; Lopes-Pires et al, 2012).

Vários trabalhos revelaram que o TNF- α é um dos primeiros mediadores liberados por macrófagos na presença de endotoxina (Flohé et al., 1991; Rietschel & Brade, 1992; Ferreira et

al., 1993; Ebisui et al., 1994). No presente trabalho, nós verificamos um aumento significativo de TNF-alfa no plasma de animais injetados com LPS, o qual foi marcadamente reduzido pelo pré-tratamento com a pravastatina. Nossos resultados estão de acordo com outros trabalhos publicados recentemente que mostram que tanto a sinvastatina quanto a atorvastatina reduziram os níveis de TNF-alfa em ratos com sepse, seja induzida por LPS como pela perfuração cecal (Calisto et al., 2010, Slottaet al., 2010). Ainda, nossos resultados mostraram que a pravastatina reduziu o número de leucócitos totais e de neutrófilos em ratos injetados com LPS. Resultados semelhantes foram observados por Tani e colaboradores, que mostraram que a pravastatina reduz significativamente o número dessas células em humanos com doença arterial coronariana (Tani et al., 2009). Portanto, de forma geral, nossos resultados indicam que a pravastatina previne a inflamação nestes animais, o que, provavelmente contribui para um melhor tratamento deste quadro clínico. De fato, Calisto e colaboradores mostraram que a atorvastatina, além de reduzir os níveis de IL-6 e TNF-alfa nos ratos com sepse, aumenta a sobrevida dos mesmos (Calisto et al., 2010).

Como mencionado na “Introdução” o número de plaquetas circulantes, bem como sua reatividade, tem sido utilizados para se avaliar a gravidade da sepse (Russwurm et al, 2002). O LPS reduziu, acentuadamente, o número de plaquetas circulantes e a pravastatina, apesar de ter aumentado significativamente este número, não conseguiu restaurar o mesmo para valores semelhantes aos encontrados nos ratos pré-tratados e injetados com salina. Este resultado, provavelmente, deve-se em parte pela trombocitopenia causada pela própria pravastatina. Nos últimos anos têm-se reportado que estatinas como a sinvastatina, a atorvastatina e a rosuvastatina podem levar à trombocitopenia em pacientes (Ames, 2008, Narayanan and Kilpatrick, 2010, Vrettos et al., 2010, Cvetković et al., 2013).

A despeito dos vários trabalhos realizados, a causa da trombocitopenia observada na sepse ainda não está bem elucidada. Sendo assim, decidimos investigar se em nosso modelo de sepse havia alguma alteração no número de megacariócitos ou na concentração plasmática de trombopoietina, uma vez que os mesmos são importantes para a determinação do número de plaquetas circulantes. Alguns trabalhos mostram que durante a sepse há um aumento dos níveis plasmáticos de trombopoietina. Pacientes com sepse apresentaram níveis elevados de trombopoietina, os quais foram maiores em pacientes mais graves (Zakynthinos et al., 2004). Em neonatos com sepse causada por bactéria gram-negativa também foi observado um aumento nos níveis de trombopoietina (Eissa e El-Farrash, 2013). Além disso, a infusão de LPS em voluntários sadios também levou a um aumento de trombopoietina plasmática (Jilma-Stohlawetz et al., 2001). Os nossos resultados foram opostos aos obtidos nos trabalhos citados, ou seja, o LPS causou uma diminuição de trombopoietina nos animais. Esta discrepância pode ser devido à diferenças na condição experimental: utilização de diferentes espécies animais (homem versus ratos) e/ou pelo diferente intervalo de tempo no qual a concentração do hormônio foi analisada após o tratamento com LPS (no trabalho de Jilma-Stohlawetz e colaboradores a determinação da trombopoietina foi avaliada 1h após a infusão de LPS, enquanto no nosso estudo a determinação foi realizada 48h após uma única injeção de LPS). Nenhum trabalho até o momento mostra resultados sobre o efeito de estatinas na concentração de trombopoietina. A pravastatina, apesar de diminuir a concentração de trombopoietina em ratos injetados com salina, preveniu a redução de trombopoietina em ratos injetados com LPS.

Por outro lado, o LPS causou um aumento na quantidade de megacariócitos na medula óssea. Trabalhos reportando o efeito da sepse ou do LPS sobre o número de megacariócitos são praticamente inexistentes. Recentemente, Thiolliere e colaboradores (2013) analisaram a medula

óssea de 238 pacientes com trombocitopenia, causada principalmente por sepse, e observaram que não havia alteração no número de megacariócitos nestes indivíduos. A pravastatina também aumentou o número de megacariócitos em ratos injetados com salina, mas reduziu nos injetados com LPS para um número semelhante ao do grupo controle.

Portanto, embora a pravastatina restaure a concentração de trombopoietina e o número de megacariócitos nos ratos injetados com LPS, o número de plaquetas circulantes ainda é significativamente menor do que aquele encontrado nos ratos pré-tratados e injetados com salina, indicando que há outros fatores que contribuem para a trombocitopenia observada nestes animais e que a pravastatina não é capaz de recuperar. Uma das hipóteses que explicam a trombocitopenia na sepse ou em animais injetados com LPS é o aprisionamento de plaquetas em órgãos como fígado e pulmão (Stohlawetz et al., 1999), portanto, a pravastatina poderia não conseguir frear este processo. Um fato interessante é que a pravastatina também não é capaz de normalizar a concentração plasmática de TNF- α nos ratos injetados com LPS. Portanto, podemos hipotetizar que o TNF- α poderia estar contribuindo para a trombocitopenia nestes animais levando a apoptose das plaquetas, já que as mesmas possuem receptores TNF- α -R1, responsável pelo efeito apoptótico desta interleucina.

