



PEDRO HENRIQUE LEITE BONFITTO

**“EFEITO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA NA
AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.”**

**CAMPINAS
2015**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

PEDRO HENRIQUE LEITE BONFITTO

**“EFEITO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA NA
AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.”**

Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em Farmacologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Sisi Marcondes Paschoal

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO PEDRO HENRIQUE LEITE
BONFITTO, E ORIENTADO PELA PROFA. DRA. SISI
MARCONDES PASCHOAL.

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2015**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B641e Bonfitto, Pedro Henrique Leite, 1987-
Efeito do fator de necrose tumoral alfa na agregação plaquetária / Pedro Henrique Leite Bonfitto. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

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

1. Fator de necrose tumoral alfa. 2. Agregação plaquetária. 3. Complexo glicoproteico GPIIb-IIIa de plaquetas. I. Paschoal, Sisi Marcondes, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of tumor necrosis factor alpha on platelet aggregation

Palavras-chave em inglês:

Tumor necrosis factor alpha

Platelet aggregation

Platelet glycoprotein GPIIb-IIIa complex

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Sisi Marcondes Paschoal [Orientador]

Nicola Amanda Conran Zorzetto

Ana Marisa Chudzinski Tavassi

Data de defesa: 27-01-2015

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

PEDRO HENRIQUE LEITE BONFITTO

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

MEMBROS:

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



2. PROF(A). DR(A). NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO



3. PROF(A). DR(A). ANA MARISA CHUDZINSKI TAVASSI



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

Data: 27 de janeiro de 2015

RESUMO

As plaquetas são importantes células na inflamação, entretanto, os trabalhos que estudam as citocinas na reatividade plaquetária são raros. O objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) em plaquetas. Ensaio de agregação foram realizados incubando-se plaquetas com crescentes concentrações de TNF- α (1 – 3000 pg/ml) por diferentes intervalos de tempo (5 – 60 min), na ausência ou presença do antagonista não seletivo dos receptores TNFR1 e TNFR2, o R7050. Também foi estudado o efeito do TNF- α na viabilidade plaquetária utilizando-se o MTT. O efeito do TNF- α na mobilização de Ca^{2+} em plaquetas foi investigado através de ensaios de fluorescência utilizando-se o fluo-3-AM; os ensaios de western blotting foram realizados para o estudo da ativação da enzima c-Src e do receptor de fibrinogênio. Finalmente, foram determinados os níveis intraplaquetários de AMPc e GMPc por ELISA. O TNF- α inibiu a agregação plaquetária induzida por ADP ou trombina de forma dependente da concentração da citocina e do tempo de incubação. O efeito inibitório máximo do TNF- α na agregação induzida por ADP (5 μM) foi obtido com a concentração de 300 pg/ml por um tempo de incubação de 30 min ($90 \pm 7\%$ de inibição), o qual foi significativamente prevenido pela pré-incubação das plaquetas com o R7050. A viabilidade plaquetária não foi modificada pela incubação por 60 min com o TNF- α (30 e 3000 pg/ml). A incubação de plaquetas com TNF- α (300 pg/ml, 30 min) reduziu em 53% o aumento da concentração de Ca^{2+} total causado pela adição de trombina (200 mU/ml). A queda da concentração de Ca^{2+} citosólica plaquetária causada pelo TNF- α foi em decorrência da diminuição em 1,8 e 3,4 vezes da mobilização interna do íon e do influxo do mesmo, respectivamente. O TNF- α reduziu em 60% os níveis de AMPc em plaquetas ativadas com ADP. Por outro lado, o TNF- α aumentou significativamente os níveis de GMPc em plaquetas ativadas por ADP (aumento de 51%). A pré-incubação de plaquetas com o inibidor da guanilil ciclase ODQ não reduziu o efeito inibitório do TNF- α na agregação induzida por ADP. Os ensaios de western blotting mostraram que o TNF- α reduziu significativamente a fosforilação do resíduo de Tyr416 da c-Src em plaquetas ativadas. Da mesma forma, o TNF- α reduziu em 37% a fosforilação do resíduo de Tyr773 da subunidade $\beta 3$ da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (receptor de fibrinogênio) em plaquetas ativadas por ADP. Portanto concluímos que o TNF-

α inibe a agregação plaquetária via receptores TNFR1 e/ou TNFR2, sem reduzir a viabilidade das plaquetas. O efeito inibitório do TNF- α na agregação é acompanhado pela redução de Ca^{2+} citosólico e inibição de c-Src e do receptor de fibrinogênio em plaquetas, sendo estes independentes de AMPc ou GMPc.

Palavras-chave: Fator de necrose tumoral alfa, Agregação plaquetária, Complexo glicoproteico GPIIb-IIIa de plaquetas.

ABSTRACT

Platelets have been described as important cells in inflammation; however, the effects of cytokines on platelet reactivity are rarely studied. The objective of the present work was to investigate the effects of the tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in platelets. Aggregation assays were carried out incubating platelets with increasing TNF- α concentrations (1 – 3000 pg/ml) for different intervals of times (5 – 60 min), in the absence or in presence of the non-selective antagonist of TNFR1 and TNFR2, R7050. Effect of TNF- α on platelet viability was determined using MTT. The effect of TNF- α on the Ca^{2+} mobilization in platelets was investigated through fluorescence assays using fluo-3AM and Western blotting assays were carried out to determine the activation of c-Src and the fibrinogen receptor. Finally, the cAMP and cGMP levels in platelets were determined by ELISA. TNF- α dose- and time-dependently inhibited ADP or thrombin-induced platelet aggregation. The inhibitory effect of TNF- α on ADP(5 μM)-induced platelet aggregation was maximum in a concentration of 300 pg/ml incubated with platelets for 30 min ($90 \pm 7\%$ of inhibition), which was significantly prevented by the incubation of platelets with R7050. Platelet viability was not modified by TNF- α (30 and 3000 pg/ml) incubated for 5 to 60 min. Incubation of platelets with TNF- α (300 pg/ml, 30 min) reduced the increased total Ca^{2+} concentration induced by thrombin (200 mU/ml) by 53%. Decreasing Ca^{2+} internal mobilization (1,8 fold) and decreasing in external Ca^{2+} influx (3,4 fold) led to a reduction of total cytosolic Ca^{2+} in TNF- α activated platelets. TNF- α reduced the cAMP levels in ADP-activated platelets by 60%. On the other hand, TNF- α significantly increased cGMP levels in ADP-activated platelets (51% increase). Pre-incubation of platelets with the guanylyl cyclase inhibitor ODQ did not modify the inhibitory effect of TNF- α on ADP-induced platelet aggregation. Western blotting analysis showed that TNF- α significantly reduced phosphorylation on Tyr416 of c-Src in activated platelets. Similarly, TNF- α reduced by 37% the Tyr773 phosphorylation of $\beta 3$ subunit of $\alpha\text{IIb}\beta 3$ integrin (fibrinogen receptor) in ADP-activated platelets. Therefore, our results show that TNF- α inhibits platelet aggregation via TNFR1 and/or TNFR2 receptors, without affecting platelet viability. The inhibitory effect of TNF- α on aggregation is accompanied by

a reduction in cytosolic Ca^{2+} and the inhibition of c-Src and fibrinogen receptor activation, which are cAMP and cGMP-independent effects.

Keywords: Tumor necrosis factor alpha, Platelet aggregation, Platelet glycoprotein GPIIb-IIIa complex.

SUMÁRIO

página

DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xix
ABREVIATURAS	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Plaquetas	1
1.2 Plaquetas nos processos inflamatórios.....	4
1.3 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)	6
1.4 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e plaquetas.....	8
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo Geral	10
2.2 Objetivos Específicos	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Animais	11
3.2 Obtenção de plaquetas lavadas	11
3.3 Determinação da viabilidade plaquetária pelo MTT	11
3.4 Agregação plaquetária	12
3.5 Determinação da mobilização de cálcio em plaquetas	12
3.6 Determinação dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc	13
3.7 Western blotting	14
3.8 Análise estatística	14
4. RESULTADOS	15
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
8. ANEXOS	50

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Vera Lúcia e Mario,
pelo orgulho de tê-los como pais e exemplo para minha vida;
pela compreensão, paciência e sacrifício
feitos em ordem de tornar esse sonho realidade.*

*Aos meus irmãos, João Felipe e José Luís,
pelo apoio, compreensão e paciência.*

*Aos meus amigos
pela ajuda e por me encorajarem
sempre seguir adiante.*

AGRADECIMENTO

A Deus, por ter me proporcionado essa oportunidade de aprimoramento da vida ao superar os desafios, sabendo-se que mais importante do que ter sucesso é saber se levantar sempre que se cai;

À minha orientadora, Profa. Dra. Sisi Marcondes Paschoal, o meu muito obrigado por ter me aceitado como aluno e pelos conhecimentos transmitidos;

Aos colegas do Departamento de Farmacologia, em especial à Débora, Carol, Gisele, Dra. Elisa, Jéssica e Paulo pela amizade cultivada e por toda a ajuda oferecida na execução dos experimentos;

Ao Toninho, da Galeno, pela colaboração técnica;

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Unicamp, Sr. Miguel, Agnaldo e Toninho pela paciência e disposição;

Aos Professores, Edson Antunes e Stephen Hyslop, pelos laboratórios cedidos e pelos conhecimentos compartilhados;

Ao Prof. Dr. Roger Frigério Castilho e aos funcionários do Núcleo de Medicina Experimental da Unicamp pela compreensão, paciência e por toda a ajuda e conhecimentos oferecidos na execução dos experimentos;

À CAPES pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1: Agregação plaquetária induzida pelo ADP -----	3
Figura 2: Processo de Sinalização pelo TNFR1 -----	8
Figura 3: Efeito do TNF- α sobre a viabilidade plaquetária -----	15
Figura 4: O TNF- α inibe a agregação plaquetária induzida por ADP. -----	17
Figura 5: A inibição da agregação induzida por ADP é dependente do tempo de incubação das plaquetas com o TNF- α . -----	18
Figura 6: A inibição da agregação induzida por trombina é dependente do tempo de incubação das plaquetas com o TNF- α . -----	19
Figura 7: O inibidor inespecífico dos receptores TNF- α reduz o efeito inibitório desta citocina na agregação plaquetária. -----	20
Figura 8: O TNF- α reduz a concentração citosólica de Ca ²⁺ total em plaquetas estimuladas por trombina. -----	22
Figura 9: O TNF- α reduz os níveis intraplaquetários de AMPc. -----	23
Figura 10: O efeito inibitório do TNF- α na agregação plaquetária não depende dos níveis intraplaquetários de GMPc. -----	25
Figura 11: O TNF- α reduz a ativação de Src. -----	27
Figura 12: O TNF- α reduz a fosforilação do resíduo Tyr773 da subunidade β 3 do receptor de fibrinogênio.-----	28