A injeção de ratos com LPS diminuiu de forma marcante a agregação plaquetária, comparada ao grupo de ratos injetados com salina. Trabalhos publicados por nosso grupo mostram que a agregação e a adesão plaquetária de ratos foram significativamente diminuídas após tratamento com LPS (Casarin et al., 2011, Lopes-Pires et al., 2012). Os mecanismos envolvidos no efeito inibitório do LPS na agregação e adesão plaquetária ainda não foram totalmente elucidado. Em experimentos de adesão de plaquetas ao fibrinogênio foi verificado que

o LPS inibe a adesão por mecanismos independentes da geração de GMPc e ativação do receptor de fibrinogênio (Morganti et al, 2010).

No presente trabalho nós mostramos que o efeito inibitório do LPS na agregação plaquetária é acompanhado de aumento nos níveis de GMPc. O aumento de GMPc em plaquetas causa inibição da ativação plaquetária através de diferentes mecanismos, tais como a fosforilação do receptor de IP3 no sistema tubular denso, levando à diminuição da liberação de Ca^{++} , inibição da entrada de Ca^{++} extracelular, redução da ativação do receptor de fibrinogênio e da polimerização da actina (Horstrup et al., 1994, Cavallini et al., 1996). Entretanto, resultados do nosso laboratório ainda não publicados indicam que a inibição da agregação plaquetária 48h após a injeção de LPS é independente de GMPc. Por outro lado, o aumento dos níveis de GMPc implica que houve aumento na produção de NO. O NO pode reagir com o O_2^- levando a produção de peroxinitrito (ONOO^-) que pode levar a inibição da agregação, principalmente através na nitração de proteínas (Marcondes et al., 2006).

A pravastatina também levou a inibição da agregação plaquetária, por mecanismos independentes de GMPc, uma vez que esta estatina reduziu os níveis de GMPc intraplaquetários. Vários trabalhos mostram que as estatinas são capazes de inibir a agregação plaquetária especialmente através da redução da formação de TXA_2 , inibição da mobilização de Ca^{++} e da ativação do receptor de fibrinogênio, a integrina $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$ (Violi et al., 2013, Osamah et al., 1997, Chou et al., 2008, Pignatelli et al., 2012). O pré-tratamento dos animais com pravastatina preveniu o efeito inibitório do LPS na agregação plaquetária por mecanismos ainda não investigados, mas também pode estar relacionado à inibição da formação de ONOO^- , já que a redução de GMPc indica uma redução da formação de NO, como suposto anteriormente. Além

disso, a pravastatina também reduziu a formação de EROs em plaquetas de ratos injetados com LPS.

A sepse é uma condição onde ocorre estresse oxidativo em diversos sistemas (Huet et al., 2008; Huet et al., 2011). O tratamento de ratos com LPS causou um aumento significativo na formação de EROs em plaquetas. Estes resultados estão de acordo com um recente trabalho publicado pelo nosso grupo, mostrando que este aumento de EROs em plaquetas é decorrente, principalmente, da ativação da NADPH oxidase (Lopes-Pires et al., 2012). De fato, há estudos mostrando que o LPS ativa a NADPH oxidase e, portanto, leva a um aumento da formação de O_2^- (Whitworth et al, 1989; Nystrom et al, 1994). Li e Frei (2009) demonstraram que a incubação de células endoteliais de aorta humana com LPS por 24h aumenta a atividade da NADPH oxidase e também a expressão da subunidade p22phox.

Muitos trabalhos têm mostrado que as estatinas diminuem o estresse oxidativo em diferentes tecidos (Kwok et al., 2013). A atorvastatina levou a uma redução de Nox2, Nox4, P47phox, bem como da produção de O_2^- no ventrículo esquerdo de ratos hipertensos (Li et al., 2013). A produção de O_2^- em plaquetas de pacientes hipercolesterolêmicos foi significativamente reduzida pelo tratamento dos pacientes com atorvastatina por 3 e 30 dias (Pignatelli et al., 2007). Entretanto, nossos resultados mostram que a pravastatina causa um aumento da formação de EROs em plaquetas de ratos injetados com salina e também não reverte o aumento da formação destas espécies em ratos tratados com LPS. Há relatos que a interrupção abrupta do tratamento de pacientes com estatinas está associada com um efeito rebote prejudicial ao indivíduo (Pineda e Cubeddu, 2011). A proteção de camundongos submetidos a oclusão da artéria cerebral média foi perdida após a interrupção do tratamento com atorvastatina por 14 dias (Gertz et al., 2003). A descontinuidade do tratamento de camundongos por 14 dias com atorvastatina causou uma redução de 90% da produção de NO (Laufs et al., 2000). Mais

recentemente, Oliveira e colaboradores (2013) mostraram uma redução da formação de NO e um aumento da atividade da NADPH oxidase no córtex cerebral de ratos após 24h de interrupção do tratamento por 7 dias com atorvastatina. No presente trabalho também houve uma interrupção de 24h do tratamento de 7 dias com pravastatina, o que pode justificar nossos resultados, ou seja, aumento de TNF- α , redução de GMPc e aumento da formação de EROs em ratos pré-tratados com a estatina e injetados com salina.

O aumento de EROs no grupo injetado com salina ou pré-tratado com pravastatina e injetado com salina, foi acompanhado de uma aumento significativo da atividade enzimática da SOD e da GPx, indicando que o aumento de EROs nestes grupos foi principalmente decorrente de um aumento na formação dos mesmos. Entretanto, a redução da atividade destes sistemas, provavelmente, está envolvida da falta de eficácia da pravastatina em reduzir a quantidade de EROs no grupo pré-tratado com esta estatina e injetado com LPS. Recentemente, Melo e colaboradores (2013) observaram uma redução da atividade enzimática da SOD em pulmões de camundongos injetados com LPS e pré-tratados por 3 dias com atorvastatina.