LISTA DE TABELAS

página

Tabela 1: Efeito do TNF- α na concentração citosólica total, mobilização intracelular e influxo de cálcio em plaquetas estimuladas pela trombina. -----	21
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	ácido araquidônico
ADP	adenosina difosfato
Akt	treonina proteína quinase
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
Bcl	linfoma de célula B
Bim	“Bcl-2-like protein 11”
Ca²⁺	íon cálcio
CD40L	ligante CD40
CID	coagulação intravascular disseminada
COX	ciclooxigenase
CRACM1	“Ca ²⁺ release-activated Ca ²⁺ channel modulator 1”
C-Src	c-terminal Src quinase
DAG	diacilglicerol
DMSO	dimetilsulfóxido
EGTA	ácido tetracético etileno glicol
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
Erk2	“extracelular signal-regulated kinase”
EROS	espécies reativas de oxigênio
FADD	Fas associado ao domínio da morte
FAK	quinase de adesão focal
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
GpIbα	glicoproteína Ib α
GpIIb/IIIa	glicoproteína IIb/IIIa
GTP	guanosina trifosfato

IBMX	3-isobutil-1-metil-xantina
ICAM-1	molécula de adesão intercelular 1
IL-1	interleucina 1
IL-1β	interleucina 1 β
IL-6	interleucina 6
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
IP3	trifosfato de inositol
LDL	lipoproteínas de densidade baixa
LPS	lipopolissacarídeo
Mg²⁺	íon magnésio
MIP-1α	proteína inflamatória α
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólico
NADPH	nicotinamida adenosina dinucleotídeo (fosfato)
NIK	quinase indutora do NF- κ B
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
O₂⁻	ânion superóxido
ODQ	“1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one”
p38MAPK	proteína kinase ativada pelo mitógeno p38
p42MAPK	proteína kinase ativada pelo mitógeno p42
PDE	fosfodiesterase
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PF4	fator plaquetário 4
PGG₂	prostaglandina G ₂
PGH₂	prostaglandina H ₂
PGI₂	prostaciclina

PI3K	fosfatidilinositol 3 quinase
PIP2	fosfatidilinositol bifosfato
PKA	proteína quinase dependente de AMPc
PKC	proteína quinase C
PKG	proteína quinase dependente de GMPc
PLA2	fosfolipase A2
PLC	fosfolipase C
Rac1	“Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1”
Rap1B	“GTP-binding protein smg p21B”
RhoA	proteína A homóloga a Ras
RIP1	proteína quinase 1 de interação ao receptor
SDS	dodecil sulfato de sódio
SFK	quinases pertencentes à família Src
sGC	guanilato ciclase solúvel
SIN-1	3-morpholinosydnonimine
SNP	nitroprussiato de sódio
SOC	canais de cálcio operados por armazenamento
SOCE	“store operated calcium entry”
SODD	silenciador do domínio da morte
TNFR1	receptor tipo 1 para o fator de necrose tumoral
TNFR2	receptor tipo 2 para o fator de necrose tumoral
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TRADD	domínio da morte associado ao receptor para TNF
TRAF2	fator 2 associado ao receptor TNF
TRAP	peptídeo ativador do receptor de trombina
TXA₂	tromboxano A ₂
VCAM-1	moléculas de adesão a célula vascular

VWF

fator de Von Willebrand

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plaquetas

As plaquetas são corpúsculos incolores, discóides, com diâmetro entre 0,9 e 3,6µm. A vida média das plaquetas humanas varia de 9 a 12 dias, e a contagem média em sangue venoso é de 250.000/µl. Cerca de 2/3 da massa plaquetária total encontra-se na circulação e 1/3, no baço (Bithell, 1998).

A capacidade das plaquetas de aderir a outras superfícies, e sua participação na coagulação sanguínea e trombose, foi primeiramente descrita por Bizzozero em 1882. Mais tarde Wright (1910) descreveu que as plaquetas eram derivadas de grandes células encontradas na medula óssea denominadas megacariócitos.

O estudo da ultraestrutura da plaqueta mostra um sistema tubular que se conecta à superfície do qual são expelidas substâncias contidas em grânulos durante a reação de liberação. No citoplasma, externamente aos túbulos, há microfilamentos e grânulos. As plaquetas apresentam três tipos de grânulos: densos, alfa e lisossomais. Os grânulos densos armazenam íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , ATP, ADP e 5-hidroxitriptamina (serotonina) enquanto que os grânulos α contêm inúmeras substâncias como o fator 4 plaquetário (PF4), a β -tromboglobulina, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), proteínas catiônicas, fator bactericida e fatores que participam da cascata de coagulação tais como o fibrinogênio, o fator V e o fator VIII/von Willebrand. Nos grânulos lisossomais encontram-se algumas hidrolases ácidas como a β -glucoronidase e a β -galactosidase (Ferroni et al., 2012).

A atividade plaquetária é modulada por substâncias que exercem efeitos excitatórios e inibitórios. O ADP, a trombina, o tromboxano A_2 (TXA_2) e o colágeno são agonistas fisiológicos que ativam as plaquetas, enquanto a prostaciclina (PGI_2) e o óxido nítrico (NO) inibem através do aumento da adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e da guanosina monofosfato cíclico (GMPc), respectivamente (Ignarro, 1993; Cheng et al., 2002).

O ADP, embora seja um fraco agonista, exerce uma função chave na agregação plaquetária porque, uma vez secretado dos grânulos densos, amplifica a ativação induzida por outros agonistas (Gachet, 2001). A ativação plaquetária induzida por ADP é mediada por

dois receptores acoplados à proteína G, o P2Y1 e o P2Y12 (Jin e col., 1998; Hollopeter et al., 2001; Zhang et al., 2001; Foster et al., 2001). O receptor P2Y1 está acoplado à proteína Gq, ao passo que o receptor P2Y12 está acoplado a proteína Gi (Savi et al., 1998; Hechler et al., 1998; Ohlmann et al., 1995; Jantzen et al., 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 et al., 1999).

A ligação do ADP ao receptor P2Y1 leva à ativação da enzima fosfolipase C (PLC), que converte o fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) da membrana plasmática em trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 liga-se ao sistema tubular denso, promovendo a liberação de cálcio das reservas intracelulares o que leva, conseqüentemente, ao influxo de cálcio pela via “store operated calcium entry” (SOCE). O DAG, por sua vez, promove a ativação da proteína quinase C (PKC). A PKC está envolvida na secreção plaquetária (Chung et al., 2000, Polgár et al., 2003) e na ativação do receptor de fibrinogênio (integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$) que medeia a sinalização outside-in, desencadeando uma série de eventos intracelulares que culminam com a reorganização do citoesqueleto, propagação e estabilização do agregado plaquetário (Li et al., 2010; Shattil et al., 1999). O aumento de Ca^{2+} citosólico e a ativação da PKC promovem a ativação da enzima fosfolipase A2 (PLA2), que cliva fosfolípidos de membrana e libera o ácido araquidônico (AA). O AA é metabolizado pela cicloxigenase (COX) em prostaglandina G2 (PGG₂) e prostaglandina H2 (PGH₂), a qual é metabolizada pela tromboxano sintase em TXA₂, que também, ao lado do ADP, amplifica a ativação plaquetária induzida por outros agonistas. (Simmons et al., 2004; Nakahata, 2008)

A ligação do ADP ao receptor P2Y12 leva à inibição da enzima adenililciclase (AC), com conseqüente diminuição da síntese de AMPc, o que contribui positivamente para o processo de ativação plaquetária. Esta via de sinalização também leva à ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), com conseqüente ativação da Akt e Rap1B (Moheimani e Jackson, 2012) (figura 1).

A PI3K é importante para a sustentação da ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. A fosforilação dos resíduos tirosina 773 e 785 na região citoplasmática da unidade β_3 é importante para a modificação de forma do receptor de fibrinogênio (integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$) de baixa afinidade para alta afinidade. A modificação de forma do receptor de fibrinogênio promove a ativação das kinases pertencentes à família Src (SFK), particularmente a C-Src ligada à unidade β_3 , que

por sua vez, também leva a ativação deste receptor (Brass LF et al., 2013; Harburger & Calderwood, 2009; Li Z et al., 2010; Stalker TJ et al., 2012).