Por outro lado, a atividade da GR, enzima responsável por levar a glutathione ao estado reduzido novamente, está diminuída em todos os grupos, indicando uma possível depleção dos níveis de glutathione, favorecendo assim o estresse oxidativo nas plaquetas.

Conclusões:

❖ Efeitos da pravastatina em animais saudáveis:

- reduz o número de plaquetas circulantes, mas não afeta o número de megacariócitos na medula óssea;
- reduz a agregação plaquetária por mecanismos independentes de GMPc;
- aumenta as espécies reativas de oxigênio em plaquetas, o qual é acompanhado pelo aumento da atividade da SOD, indicando que este efeito deve-se, principalmente, por um aumento da produção dessas espécies;
- aumenta a concentração plasmática de TNF- α .

❖ Efeitos da pravastatina em animais injetados com LPS:

- restaura, parcialmente, o número de plaquetas circulante, provavelmente, por aumentar os níveis de trombopoetina circulante;
- restaura a agregação plaquetária e reduz os níveis de GMPc intraplaquetário;
- não reduz os níveis de espécies reativas de oxigênio em plaquetas e causa significativa redução na atividade da SOD;
- reduz, significativamente, a concentração plasmática de TNF- α .

Desta forma, podemos concluir que a pravastatina poderia ser uma boa opção para o tratamento da sepse, já que restaura indicadores importantes, como o número de plaquetas circulantes e agregação plaquetária, utilizados na avaliação da gravidade da sepse. Além

disso, a pravastatina reduz a concentração plasmática de $\text{TNF-}\alpha$, indicando uma melhora do quadro inflamatório do animal.

Referências Bibliográficas

Abbas AK, Lichtman AH. Effector Mechanisms of Immune Responses in Abbas AK, Lichtman AH. 5th edition. Philadelphia: Saunders; 2003.p.241-274.

Abraham, E., Gyetko, M. R., Kuhn, K., Arcaroli, J., Strassheim, D., Park, J. S., Shetty, S.& Idell, S. Urokinase-type plasminogen activator potentiates lipopolysaccharide-induced neutrophil activation. J Immunol., 2003; 170:5644-5651.

Abrams, C. S; Ellison, N., Brdzinski, A. Z., Shanttil S. J. Direct detection of activated platelets and platelets derived microparticules in humans. Blood, 1990; 75:128-138.

Almog Y, et al. Prior statin therapy is associated with a decreased rate of severe sepsis. Circulation. 2004;110(7):880–885.

Almuti K, Rimawi R, Spevack D, Ostfeld RJ. Effects of statins beyond lipid lowering: potential for clinical benefits. Int J Cardiol 2006;109:7–15.

Alexander, C., Rietschel, E.T. Bacterial lipopolysaccharide and immunity. J. Endotoxin Res., 2001; 7:167-202.

Ames PR. Simvastatin-induced thrombocytopaenia: a further case and a brief on its clinical relevance. Ann Hematol. 2008 Sep;87(9):773-4.

Amura, C.R., Kamei, T., Ito, N., Soares, M.J., Morrison, D.C. Differential regulation of lipopolysaccharide (LPS) activation pathways in mouse macrophages by LPS-binding proteins. *J. Immunol.*, 1998; 161:2551-2560.

Ando H, Takamura T, Ota T, Nagai Y, Kobayashi K. Cerivastatin improves survival of mice with lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294: 1043–1046.

Andonegui, G., Kerfoot, S.M., McNagny, K., Ebbert, K.V.J., Patê, K.D., Kubes, P. Platelets Express functionac Toll-Like receptor-4. *Blood*, 2005; 106: 2417-2423.

Andrew, P.J., Mayer, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.*, 1999; 43:521-531.

Andrews, R. K.; Bernt, M. C. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb. Res.*, v. 114 n. 5, p. 447-53, 2004.

Araújo, C.A., Vasconcelos, D.O., Cavalcanti D.C., Silva, F.M.L., Souza, W., Coutinho, M.H. Fator Inibidor de Macrófagos e Septicemia. *Ver. Port. Imunoalergologia*, 2005; 13: 19-23.

AS Biosciences a Quiogen Compag; TNF Signaling. Disponível em: http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=TNF_Signaling. Acesso em 6 de novembro de 2013.

Ashkenazi A, Dixit VM. Receptores de morte: sinalização e modulação *Ciência*. 1998 28 de agosto, 281 (5381) :1305-8. Revisão.

Babouri A, Roblin X, Filippi J, Hébuterne X, Bigard MA, Peyrin-Biroulet L. Tolerability of one hour 10mg/kg infliximab infusions in inflammatory bowel diseases: A prospective multicenter cohort study. *J Crohns Colitis*. 2013 Aug 29. doi:pii: S1873-9946(13)00275-4.

Bastarda, A.; Grahek, R.; Kocijan, A.; Kralj, Z. L. Fast analysis of pravastatin in production media. *Journal of Chromatography B*, v. 822, p. 311-315, 2005.

Basuroy, S., Bhattacharya, S., Leffler, C.W., Parfenova, H: Nox4 NADPH oxidase mediates oxidative stress and apoptosis caused by TNF-alpha in cerebral vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol . Cell Physiol.*, 2009; 296:C422-C432.

Bhattacharyya, J., Biswas, S., Datta, A.G. Mode of action of endotoxin: role of free radicals and antioxidants. *Curr. Med. Chem.*, 2004; 11:359-368.

Bian, K., Murad, F. Nitric oxide (NO): biogenesis, regulation and relevance to human diseases. *Front. Biosci.* 2003; 8:d264-d278.

Blanco-Colio LM, Tunon J, Martin-Ventura JL, Egido J. Antiinflammatory and immunomodulatory effects of statins. *Kidney Int* 2003; 63:12–23.

Blumenauer B, Judd M, Wells G, Burls A, Cranney A, Hochberg M, Tugwell P. Infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis Cochrane Database Syst Rev. 2002;(3):CD003785. Review.

Bochud, P.Y., Calantra, T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. Clin. Ver. 2003; 326:262-266.

Bokoch, G.M., Diebold, B., Kim, J.S., Gianni, D. Emerging evidence for the importance of phosphorylation in the regulation of NADPH oxidases. Antioxid Redox Signal, 2009; 11:2429-2441.

Bokoch, G.M. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins. Curr. Opin. Cell Biol., 1994; 6: 212-218.

Brandes, R.P., Schröder, K. Differential vascular functions of Nox family NADPH oxidases. Curr. Opin. Lipidol., 2008; 19:513-518.

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

Brealey D, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. Lancet. 2002;360(9328):219–223.

Bredt, D.S., Snyder, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Ann. Rev. Biochem.*, 1994; 63:175-195.

Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love–hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*.2004;287(4):C817–C833.

Calixto MC, Lintomen L, André DM, Leiria LO, Ferreira D, et al. (2013) Metformin Attenuates the Exacerbation of the Allergic Eosinophilic Inflammation in High Fat-Diet-Induced Obesity in Mice. *PLoS ONE* 8(10): e76786.

Casarin AL, Lopes-Pires ME, Morganti RP, Antunes E, Marcondes S. Reactive oxygen and nitrogen species modulate the ex-vivo effects of LPS on platelet adhesion to fibrinogen. *Life Sci*. 2011 Nov 21;89(21-22):773-8.

Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre A. Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *J Biol Chem*. 1996; 271(10):5545-51.

Celes, M.R., Torres-Dueñas, D., Prado, C.M., Campos, E.C., Moreira, J.E., Cunha, F.Q., Rossi, M.A. Increased sarcolemmal permeability as an early event in experimental septic cardiomyopathy: a potential role for oxidative damage to lipids and proteins. *Shock*, 2010; 33:322-331.

Cerwinka, W.H., Cooper, D., Krieglstein, C.F., Feelisch, M., Granger, D.N. Nitric oxide modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venule. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2002; 282:H1111-H1117.

Cerwinka, W.H., Cooper, D., Krieglstein, C.F., Ros,s C.R., McCord, J.M., Granger, D.N. Superoxide mediates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 2003; 284:H535-H541.

Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 2002 May 31;296(5573):1634-5. Review.

Chen, L.W., Tseng, H.T., Chen, P.H., Hsu, C.M. Peritonitis-induced peroxynitrite and lung damage depends on c-Jun NH2-terminal kinase signaling of hematopoietic cells. *Crit. Care Med.*, 2010; 38:1168-1178.

Chen, L.Y., Metha, J.L. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J cardiovasc. Pharmacol.*, 1996; 27:154-158.

Cvetković Z , Suvajdžić-Vuković N , Todorović Z , Panić M , Neskovic A . Simvastatin and amlodipine induced thrombocytopenia in the same patient: double trouble and a literature review. *J Clin Pharm Ther.* junho 2013, 38 (3) :246-8.

Danielewski, O., Schultess, J., Smolenski, A. The NO/cGMP pathway inhibits Rap 1 activation in human platelets via cGMP-dependent protein kinase I. *Thromb Haemost.* 2005;93(2):319-25.

Datasus. Departamento de Informação e Informática do SUS [on-line] 2011 <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/miuf.def>. Acesso em 5 de novembro de 2013.

De Biase, L., Pignatelli, P., Lenti, L., Tocci, G., Piccioni, F., Riondino, S., Pulcinelli, F.M., Rubattu, S., Volpe, M., Violi, F. Enhanced TNF alpha and oxidative stress in patients with heart failure: effect of TNF alpha on platelet O₂- production. *Thromb. Haemost.*, 2003; 90:317-325.

DeLeo, F.R., Renee, J., McCormick, S., Nakamura, M., Apicella, M., Weiss, J.P. & Nauseef, W. M. (1998). Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest.*, 1998; 101:455-463.

Desouza, I.A., Franco-Penteado, C.F., Camargo, E.A., Lima, C.S., Teixeira, S.A., Muscará, M.N., 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; 217:107-113.

de Sauvage FJ, Carver-Moore K, Luoh SM, et al. Regulação fisiológica de estágios iniciais e tardios da megacariocitopoiese por thrombopoietin. *J Exp Med.* de 1996; 183 . :651-656

Ebisui S , J Fukata , Murakami N , Kobayashi H , H Segawa , Muro S , Hanaoka I , Naito Y , Y Masui , Ohmoto Y , et ai. Effect of IL-1 receptor antagonist and antiserum to TNF-alpha on LPS-induced plasma ACTH and corticosterone rise in rats. Am J Physiol. 1994 Jun;266(6 Pt 1):E986-92.

European Pharmacopoeia. Supplement 6.0 to the 6^a ed. France: Directorate of Quality of Medicines of the Council of Europe, 2008. p. 2291, 2735, 2881.