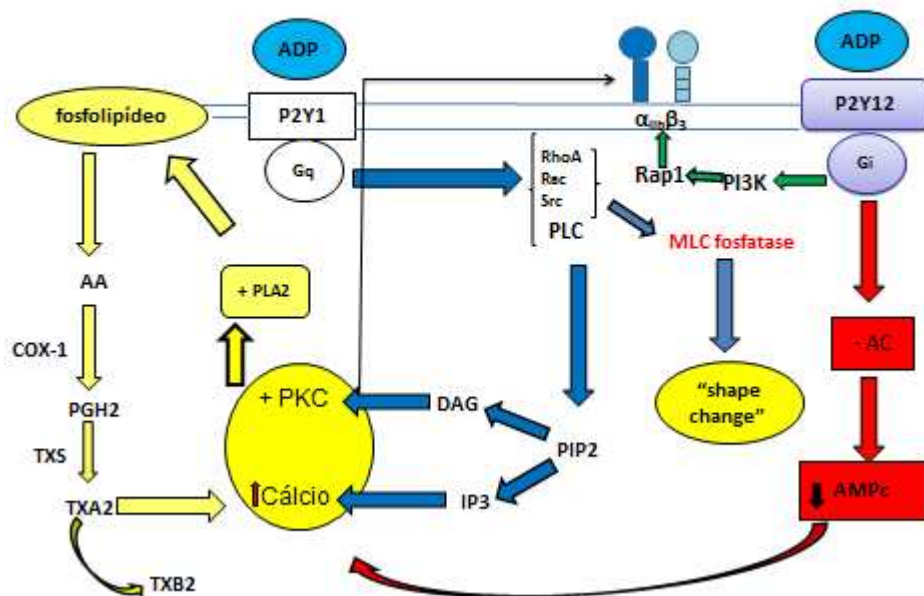


Figura 1: Agregação plaquetária induzida pelo ADP

A regulação negativa pode ser realizada pela prostaciclina (PGI_2), principal prostanóide secretado pelas células endoteliais. Esse prostanóide liga-se ao receptor IP plaquetário, acoplado à proteína Gs, e promove o aumento da concentração intracelular de cAMP, inibindo a ativação plaquetária, e assim a trombose (Garthwaite, 1991). O óxido nítrico (NO) é um potente inibidor plaquetário, também sintetizado pelas células endoteliais através da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que catalisa a conversão da L-arginina em L-citrulina produzindo o NO como co-produto, em uma reação dependente de NADPH e outros cofatores (Garthwaite, 1991). O NO inibe a atividade plaquetária por mecanismos dependentes e/ou independentes de cGMP (Moro et al., 1996; Marcondes et al., 2006). O NO ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) ao interagir com o domínio N-terminal das subunidades α_1 e β_1 da enzima, promovendo a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em GMPc no domínio catalítico C-terminal da enzima. O aumento dos níveis de GMPc leva à ativação das quinases dependentes de GMPc: cGK I α /cGK I β (PKG).

A ativação de proteínas quinases dependentes de cAMP e cGMP é um mecanismo bem estabelecido pelo qual o aumento de AMPc e GMPc, respectivamente, leva a inibição plaquetária. As quinases dependentes destes nucleotídeos cíclicos inibem o aumento de Ca^{2+} intracelular através da inibição da PLC e da fosforilação de receptores de IP3 no sistema tubular denso. Além disso, a PKA fosforila a glicoproteína Ib β (receptor do Fator de von Willebrand, importante na adesão plaquetária) e as enzimas quinase da cadeia leve da miosina (responsável pela fosforilação da miosina envolvida na mudança de forma da plaqueta e na secreção granular) e RhoA (responsável pela inibição da fosfatase de miosina de cadeia leve) (Geiger et al., 1999), levando assim, à inibição da ativação plaquetária.

Os nucleotídeos cíclicos cAMP e cGMP podem ser hidrolizados por um grupo de enzimas denominadas fosfodiesterases (PDEs) em seus metabólitos inativos 5'-nucleotídeos (AMP ou GMP) (Teixeira et al., 1997; Thorphy, 1998). Em condições fisiológicas normais, as plaquetas em repouso apresentam um balanço equilibrado da formação e hidrólise de cAMP e cGMP de forma a alcançar níveis intracelulares suficientes para impedir a ativação plaquetária (Feije et al., 2004).

1.2 Plaquetas nos processos inflamatórios

É cada vez mais evidente que as plaquetas não exercem apenas funções importantes na hemostasia e trombose, mas também estão envolvidas em doenças inflamatórias, como a aterosclerose e sepse.

A aterosclerose é um processo inflamatório envolvendo células vasculares, monócitos, linfócitos T, citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento (Lind, 2003). Dentre as citocinas, destacam-se a IL-1, IL-6, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o interferon- γ .

O acúmulo da lipoproteína de baixa densidade (LDL) no subendotélio e sua oxidação é o evento inicial na aterogênese, seguido pela infiltração e ativação de células inflamatórias. Na camada íntima do vaso, os monócitos se diferenciam em macrófagos, os quais internalizam a LDL oxidada e se transformam em células espumosas (Montenegro and Bogliolo, 1994). O TNF- α é uma citocina importante na patogênese da aterosclerose, pois além de ativar células inflamatórias e induzir a expressão de moléculas de adesão no endotélio, também favorece a expressão do receptor para a LDL oxidada na superfície de

células musculares lisas (Qiu et al., 2011). O acúmulo de células espumosas na íntima leva às lesões primárias da aterogênese caracterizadas por estrias gordurosas e espessamento da parede do vaso. As plaquetas também aderem aos sítios onde ocorre disfunção endotelial liberando diversas substâncias mitogênicas e inflamatórias no microambiente, dentre estas a IL-1 β e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Weber, 2005; Gawaz, 2006, Andrae et al., 2008).

A sepse é uma síndrome complexa causada por uma resposta inflamatória sistêmica não controlada, de origem infecciosa, caracterizada por múltiplas manifestações e que pode resultar em disfunção ou falência de um ou mais órgãos e até mesmo na morte, sendo um dos problemas mais frequentes e mais sérios com que os clínicos se deparam (Araújo et al., 2005). Na sepse ocorre uma diminuição da atividade cardiocirculatória resultante da liberação descontrolada de cíninas, prostaglandinas, citocinas e NO. Além disso, há a ativação de células inflamatórias com consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias incluindo o TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β), e interleucina-6 (IL-6). A resposta inflamatória tem como objetivo combater o agente invasor, limitar e reparar lesões teciduais. Hoje, as citocinas são consideradas de valor prognóstico, pois podem ser o prenúncio da gravidade ou da resolução da sepse, uma vez que têm um papel chave na sua patogênese (Casey et al., 1993). O TNF- α é um dos primeiros mediadores liberados por macrófagos na presença de lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede de bactérias gram negativas capaz de mimetizar vários aspectos da sepse (Flohé et al., 1991; Rietschel & Brade, 1992; Ferreira et al., 1993; Ebisui et al., 1994). Foi verificado que o TNF- α é capaz de causar várias das respostas atribuídas ao LPS, incluindo febre e, em altas doses, choque irreversível e morte. 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).

A trombocitopenia é outro marcador da gravidade da sepse e tem correlação positiva com o desenvolvimento da disfunção múltipla de órgãos (Russwurm et al, 2002; Gawaz et al, 1997). A trombocitopenia pode ocorrer até mesmo na ausência da coagulação intravascular disseminada (CID), uma condição importante que corrobora para a falência múltipla de órgãos observada no choque séptico (Larosa & Opal, 2007).

A sepse também está associada a efeitos significativos na coagulação, sistema fibrinolítico e agregação plaquetária (Leytin et al., 2002). Os resultados a respeito do estado

de ativação de plaquetas na sepse são controversos, mas muitos trabalhos mostram que há um decréscimo na agregação plaquetária. O tratamento de ratos com LPS diminui significativamente a agregação induzida por ADP (Vuaden et al, 2009, Lopes-Pires et al., 2012). Também foi observada uma redução significativa da agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno e TRAP (peptídeo ativador do receptor de trombina) em humanos com sepse severa (Adamzik et al., 2012).

1.3 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória, produzida por macrófagos, linfócitos, fibroblastos e queratinócitos (Tracey e Cerami, 1993; Kock et al., 1990), que recebe essa denominação por causar trombose nos vasos sanguíneos tumorais causando a morte do tumor por isquemia. Esta citocina desempenha um papel importante em várias condições inflamatórias como na aterosclerose, no câncer e na sepse (Piguet et al., 2002) uma vez que leva a vários efeitos tais como aumento da expressão da óxido nítrico induzível (iNOS), da ciclooxigenase-2 (COX-2), do receptor B1 de bradicinina, das proteínas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, do fator tecidual e aumento da atividade da NADPH oxidase (Campos et al., 1998; Mark et al., 2001; Sanders et al., 2001; Chandrasekharan et al., 2007; Zelová e Hosek, 2013).

O TNF- α pertence à superfamília do TNF e é sintetizado toda vez que a célula é estimulada, não sendo armazenado dentro das células (Zelová e Hosck; 2013). Esta citocina existe tanto na sua forma conjugada à membrana quanto na forma solúvel, sendo a primeira a forma mais ativa (Zelová e Hosck, 2013).

O TNF- α tem um papel paradoxal quanto à sua concentração: em altas doses possui papel anti-tumorigênico, enquanto em pequenas doses leva a um estado pró-tumorigênico (Szlosarek P et al, 2006; Balkwill F et al, 2002; Aggarwal BB et al, 2006). Ainda, o TNF- α nas doses de 0,1-1ng/ml possui efeitos anti-apoptóticos em neutrófilos humanos, mas a partir de 10ng/ml esse efeito é perdido (Van Den Berg M et al., 2001).

O TNF- α possui dois receptores específicos: TNFR1 e TNFR2. O primeiro está presente em todos os tipos celulares, exceto eritrócitos, enquanto o TNFR2 é expresso principalmente em células linfóides. Vários trabalhos mostram que o TNFR1 é o responsável por mediar a maior parte dos efeitos induzidos pelo TNF- α .

O TNFR1, pertencente ao grupo de receptores ligados ao domínio da morte, pode ser ativado tanto pela forma conjugada quanto solúvel do TNF- α (Vandenabeele et al., 1995; Zelová H, Hosck J; 2013).

Quando o TNF- α se liga ao TNFR1 ocorre a liberação da proteína inibidora do domínio da morte (SODD) que está ligada ao domínio intracelular do TNFR1, permitindo o recrutamento da proteína associada ao domínio da morte do receptor de TNF (TRADD) (Zelová H, Hosck J; 2013; Wang Y et al. 2000). A TRADD por sua vez recruta o fator 2 associado ao receptor de TNF (TRAF2), a proteína que interage com o receptor (RIP) e a Faz associada ao domínio da morte (FADD) (Jiang et al., 1999). A RIP e a TRAF2 modulam a via de sinalização anti-apoptótica e pró-inflamatória, enquanto FADD inicia a cascata de ativação de caspases culminando com a apoptose (Zelová H, Hosck J; 2013; Wang Y et al. 2000). O recrutamento da FADD leva à ativação da caspase 8, a qual ativa as caspases 3, 6 e 7 levando à apoptose celular (Baud e Karin, 2001) (figura 2).

A associação de TRADD ao receptor de TNF é modulada por diferentes enzimas como a PI3K, PKC δ e a MAPK p42/Erk2. Em neutrófilos humanos a PI3K leva a ativação de PKC δ que inibe a associação de TRADD ao TNFR1, mas aumenta a associação de TRAF2 e RIP, indicando que estas quinases estão envolvidas na sinalização anti-apoptose (Kilpatrick et al., 2000, Kilpatrick et al., 2004).