Espejo, C., Penkowa, M., Sáez-Torres, I., Xaus, J., Celada, A., Montalban, X., Martínez-Cáceres, E.M. Treatment with anti-interferon-gamma monoclonal antibodies modifies experimental autoimmune encephalomyelitis in interferon-gamma receptor knockout mice. Exp. Neurol., 2001; 172:460-468.

Ferreira A. L. A., Matsubara L. S., 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Ass Med Brasil, 43 (1), 61-68.

Ferreira SH, Lorenzetti BB, Poole S. A bradicinina inicia hiperalgesia inflamatória mediada por citocina. Br J Pharmacol . 1993 novembro, 110 (3) :1227-31.

Freedman, J.E. Oxidative Stress and Platelets. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular Biol., 2008; 28: s11-s16.

Flohé S, Heinrich PC, Schneider J, Wendel A, Flohé L. Time course of IL-6 and TNF alpha release during endotoxin-induced endotoxin tolerance in rats. *Biochem Pharmacol.* 1991 Jun 1;41(11):1607-14.

Galley, H.F., Davies, M.J., Webster, N.R. Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome. *Crit. Care Med.*, 1996; 24:1649-1653.

García-Ruiz, I., Fernández-Moreira, D., Solís-Muñoz, P., Rodríguez-Juan, C., Díaz-Sanjuán, T., Muñoz-Yagüe, T., Solís-Herruzo, J.A. Mitochondrial complex I subunits are decreased in murine nonalcoholic fatty liver disease: implication of peroxynitrite. *J. Proteome Res.*, 2010; 9:2450-2459.

Gawaz, M., Dickfeld, T., Bogner, C., Fateh-Moghadam, S., Neumann, F.J. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med.*, 1997; 23:379-385.

Gawaz, M; Neuman, F.J; Schömiga; A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease. Consequences for diagnosis and therapy. *Circulation*, 1999; 99:1-11

Geiger, J. Inhibitors of platelet signal transduction as anti-aggregatory drugs. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, 2001; 10:865-890.

Goodman, L. S.; Gilman, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 10a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. p. 739-744.

Golenbock, D.T., Hampton, R.Y., Qureshi, N., Takayama, K., Raetz, C.R. Lipid A-Like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266:1949-1998.

Grundy SM. Statin trials and goals of cholesterol-lowering therapy. *Circulation*. 1998 Apr 21;97(15):1436-9.

Hackam DG, Mamdani M, Li P et al - Statins and sepsis in patients with cardiovascular disease: a population-based cohort analysis. *Lancet*, 2006;367:413-418.

Haden DW, et al. Mitochondrial biogenesis restores oxidative metabolism during *Staphylococcus aureus* sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(8):768–777.

Hallemeesch, M.M., Janssen, B.J., de Jonge, W.J., Soeters, P.B., Lamers, W.H., Deutz, N.E. NO production by cNOS and iNOS reflects blood pressure changes in LPS-challenged mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2003; 285:E871-E875.

Harker, L.A. Platelet Survival Time: Its Measurement and Use. *Prog. Hemost. Thromb.*, 1978; 4:321-327.

Hechler B, Léon C, Vial C, Vigne P, Frelin C, Cazenave JP, Gachet C. The P2Y₁ receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood*. 1998; 92(1):152.

Heuman, D., Roger, T. Initial response to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta*, 2002; 232: 59-72.

Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*. 2001;409(6817):202-7.

Horstrup,K; Jablonka,B; Honig-Liedl, P; Just, M; Kochsiek,K; Walter, H. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur. J. Biochem.*1994; 225. 21 -27.

Hothersall E, McSharry C, Thomson NC. Potential therapeutic role for statins in respiratory disease. *Thorax*. 2006;61(8):729–734.

Huet, O., Obata R., Aubron, C., Spraul-Davit, A., Charpentier, J., Laplace, C., Nguyen-Khoa, T., Conti, M., Vicaute, E., Mira, J.P., Duranteau, J. Plasma-induced endothelial oxidative stress is related to the severity of septic shock. *Crit Care Med.*, 2007; 35:821-826.

Imgenex. Imgenex Corp. [on-line] [Acesso em 2 jun 2009]. Disponível em: <http://www.imgenex.com/Toll-likeReceptors.php>.

Iwanami, K., Matsumoto, I., Tanaka-Watanabe, Y., Inoue, A., Mihara, M., Ohsugi, Y., Mamura, M., Goto, D., Ito, S., Tsutsumi, A., Kishimoto, T., Sumida, T. Crucial role of the

interleukin-6/interleukin-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate isomerase. *Arthritis Rheum.*, 2008; 58:754-763.

Ihnatko R, Kubes M. TNF sinalização: eventos iniciais e fosforilação. *Gen Physiol Biophys* . Setembro 2007, 26 (3) :159-67.

Italiano, J. E. e Shivdasani, R.A. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v.1, p. 1174–1182, 2003.

Jantzen HM, Milstone DS, Gousset L, Conley PB, Mortensen RM. Impaired activation of murine platelets lacking G alpha(i2). *J Clin Invest.* 2001; 108:477-83.

Jean-Batiste, E. Cellular Mechanisms in Sepsis. *Journal Intensive. Care Medicine*, 2007; 22:63-72.

Jiang H, Bielekova B, Okazaki H, Clarence-Smith K, Johnson KP, Bergey G, Martin R, Dhib-Jalbut S. O efeito de vesnarinone em TNF alfa produção em células mononucleares do sangue periférico humano e microglia: um estudo pré-clínico para o tratamento de esclerose múltipla. *J Neuroimmunol* . 1 junho 1999, 97 (1-2) :134-45.

Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem.* 1998; 273:2030-4.

Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Huang J, Caldwell RW. Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 234–241.