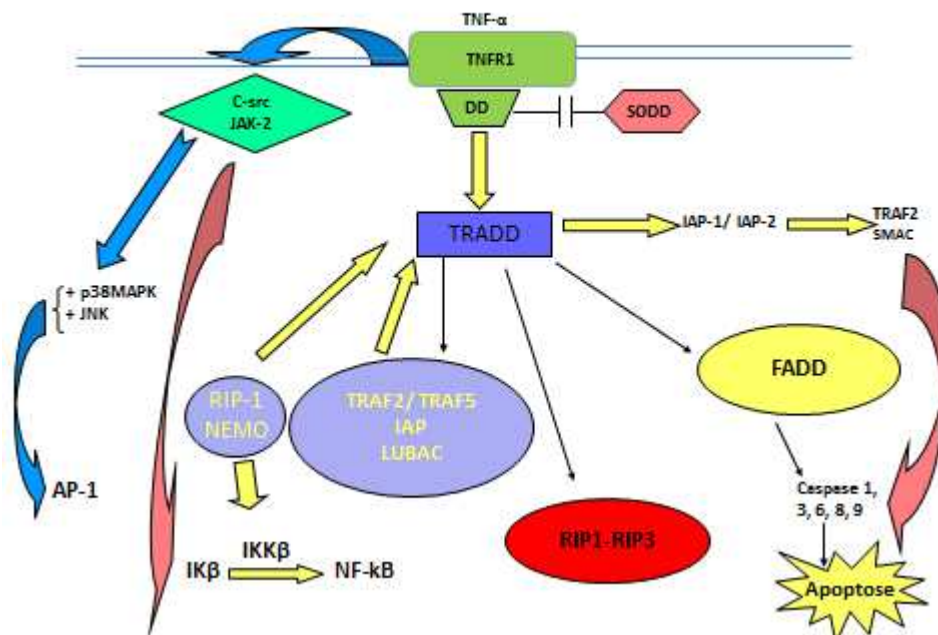


Figura 2: Processo de Sinalização pelo TNFR1

1.4 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e plaquetas

Já foi reportado que o ligante de CD40 (CD40L), pertencente a superfamília do TNF, potencializa a ativação e agregação plaquetária através da via TRAF2/Rac1/p38MAPK (Yacoub et al., 2010). O sCD40L leva a polimerização da actina e mudança de forma das plaquetas (Yacoub et al., 2010). Além disso, o sCD40L ativa a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e aumenta a expressão da P-selectina em plaquetas ativadas por ADP, colágeno ou trombina, mas não é capaz de ativar plaquetas em repouso (André et al 2002; Otterdal, et al., 2004).

Da mesma forma, o TNF- α pode interagir com plaquetas, entretanto, há poucos trabalhos sobre esta interação. O aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α tem sido usado como um marcador para o prognóstico de risco para pacientes com insuficiência cardíaca (Levine et al., 1990). Em 2008, Pignatelli e colaboradores reportaram que plaquetas de pacientes com insuficiência cardíaca apresentavam um aumento da expressão dos receptores TNFR1 e TNFR2, bem como de CD40L, sendo este último efeito mediado pela ativação de plaquetas por TNF- α . Na realidade, Pignatelli e colaboradores (2005) já haviam demonstrado que a incubação de plaquetas humanas com o TNF- α aumenta a agregação

induzida por colágeno via aumento da produção de TXA₂, sendo estes efeitos inibidos pelo antagonista de receptor de TNF- α . Por outro lado, um trabalho anterior mostrou que a incubação de TNF- α *in vitro* não modifica a atividade de plaquetas de camundongos, mas quando injetado nestes animais inibe a agregação plaquetária, o que é acompanhado pela redução da ativação do receptor de fibrinogênio e da expressão de p-selectina (Cambien et al., 2003).

Portanto, uma vez que as plaquetas possuem um papel importante na inflamação, é de grande relevância investigar o efeito de citocinas em plaquetas. No presente trabalho estudamos os efeitos do TNF- α na agregação plaquetária; esta citocina está em elevadas concentrações em diferentes condições inflamatórias. Como mostrado acima, trabalhos sobre os efeitos do TNF- α em plaquetas são extremamente raros e os poucos resultados são bastante controversos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho é investigar os efeitos *in vitro* do TNF- α na agregação de plaquetas de ratos saudáveis.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a viabilidade plaquetária na presença de TNF- α através de ensaios de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólico) por desidrogenases mitocondriais (Morganti 2008);
- Quantificar a agregação de plaquetas lavadas estimuladas com ADP e trombina na presença de concentrações crescentes de TNF- α e incubadas em diferentes intervalos de tempo. Também estudaremos o papel dos receptores de TNF- α , TNFR1 e TNFR2, nestas respostas;
- Determinar a mobilização de Ca^{2+} em plaquetas lavadas;
- Determinar os níveis intraplaquetários de AMPc e GMPc;
- Determinar a ativação do receptor de fibrinogênio (integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$) e da enzima c-Src através de ensaios de western blotting.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas – CEUA/UNICAMP (protocolo nº 2947-1). Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, pesando 250-340g, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - Unicamp). 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 Obtenção de plaquetas lavadas

Os ratos foram anestesiados por via inalatória com isoflurano e o sangue, obtido do ramo descendente da aorta, foi coletado em ACD-C (citrato de sódio 12,4mM, ácido cítrico 13mM, glicose 11mM, 9:1 v/v). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação do sangue total a 200 g durante 15 min. As plaquetas foram lavadas com tampão de lavagem (NaCl 140mM, KCl 0,5mM, citrato trissódico 12mM, glicose 10mM, sacarose 12,5mM, pH 6; 5:7 v/v) e suspensas em solução de Krebs-Ringer desprovida de cálcio (NaCl 118mM, NaHCO₃ 25mM, KCl 4,7mM, KH₂PO₄ 1,17mM, MgSO₄.7H₂O 1,66mM, glicose 5,6mM). A suspensão foi ajustada para 1,2x10⁸ plaquetas/ml na qual foi adicionada CaCl₂ para concentração final de 1 mM.

3.3 Determinação da viabilidade plaquetária pelo MTT

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade do TNF- α sobre as plaquetas, utilizamos o método originalmente descrito por Mosmann (1983). É um ensaio colorimétrico baseado na redução do MTT pelas desidrogenases mitocondriais de plaquetas metabolicamente ativas. A reação produz sal formazan que é insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos. A suspensão plaquetária (1,2x10⁸ plaquetas/ml, 50 μ l) foi incubada com TNF- α (30 pg/ml e 3000 pg/ml) por 5 min, 15 min, 30 min ou 60 min. Em seguida, as plaquetas foram estimuladas com ADP 5 μ M e então transferidas para uma placa de 96 poços, na qual

adicionou-se em cada poço solução de Krebs-Ringer para um volume final de 10 µl. Finalmente, 10 µl de MTT (5mg/ml) foram adicionados em cada poço e após incubação por 3h a 37°C, a reação foi interrompida com 100 µl de SDS 10% em HCl (0.01M). Após 1h, a placa foi lida em leitor de microplacas (Spectramax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) no comprimento de onda de 540nm.

3.4 Agregação plaquetária

Os ensaios de agregação foram realizados utilizando-se agregômetro de dois 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). As plaquetas foram ativadas com ADP (5µM e 10µM) ou trombina (200mU/ml) na ausência ou na presença de concentrações crescentes de TNF-α (1 - 3000pg/ml). Também realizaram-se ensaios de agregação onde a suspensão plaquetária foi pré-incubada com TNF-α (30 pg/ml ou 300 pg/ml) por diferentes intervalos de tempo (5, 15, 30 ou 60 min).

Para investigar se o efeito do TNF-α em plaquetas é mediado por receptores TNFR1 ou TNFR2, estas células foram incubadas por 10 min com o antagonista inespecífico dos receptores de TNF, o R7050 (0,1nM – 10nM), antes da adição do TNF-α.

3.5 Determinação da mobilização de cálcio em plaquetas

A determinação de Ca^{2+} intracelular foi realizada segundo Lu e colaboradores (2012). Após obtenção, as plaquetas foram ressuspensas em tampão Tyrode (NaCl 137mM, KCl 2,68mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ 0,41mM, $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,04mM, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 5,52mM, NaHCO_3 11,6mM, pH 7,4) e a suspensão ajustada para $3,0 \times 10^8$ plaquetas/ml, sendo incubada com o marcador fluorescente de cálcio Fluo-3-AM (3µM) e plurônico 0,1% por 30min., a 37°C. A suspensão plaquetária foi centrifugada a 800 g por 10 min para a retirada do excesso do marcador sendo cuidadosamente ressuspensa em solução tampão Tyrode novamente. Alíquotas da suspensão plaquetária de 300 µl, ativadas ou não com trombina (200 mU/ml), foram analisadas em fluorímetro (Synergy™ H1 Hybrid Reader, BioTek, EUA) em um comprimento de onda de excitação de 505 nm e emissão 535 nm. Em alguns experimentos a suspensão plaquetária foi pré-incubada com TNF-α por diferentes intervalos de tempo. A determinação da quantidade citosólica total de Ca^{2+} na plaqueta (é considerado o Ca^{2+}

proveniente do sistema tubular denso e do influxo do mesmo) foi determinada em presença de CaCl_2 (1 mM), uma vez que a ativação plaquetária é dependente deste íon. A determinação do Ca^{2+} proveniente dos estoques intracelulares foi realizada na presença do quelante de Ca^{2+} EGTA (10 μM). Para determinação da Fluorescência Máxima foi adicionado Triton-X (0,1%) em cada amostra e em seguida, para determinação da Fluorescência Mínima, foi adicionado EGTA (10 mM).

Os níveis de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foram determinados a partir da seguinte equação:

$$\text{Ca}^{2+} = kd \times [(F - F_{\text{min}})/(F_{\text{máx}} - F)]$$

Onde $kd = 335$, F é o valor de fluorescência da amostra, F_{min} a fluorescência mínima e $F_{\text{máx}}$ a fluorescência máxima.