Katayama, T., Ikeda, Y., Handa, M., Tamatani, T., Sakamoto, S., Ito, M., Ishimura, Y., Suematsu, M. Immunoneutralization of glycoprotein Ib α attenuates endotoxin-induced interactions of platelets and leukocytes with rat venular endothelium in vivo. *Circ. Res.*, 2000; 86:1031-1037.

Kaur, J., Dhaunsi, G.S., Turner, R.B. Interleukin-1 and nitric oxide increase NADPH oxidase activity in human coronary artery smooth muscle cells. *Med. Princ. Pract.*, 2004; 13:26-29.

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

Kilpatrick L. E., Song Y. H., Rossi M. W., Korchak H. M. (2000): Serine phosphorylation of p60 tumor necrosis factor receptor by PKC- δ in TNF- α -activated neutrophils. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 279, C2011–2018.

Kilpatrick L. E., Sun S., Korchak H. M. (2004): Selective regulation by δ -PKC and PI 3-kinase in the assembly of the antiapoptotic TNFR-1 signaling complex in neutrophils. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 287, C633–642.

Krause, K.H. Aging : a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidase. *Exp. Gerontol.*, 2007 ; 42:256-262.

Kruger P, Fitzsimmons K, Cook D et al- Statin therapy is associated with fewer deaths in patients with bacteraemia. *Intensive Care Med*, 2006;32:75-79.

Kuwano, Y., Kawahara, T., Yamamoto, H., Teshima-Kondo, S., Tominaga, K., Masuda, K., Kishi, K., Morita, K., Rokutan, K. Interferon-gamma activates transcription of NADPH oxidase 1 gene and upregulates production of superoxide anion by human large intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2006; 290:C433-C443.

Kuwano, Y., Tominaga, K., Kawahara, T., Sasaki, H., Takeo, K., Nishida, K., Masuda, K., Kawai, T., Teshima-Kondo, S., Rokutan, K. Tumor necrosis factor alpha activates transcription of the NADPH oxidase organizer 1 (NOXO1) gene and upregulates superoxide production in colon epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2008; 45:1642-1652.

Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998; 97: 1129–1135.

Li R, Fang W, Cao S, Li Y, Wang J, Xi S, Zhang B, He Y. Differential expression of NADPH oxidase isoforms and the effects of atorvastatin on cardiac remodeling in two-kidney two-clip hypertensive rats. *Pharmazie*, 2013 Apr;68(4):261-9.

Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:89-118. *Rev Pharmacol Toxicol* 2005 ; 45 : 89 - 118 .

Liaudet, L., Soriano, F.G., Szabó, C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit. Care Med.*, 2000; 28(4 Suppl.):N37-N52.

Lintomen, L., Souza-Filho, L.G., Ferreira, T., Camargo, E.A., Teixeira, S.A., Muscará, M.N., Landgraf, R.G., Jancar, S., Mendes, G.D., De Nucci, G., Antunes, E. Different mechanisms underlie the effects of acute and long-term inhibition of nitric oxide synthases in antigen-induced pulmonary eosinophil recruitment in BALB/C mice. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2009; 22:1-8.

Lopez, J.A., Newburger, P.E., Condino-Neto, A. The effect of IFN-gamma and TNF-alpha on the eosinophilic differentiation and NADPH oxidase activation of human HL-60 clone 15 cells. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2003; 23:737-744.

Lopes-Pires, M.E., Casarin, A.L., Pereira-Cunha, F.G., Lorand-Metze, I., Antunes, E., Marcondes, S. Treatment of rats with lipopolysaccharide (LPS) reduces platelet aggregation by

mechanisms independent of reactive oxygen species generation in platelets. *Platelets*. 2012;23(3):195-201.

Lourenço D. M. Trombose e dinâmica das plaquetas. Zago M. A., Falcão R. P., Pasquini R. *Hematologia: fundamentos e práticas*. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap. 7, p 69-73.

Marcondes S, Cardoso MH, Morganti RP, Thomazzi SM, Lilla S, Murad F, De Nucci G, Antunes E. Cyclic GMP-independent mechanisms contribute to the inhibition of platelet adhesion by nitric oxide donor: a role for alpha-actinin nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 28;103(9):3434-9.

Marletta, M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268:12231-12234.

Martin, P.L., Cornacoff, J.B., Treacy, G., Eirikas, E., Marini, J., White, K.L. Jr., Peachee, V., Hoberman, A. Effects of administration of a monoclonal antibody against mouse tumor necrosis factor alpha during pregnancy and lactation on the pre- and postnatal development of the mouse immune system. *Int. J. Toxicol.*, 2008; 27:341-347.

Martindale the complete drug reference. 32a ed. London: Pharmaceutical Press, 1999. 2314p.

Mattson, D.L. Long-term measurement of arterial blood pressure in conscious mice. *Am J. Physiol.* 1998; 274:R564-R570.

McDonald, L.J., Murad, F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1996; 211:1-6.

Melo AC, Valença SS, Gitirana LB, Santos JC, Ribeiro ML, Machado MN, Magalhães CB, Zin WA, Porto LC. Redox markers and inflammation are differentially affected by atorvastatin, pravastatin or simvastatin administered before endotoxin-induced acute lung injury. *Int Immunopharmacol.* 2013 Sep;17(1):57-64.

Merx MW, et al. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin profoundly improves survival in a murine model of sepsis. *Circulation.* 2004;109(21):2560–2565.

Merx MW, Liehn EA, Graf J, van de Sandt A, Schaltenbrand M, Schrader J, Hanrath P, Weber C. Statin treatment after onset of sepsis in a murine model improves survival. *Circulation* 2005; 112: 117–24.

Morganti RP, Cardoso MH, Pereira FG, Lorand-Metze I, De Nucci G, Marcondes S, Antunes E. Mechanisms underlying the inhibitory effects of lipopolysaccharide on human platelet adhesion. *Platelets.* 2010;21(4):260-9.

Moffat, A. C.; Osselton, M. D.; Widdap, B. Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3a ed. London: Pharmaceutical Press, 2004, v. 2, p. 654,1059, 1191,1469,1561.

Moncada, S, Higgs, E.A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. Br. J. Pharmacol, 2006; 147(Suppl 1):S193-S201.

Moncada, S., Palmer, R.M. & Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol. Reviews, 1991; 43:109-142.

Morganti, R.P., Cardoso, M.H., Pereira, F.G., Lorand-Metze, I., De Nucci, G., Marcondes, S., Antunes, E. Mechanisms underlying the inhibitory effects of lipopolysaccharide on human platelet adhesion. Platelets, 2010; 21:260-269.

Narayanan D, Kilpatrick ES. Atorvastatin-related thrombocytopenic purpura. BMJ Case Rep. 2010 May 19;2010.

Napoli, C., Ignarro, L.J. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. Arch. Pharm. Res., 2009; 32:1103-1108.

Odell TT, Jr, McDonald TP, Detwiler TC. Estimulação da produção de plaquetas por soro de ratos com depleção de plaquetas. Proc Soc Exp Biol Med. , 1961; 108 :428-431

Ohlmann P, Laugwitz KL, Nürnberg B, Spicher K, Schultz G, Cazenave JP, Gachet C. The human platelet ADP receptor activates Gi2 proteins. Biochem J. 1995; 312:775-9.

Owayed, A., Dhaunsi, G.S., Al-Mukhaizeem, F. Nitric oxide-mediated activation of NADPH oxidase by salbutamol during acute asthma in children. *Cell Biochem. Funct.*,2008; 26:603-608.

Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest* 1997; 100: 2671–2679.

Park SH, Park BG, Park CJ, Kim S, Kim DH, Jang S, Hong SK, Chi HS. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013 Sep 3.

Priora, R., Margaritis, A., Frosali, S., Coppo, L., Summa, D., Di Giuseppe, D., et al. In vitro inhibition of human and rat platelets by NO donors, nitrosoglutathione, sodium nitroprusside and SIN-1, through activation of cGMP-independent pathways. *Pharmacol Res.* 2011;64(3):289-97.

Pignatelli P, Sanguigni V, Lenti L, Loffredo L, Carnevale R, Sorge R, Violi F. Kwok JM, Ma CC, Ma S. Recent development in the effects of statins on cardiovascular disease through Rac1 and NADPH oxidase. *Vascul Pharmacol.* 2013 Jan;58(1-2):21-30.

Puccetti L, Pasqui AL, Pastorelli M, Bova G, Cercignani M, Palazzuoli A, Angori P et al.: Time-dependent effect of statins on platelet function in hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest*, 2002, 32, 901–908.

Radi, R. , Rodriguez, M., Castro, L., Telleri, R. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. Arch Biochem Biophys., 1994; 308:89-95.

Ramachandran G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: A brief review. Virulence. 2013 Nov 5;5(1).

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

Ruud TE, Gundersen Y, Krohn CD, Sveen O, Aasen AO. Effects of infliximab and hydrocortisone on in vitro cytokine responses after stimulation with lipopolysaccharide. Surg Infect (Larchmt) . 2013 Feb; 14 (1) :30-4.

Sabroe, I., Jones, E.C., Usher, L.R., Whyte, M.K., Dower, S.K. Toll-Like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral Blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. J. Immunol., 2002; 168:4701-4710.

Saluk-Juszczak, J., Olas, B., Nowak, P., Kolodziejczyk, J., Wachowicz, B., Zgierski, A. The effect of lipopolysaccharide from *Proteus mirabilis* on the level of the stable end metabolic products of nitric oxide in blood platelets. Current Microbiology, 2007; 54: 27-30.

Saluk-Juszczak, J., Wachowicz, B., Kaca, W. Endotoxins stimulate generation of superoxide radicals and lipid peroxidation in blood platelets. *Microbios.*, 2000; 103:17-25.

Saluk-Juszczak, J., Wachowicz, B., Kaca, W. Stimulatory effects of endotoxin on the platelet secretory process. *Microbios.*, 1999; 99:45-53.

Saluk-Juszczak, J., Wachowicz, B., Zielinski, T., Kaca, W. Adhesion of thrombin-stimulated and unstimulated blood platelets to collagen in the presence of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharides. *Platelets*, 2001; 12:470-475.

Salvemini, D., Riley, D.P., Lennon, P.J., Wang, Z.Q., Currie, M.G., Macarthur, H., Misko, T.P. Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage. *Br. J Pharmacol.* 1999; 127:685-692.

Savi P, Beauverger P, Labouret C, Delfaud M, Salel V, Kaghad M, Herbert JM. Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation. *FEBS Lett.* 1998; 422:291-5.

Schafer, F.Q., Buettner, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001; 30:1191-1212.

Shattil SJ, Brass LF. Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J Biol Chem.* 1987; 262:992-1000.

Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge JS. Adhesive signaling in platelets. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6(5):695-704.

Sheu, J.R., Hung, W.C., Kan, Y.C., Lee, Y.M., Yen, M.H. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of *Escherichia coli* lipopolysaccharide in human platelets. *Br. J. Haematol.* 1998; 103:29-38.