3.6 Determinação dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc

A suspensão de plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foi incubada com o inibidor de fosfodiesterase 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX, 1 mM) por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado à suspensão de plaquetas, pré-incubadas ou não com $\text{TNF-}\alpha$ 30 pg/ml por 5 min, 15 min, 30 min ou 60 min, solução de salina ou ADP (5 μM). Após 5 min, a reação foi interrompida pela adição de etanol absoluto acidificado gelado em uma concentração final de 67% (v/v). As amostras foram rigorosamente agitadas por 30 seg, mantidas no gelo por 30 min e centrifugadas a 4000 g por 30 min a 4°C. Os sobrenadantes das amostras foram recolhidos e guardados, e os precipitados lavados com 0,5 ml de etanol acidificado (67% V/V) gelado, e centrifugados novamente a 14.000 g, à temperatura ambiente por 5 min. Os sobrenadantes desta última centrifugação foram coletados e adicionados aos sobrenadantes coletados da centrifugação anterior. Finalmente, as amostras foram secas a 55-60°C em banho-maria, sob fluxo de nitrogênio, e estocadas a -20°C até que a determinação de GMPc e AMPc fosse realizada. Os níveis dos nucleotídeos cíclicos foram determinados utilizando-se kit da Cayman (Ann Arbor, MI, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Cada amostra foi quantificada em duplicata e os resultados expressos em pmol/ml.

3.7 Western blotting

A suspensão plaquetária ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml, 500 μ l) foi incubada com TNF- α (30 pg/ml) por 30 min e, em seguida, as plaquetas foram ativadas por ADP (5 μ M). Após 5 min, a suspensão plaquetária foi congelada em nitrogênio líquido.

As amostras foram descongeladas, sonizadas por 30 seg e centrifugadas a 10.000 *g* por 10 min a 4°C. A concentração proteica dos precipitados foi determinada pelo método de Lowry e 60 μ g de proteína em tampão de Laemmli foi adicionada em cada poço do gel de poliacrilamida (10%). Após a separação das proteínas, estas foram transferidas para membranas de PVDF que foram incubadas com os anticorpos primários anti-Src, anti-fosfo(Tyr416)-Src, anti-integrina $\beta 3$ e anti-fosfo(Tyr773)- $\beta 3$. Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase. As bandas imunorreativas foram detectadas através do aumento de quimioluminescência em fotodocumentador (ChemiDoc XRS+ System with Image Lab, Biorad, EUA). A densitometria das bandas imunorreativas foi feita usando UN-SCAN-IT-gel 6.1 Software. Os níveis de fosforilação da Src e da integrina $\beta 3$ foram normalizados pelo total de Src e da integrina $\beta 3$, respectivamente.

3.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) para *n* experimentos. A significância estatística entre os grupos foi determinada utilizando ANOVA seguido pelo teste de Tukey. O teste *t* de Student pareado foi usado para a análise dos resultados obtidos nos ensaios de western blotting. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito do TNF- α na viabilidade plaquetária

A figura 3 mostra que a incubação de plaquetas com TNF- α não reduziu a viabilidade de plaquetas não ativadas ou ativadas com ADP (5 μ M), em nenhum dos tempos estudados (5 – 60 min). O TNF- α , mesmo em concentração alta (3000 pg/ml) e incubado por 60 min, não causou qualquer efeito tóxico em plaquetas não ativadas ou ativadas por ADP.

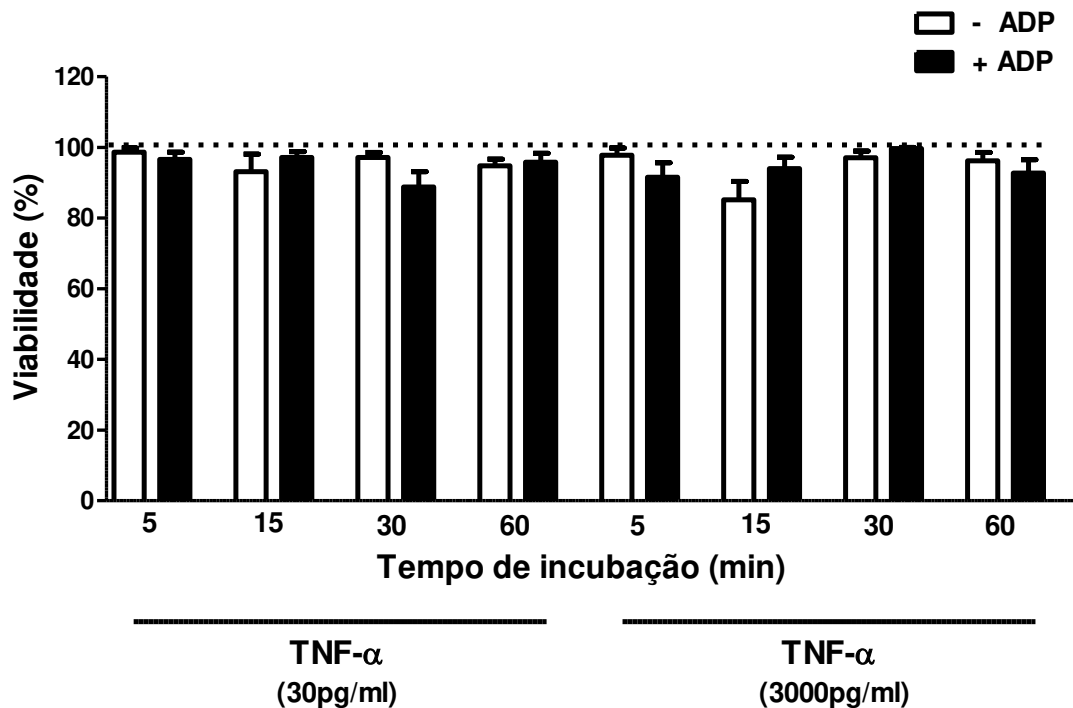


Figura 3: Efeito do TNF- α sobre a viabilidade plaquetária. A suspensão plaquetária ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foi incubada com TNF- α (30 e 3000 pg/ml) por diferentes intervalos de tempo (5 - 60 min) e estimuladas ou não com ADP (5 μ M). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. Todos os experimentos foram feitos em triplicata. N= 5-8 animais.

4.2 O TNF- α inibe a agregação plaquetária de forma dose e tempo dependente

A adição de ADP à suspensão de plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) levou a uma significativa agregação ($50 \pm 3\%$ e $46 \pm 3\%$ de agregação para ADP 5 μ M e 10 μ M, respectivamente).

A figura 4 mostra que a incubação de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) por 30 min com TNF- α levou a uma inibição da agregação induzida por ADP (5 μ M) dependente da concentração da citocina (inibição de $26 \pm 7\%$, $62 \pm 13\%$ e $77 \pm 9\%$, para as concentrações de 1 pg/ml, 10 pg/ml e 100 pg/ml de TNF- α , respectivamente). O efeito inibitório máximo de TNF- α na agregação plaquetária induzida por ADP foi observado nas concentrações de 100 e 300 pg/ml (figura 4C). O efeito inibitório do TNF- α (1 – 3000 pg/ml) na agregação induzida por ADP 10 μ M foi de magnitude semelhante àquela observada quando a agregação foi induzida por ADP 5 μ M (figura 4C). Os traçados típicos de agregação mostram que o TNF- α inibe a agregação máxima induzida por ADP, mas não modifica o tempo necessário para que esta seja alcançada (figura 4A).

O efeito inibitório do TNF- α (30 pg/ml) na agregação plaquetária induzida por ADP (5 μ M) é dependente do tempo de incubação das plaquetas com a citocina, sendo que o efeito máximo foi observado após 30 min de incubação (figura 5).

O TNF- α (300 pg/ml) também inibiu significativamente a agregação induzida por trombina (200 mU/ml), sendo este efeito dependente do tempo de incubação da citocina com as plaquetas (figura 6).

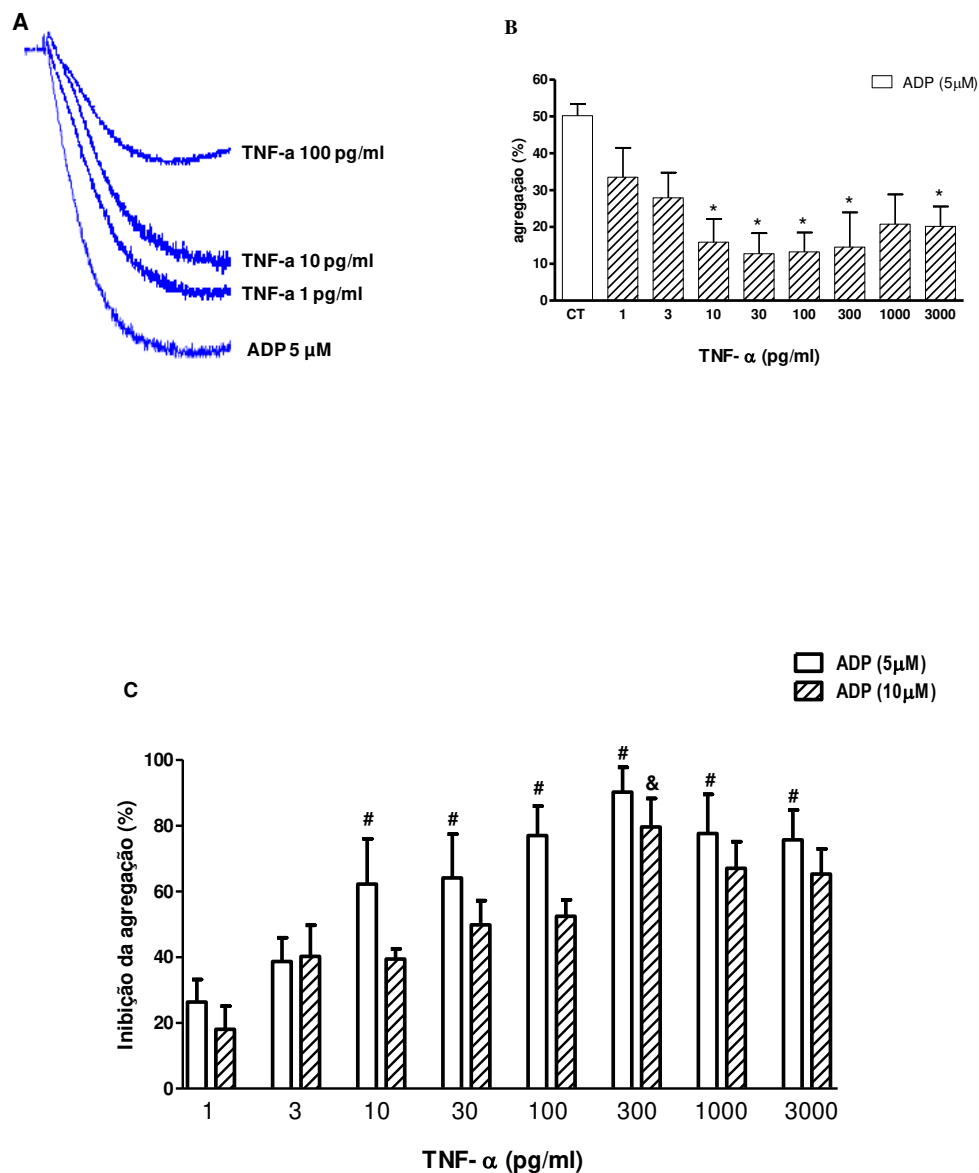


Figura 4: O TNF- α inibe a agregação plaquetária induzida por ADP. Plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) de ratos foram incubadas com TNF- α por 30 min antes da adição de ADP. (a) Curvas típicas de agregação induzida por ADP (5 μ M) na ausência ou presença de TNF- α (1, 10 e 100 pg/ml). (b) Agregação plaquetária induzida por ADP (5 μ M) na presença de crescentes concentrações de TNF- α (1 – 3000 pg/ml). (c) Inibição da agregação induzida por ADP (5 ou 10 μ M) na presença de TNF- α . * $P < 0,05$ comparado à agregação induzida por ADP 5 μ M na ausência de TNF- α . # $P < 0,05$ comparado à inibição da agregação por TNF- α 1 pg/ml. & $P < 0,05$ comparado à inibição da agregação por TNF- α em concentrações menores que 300 pg/ml. N= 5-8 animais.

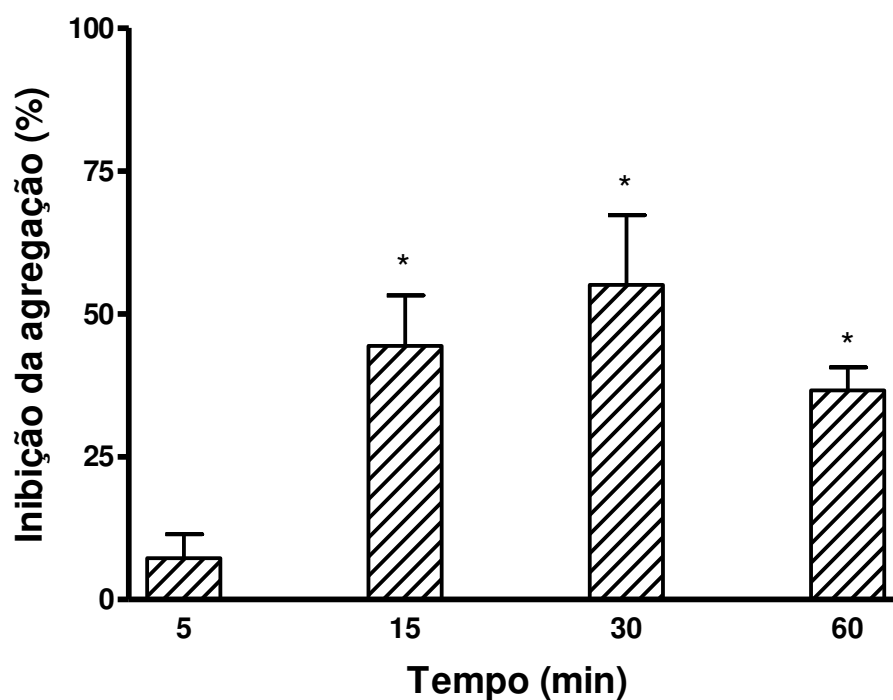


Figura 5: A inibição da agregação induzida por ADP é dependente do tempo de incubação das plaquetas com o TNF- α . Plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foram incubadas com o TNF- α (30pg/ml) por diferentes intervalos de tempo (5 min – 60 min) e em seguida foram ativadas pelo ADP (5 μ M). * $P < 0,05$ comparado à inibição da agregação causada por TNF- α após 5 min de incubação com as plaquetas. N= 5-8 animais.

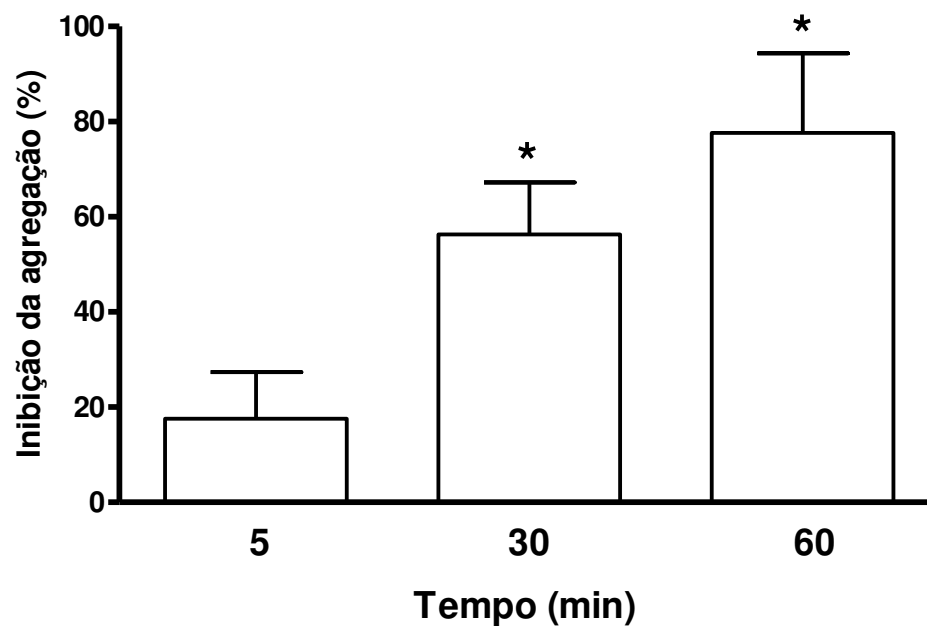


Figura 6: A inibição da agregação induzida por trombina é dependente do tempo de incubação das plaquetas com o TNF- α . Plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foram incubadas com o TNF- α (300 pg/ml) por diferentes intervalos de tempo (5 min – 60 min) e em seguida foram ativadas pela trombina (200 mU/ml). * $P < 0,05$ comparado à inibição da agregação causada por TNF- α após 5 min de incubação com as plaquetas. N= 5-8 animais.

4.3 Efeito do antagonista inespecífico dos receptores de TNF- α (R7050) no efeito inibitório desta citocina na agregação plaquetária

A pré-incubação das plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) por 10 min com o antagonista inespecífico dos receptores TNFR1 e TNFR2 de TNF- α , R7050 (1 e 10 nM), praticamente aboliu o efeito inibitório do TNF- α (300 pg/ml, 30 min) na agregação induzida por ADP 10 μ M (redução de cerca de 77% do efeito inibitório do TNF- α na agregação) (figura 7). Entretanto, o R7050 na concentração de 0,1 nM não alterou o efeito do TNF- α na agregação induzida por ADP (figura 7).

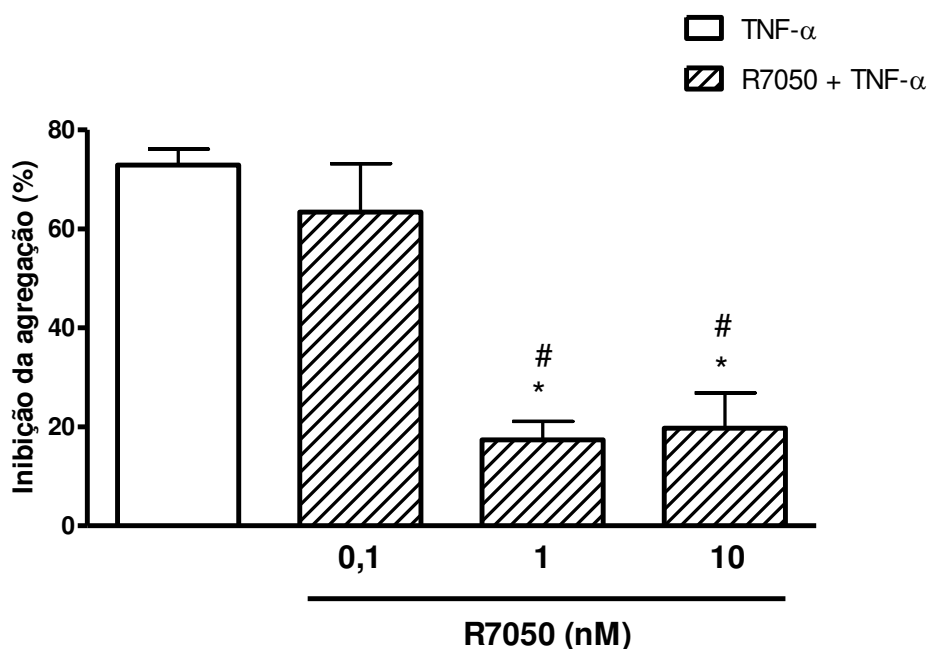


Figura 7: O inibidor inespecífico dos receptores TNF- α reduz o efeito inibitório desta citocina na agregação plaquetária. Plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foram pré-incubadas com o inibidor dos receptores TNFR1 e TNFR2 R7050 (0,1-10 nM) por 10 min. Em seguida, as plaquetas foram incubadas com TNF- α (300 pg/ml, 30 min) e estimuladas com ADP (10 μ M). * $P < 0,05$ comparados ao grupo TNF. # $P < 0,05$ comparados ao grupo onde as plaquetas foram pré-incubadas com R7050 0,1 nM antes da adição do TNF- α . N= 5-8 animais.