Sheu, J.R., Hung, W.C., Su, C.H., Lin, C.H., Lee, L.W., Lee, Y.M., Yen, M.H. The antiplatelet activity of *Escherichia coli* lipopolysaccharide is mediated through a nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Eur. J. Haematol.*, 1999; 62:317-326.

Shigemasa Tani, Ken Nagao, Takeo Anazawa, Hirofumi Kawamata, Shingo Furuya, Hiroshi Takahashi, Kiyoshi Iida, Michiaki Matsumoto, Takehiko Was! hio, Narimichi Kumabe, Atsushi Hirayama. Association of Leukocyte Subtype Counts With Coronary Atherosclerotic Regression Following Pravastatin Treatment. *The American Journal of Cardiology*, Volume 104, Issue 4, 15 August 2009, Pages 464-469.

Shibazaki, M., Nakamura, M., Endo, Y. Biphasic, organ-specific, and strain-specific accumulation of platelets induced in mice by a lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and its possible involvement in shock. *Infect. Immun.*, 1996; 64:5290-5294.

Silva, E., Pedro, M.A., Sogaya, A.C., Mohovic, T., Silva, C.L., Janiszewski, M., Cal, R.G., de Sousa, E.F., Abe, T.P., de Andrade, J., de Matos, J.D., Rezende, E., Assunção, M., Avezum, A., Rocha, P.C., de Matos, G.F., Bento, A.M., Corrêa, A.D., Viera, P.C., Knobel, E.

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 Apr;81(4):613-7.

Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES Study). *Crit. Care*, 2004; 8:R251-R260.

Somers, M.J., Burchfield, J.S., Harison, D.G. Evidence for a NADH/NADPH oxidase in human umbilical vein endothelial cells using electron spin resonance. *Antioxid Redox Signal.*, 2000; 2: 779-787.

Stohlawetz, P., Folman, C.C., von dem Borne, A.E., Pernerstorfer, T., Eichler, H.G., Panzer, S., Jilma, B. Effects of endotoxemia on thrombopoiesis in men. *Thromb. Haemost.*, 1999; 81:613-617.

Stuehr, D.J., Nathan, C.F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.*, 1989; 169:1543-1555.

Surch, Y.. *Oxidative Stress, Inflammation, and Health*. Packer L (ed.). Londres: Taylor & Francis, 2005.

Thiolliere F, Serre-Sapin AF, Reignier J, Bénédict M, Constantin JM, Lebert C, Guélon D, Timsit JF, Souweine B. Epidemiology and outcome of thrombocytopenic patients in the intensive care unit: results of a prospective multicenter study. *Intensive Care Med.* 2013 Aug;39(8):1460-8.

Thomsen RW, Hundborg HH, Johnsen SP et al - Statin use and mortality within 180 days after bacteremia: a population-based cohort study. *Crit Care Med*, 2006;34:1080-1086.

Vincent, S.R. Nitric oxide neurons and neurotransmission. *Prog. Neurobiol.*, 2010; 90:246-255.

Vrettos I, Papageorgiou S, Economopoulou C, Pappa V, Tsirigotis P, Tountas N, Economopoulos T, Dervenoulas J. Rosuvastatin-induced thrombocytopenia. *Sul Med J.* 2010 Jul; 103 (7) :676-8.

Wachowicz, B., Saluk, J., Kaca, W. Response of blood platelets to *Proteus mirabilis* lipopolysaccharide. *Microbiol. Immunol.*, 1998; 42:47-49.

Wallach D, Engelmann H, Nophar Y, Aderka D, Kemper O, Hornik V, Holtmann H, Brakebusch C. Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor. *Agents Actions Suppl.* 1991;35:51-7. Review.

Wang MH, Flad HD, Feist W, Musehold J, Kusumoto S, Brade H, Gerdes J, Rietschel HT, Ulmer AJ. Inhibition of endotoxin or lipid A-induced tumor necrosis factor

production by synthetic lipid A partial structures in human peripheral blood mononuclear cells. Lymphokine Cytokine Res. 1992 Feb;11(1):23-31.

Wolber EM, Fandrey J, Frackowski U, Jelkmann W. Hepatic thrombopoietin mRNA is increased in acute inflammation. Thromb Haemost. 2001 Dec;86(6):1421-4.

Yaguchi, A., Lobo, F.L., Vincent, J.L., Pradier, O. Platelet function in sepsis. Journal of thrombosis and haemostasis, 2004; 2:2096-2102.

Yang, B., Rizzo, V. TNF- α potentiates protein-tyrosine nitration through activation of NADPH oxidase and eNOS localized in membrane rafts and caveolae of bovine aortic endothelial cells. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2007; 292:H954-H962.

Young, J.M., Panah, S., Satchawatcharaphong, C., Cheung, P.S. Human whole blood assays for inhibition of prostaglandin G/H synthases-1 and -2 using A23187 and lipopolysaccharide stimulation of thromboxane B₂ production. Inflamm. Res., 1996; 45:246-253.

Zeuke, S., Ulmer, A.J., Kusumoto, S., Katus, H.A., Heine, H. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. Cardiovasc. Res., 2002; 56:126-134.

Zhang FL, Luo L, Gustafson E, Lachowicz J, Smith M, Qiao X, Liu YH, Chen G, Pramanik B, Laz TM, Palmer K, Bayne M, Monsma FJ Jr. ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999. *J Biol Chem.* 2001; 276:8608-15.

Zhang, G., Han, J., Welch, E.J., Ye, R.D., Voyno-Yasenetskaya, T.A., Malik, A.B., Du, X., Li, Z. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol.*, 2009; 182:7997-8004.

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, 13:419-424.

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: effects of staurosporin, wortmannin, and indomethacin. *Thromb. Res.*, 2001; 103:149-155.