4.4 O TNF- α diminui a mobilização de cálcio em plaquetas ativadas por trombina

Durante o processo de ativação plaquetária ocorre um aumento tanto do influxo de cálcio como da liberação do íon do sistema tubular denso. O aumento da mobilização de cálcio é importante para o desencadeamento de diferentes processos que são observados durante a ativação plaquetária como a mudança de forma da plaqueta e a secreção granular. Como o TNF- α leva a uma diminuição da agregação plaquetária, procuramos verificar se a citocina afeta a mobilização do cálcio causada pela trombina.

A ativação de plaquetas ($3,0 \times 10^8$ plaquetas/ml) por trombina (200 mU/ml) levou a um aumento significativo de Ca^{2+} citosólico total quando comparado a plaquetas não ativadas (aumento de 3 vezes) (figura 8A). A incubação de plaquetas por 30 min com TNF- α (300 pg/ml) antes da adição de trombina reduziu em 53% a concentração de Ca^{2+} citosólico total em relação à ativação plaquetária na ausência da citocina (figura 8A). A figura 8B mostra que a ativação de plaquetas com trombina também levou a um aumento significativo da mobilização interna de Ca^{2+} . Entretanto, a incubação de plaquetas com TNF- α aboliu o aumento da mobilização interna de Ca^{2+} frente à adição de trombina (figura 8B). Da mesma forma, o TNF- α reduziu o influxo de Ca^{2+} causado pela trombina comparado aos ensaios realizados na ausência da citocina (tabela 1).

Tabela 1: Efeito do TNF- α na concentração citosólica total, mobilização intracelular e influxo de cálcio em plaquetas estimuladas pela trombina.

	Mobilização Total (nM)	Mobilização intracelular (nM)	Influxo de Ca^{2+} (nM)
Controle	1249 $\pm$ 167	809 $\pm$ 49	440 $\pm$ 32
TNF-α (300 pg/ml)	583 $\pm$ 132*	455 $\pm$ 110*	128 $\pm$ 2*

Plaquetas ($3,0 \times 10^8$ plaquetas/ml), incubadas ou não com TNF- α , foram estimuladas com trombina (200 mU/ml). Os resultados estão expressos como média dos valores absolutos da concentração de cálcio em nM $\pm$ EPM. *P<0,05 comparado ao respectivo controle.

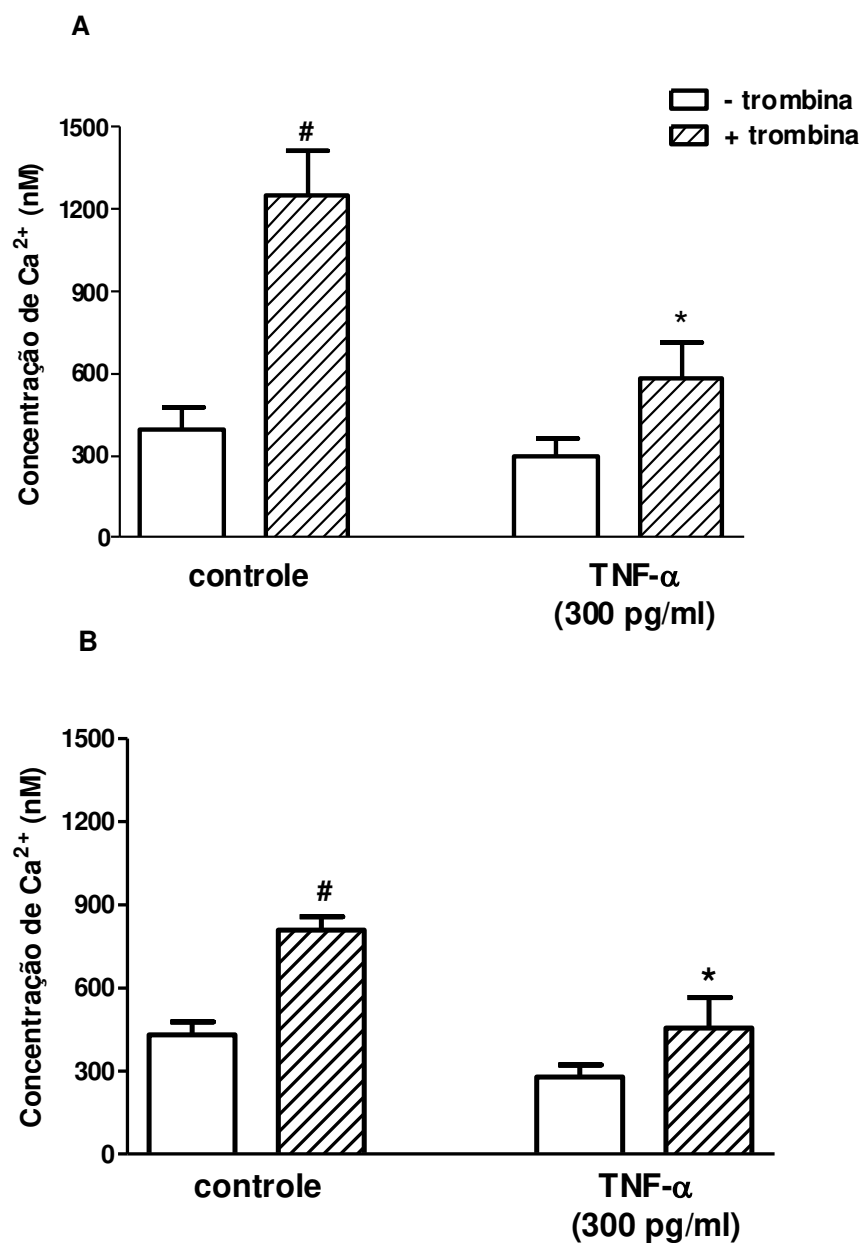


Figura 8: O TNF- α reduz a concentração citosólica de Ca^{2+} total em plaquetas estimuladas por trombina. As plaquetas (3×10^8 plaquetas/ml) foram incubadas com TNF- α (300 pg/ml) por 30 min. A mobilização de Ca^{2+} foi induzida pela adição de trombina (200 mU/ml), na presença de CaCl_2 (1 mM, painel A) ou EGTA (10 μM , painel B). Os resultados estão expressos como média da concentração de cálcio em $\text{nM} \pm \text{EPM}$. [#] $P < 0,05$ comparado a plaquetas não ativadas na ausência de TNF- α . ^{*} $P < 0,05$ comparado a plaquetas ativadas do grupo controle, isto é, não incubadas com o TNF- α . N= 6 animais.

4.5 Efeito do TNF- α nos níveis de AMPc em plaquetas

A incubação de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) com TNF- α (30pg/ml) reduziu significativamente os níveis intraplaquetários do nucleotídeo AMPc após a adição de ADP (5 μ M) quando comparados ao grupo controle (plaquetas ativadas na ausência da citocina) (figura 9). A incubação de plaquetas com TNF- α por 5 min reduziu em 60% a concentração de AMPc intraplaquetário, sendo que esta redução não se alterou quando as plaquetas foram incubadas com a citocina por tempos maiores (15 min, 30 min ou 60 min) (figura 9). A incubação de plaquetas com 1 μ M de iloprost (análogo estável da prostaciclina usado como controle positivo do experimento) aumentou aproximadamente 8 vezes os níveis de AMPc em plaquetas ativadas em relação ao grupo controle.

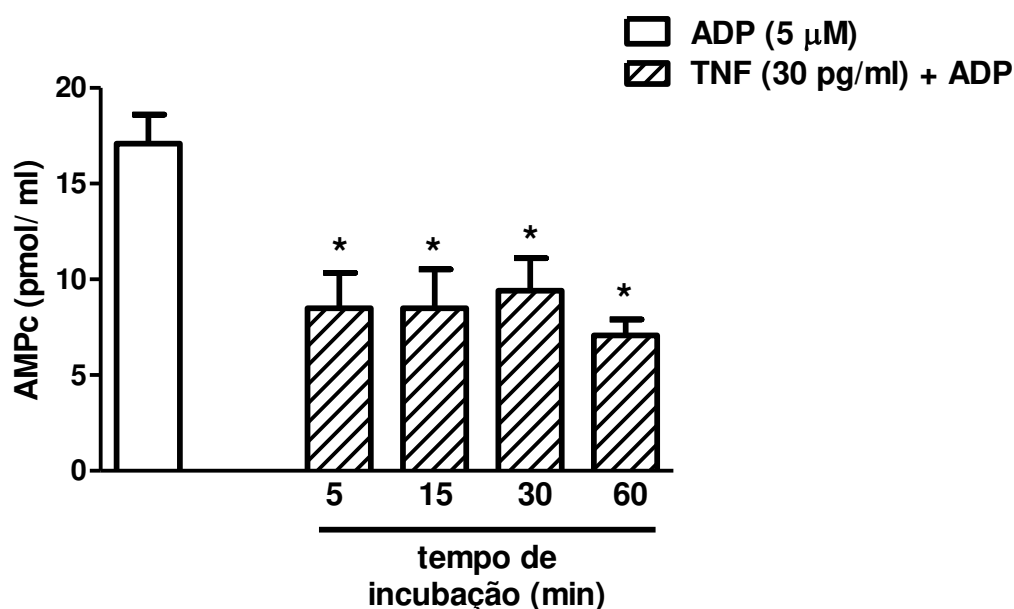


Figura 9: O TNF- α reduz os níveis intraplaquetários de AMPc. Plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foram incubadas com TNF- α (30pg/ml), por diferentes intervalos de tempo (5-60min), e estimuladas com ADP (5 μ M). Os níveis intraplaquetários de AMPc foram determinados por ELISA. * $P < 0,05$ comparados a plaquetas ativadas com ADP na ausência de TNF- α . N=4animais.

4.6 Efeito do TNF- α nos níveis citosólicos de GMPc em plaquetas

Os níveis de GMPc foram aumentados quando as plaquetas foram estimuladas com ADP (5 μ M), os quais foram reduzidos em 26% na presença do inibidor da guanilil ciclase ODQ (25 μ M) (figura 10 A). Como controle positivo do experimento, a incubação de plaquetas ativadas com ADP por 3 min com o doador de NO, nitropussiato de sódio (SNP, 100 μ M), elevou em cerca de 12 vezes os níveis de GMPc.

Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) incubadas com TNF- α (30pg/ml) apresentaram um aumento significativo dos níveis intracelulares do nucleotídeo GMPc quando comparadas ao grupo controle, porém este aumento não foi dependente do tempo de incubação das plaquetas com a citocina (Figura 10 A).

Uma vez que o aumento dos níveis de GMPc leva à diminuição da ativação plaquetária, investigamos se o efeito inibitório do TNF- α na agregação era dependente deste nucleotídeo. A incubação de plaquetas ativadas com ODQ (25 μ M) por 10 min não modificou o efeito inibitório do TNF- α (30 pg/ml) na agregação induzida por ADP (5 μ M) (figura 10 B). A inibição da guanilil ciclase praticamente aboliu a inibição da agregação plaquetária causada por SNP (controle positivo do experimento).

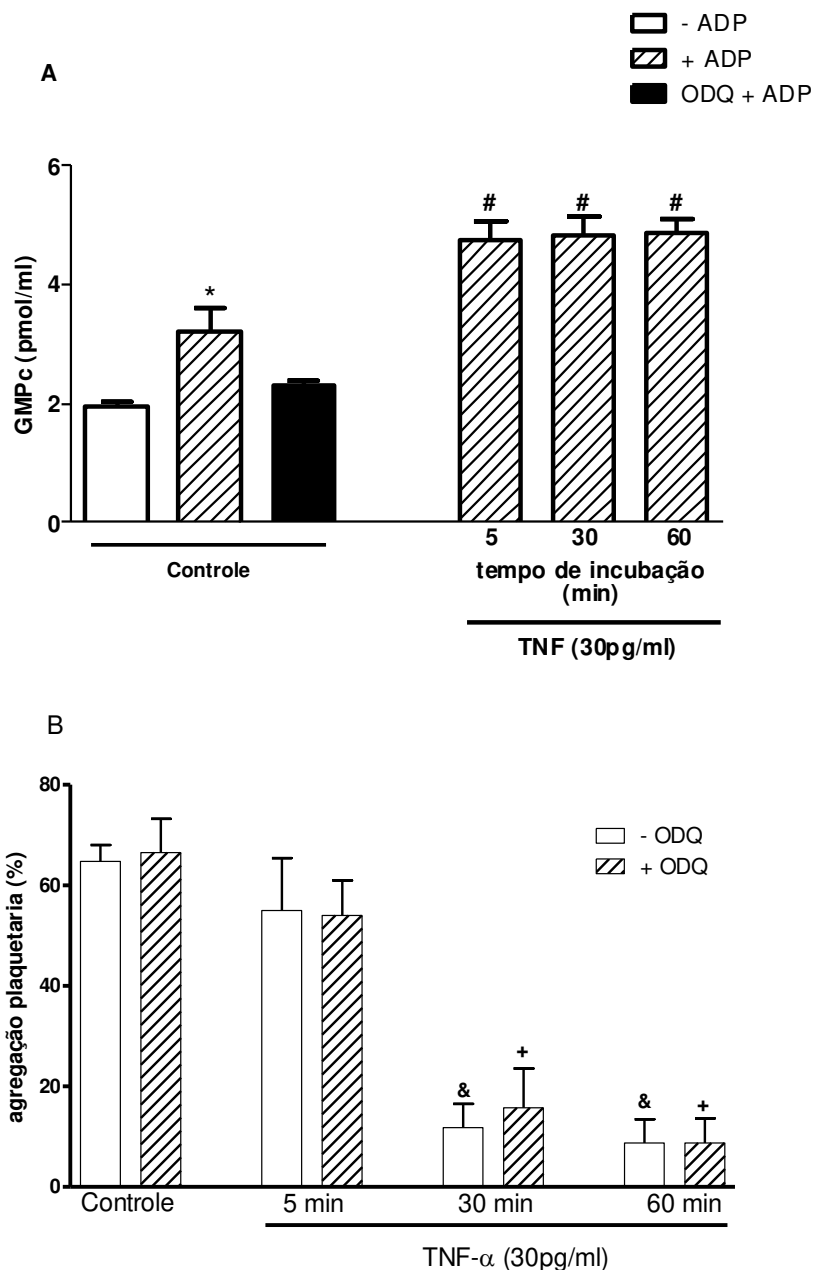


Figura 10: O efeito inibitório do TNF- α na agregação plaquetária não depende dos níveis intraplaquetários de GMPc. (painel A) Plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml), não incubadas ou incubadas com TNF- α (30pg/ml) por diferentes intervalos de tempo (5 – 60 min), foram estimuladas com ADP (5 μ M). Os níveis de GMPc foram determinados por ELISA. (painel B) Plaquetas foram pré-incubadas com ODQ (25 μ M) por 10 min. Em seguida, as amostras foram incubadas com TNF- α (30pg/ml) por diferentes intervalos de tempo (5 – 60 min) e estimuladas com ADP (5 μ M). *P<0,05 comparado a plaquetas não ativadas do grupo controle. #P<0,05 comparado a plaquetas ativadas do grupo controle. &P<0,05 e +P<0,05 comparado a plaquetas do grupo controle, na ausência ou presença de ODQ, respectivamente. N= 4 animais.

4.7 Efeito do TNF- α na ativação da enzima c-Src e do receptor de fibrinogênio

A análise do western blotting de plaquetas não ativadas e ativadas com ADP (5 μ M), incubadas ou não com TNF- α (30pg/ml) por 30 min, mostrou claramente uma banda imunorreativa para c-Src de mesma intensidade (figura 11 A). A fosforilação de c-Src no resíduo de Tyr416, que indica ativação da enzima, foi significativamente menor em plaquetas ativadas incubadas com TNF- α em comparação com plaquetas ativadas na ausência desta citocina, como mostrado pela razão da densitometria das bandas correspondentes a c-Src fosforilada e não fosforilada (figuras 11 B, 11 C).

A intensidade da banda imunorreativa para a subunidade β 3 da integrina α IIB β 3 (receptor de fibrinogênio) em plaquetas não ativadas é semelhante a de plaquetas ativadas com ADP, na presença ou ausência de TNF- α (30pg/ml) (figura 12 A). A figura 12B mostra que a fosforilação do resíduo de Tyr773 da subunidade β 3 da integrina α IIB β 3, indicativo da ativação do receptor de fibrinogênio, é aumentada em cerca de 37% em plaquetas ativadas com ADP (5 μ M) do que em plaquetas não ativadas. A incubação de plaquetas com TNF- α por 30 min antes da adição de ADP reduziu significativamente a fosforilação do resíduo Tyr773 da subunidade β 3 como mostrado pela razão da densitometria das bandas correspondentes a β 3 fosforilada e não fosforilada (figura 12 C).

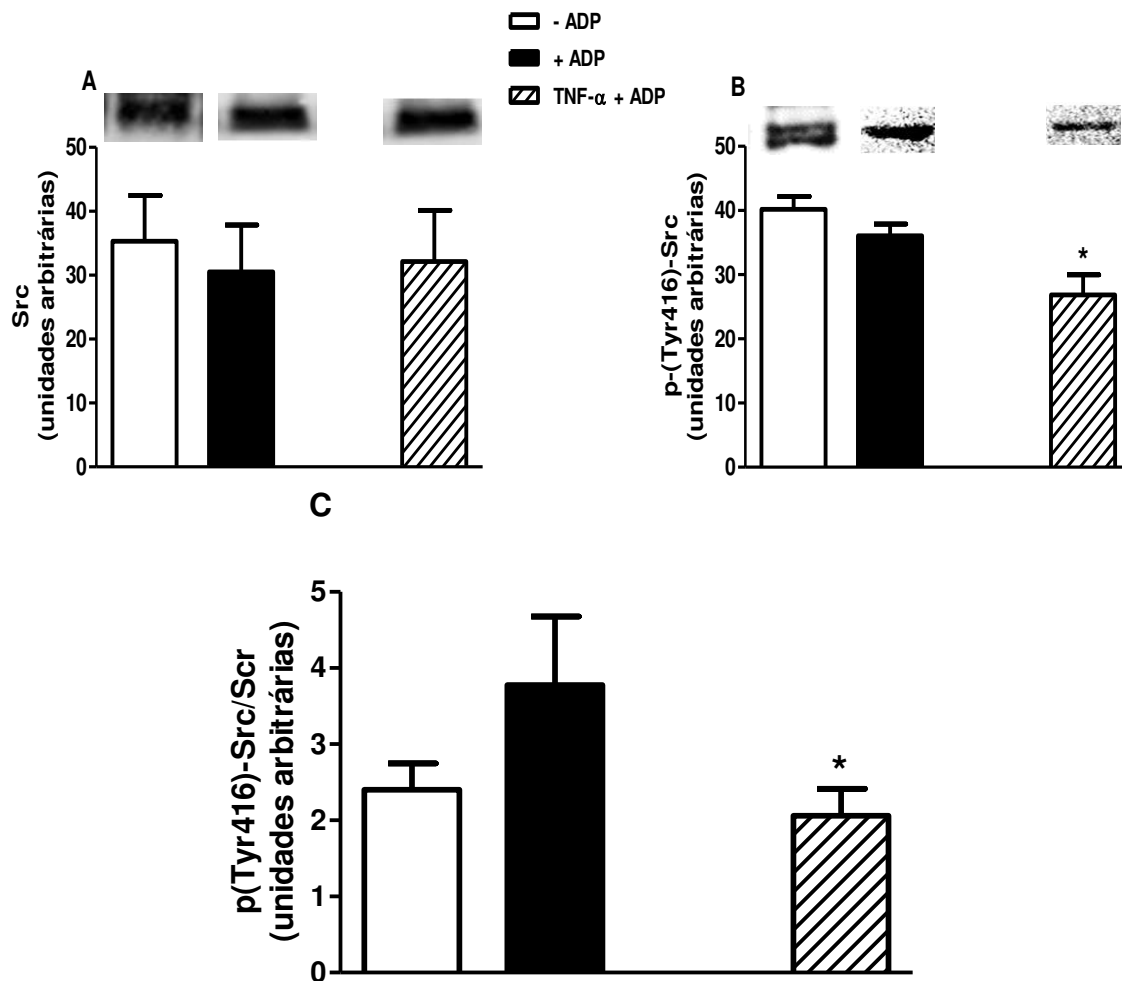


Figura 11: O TNF- α reduz a ativação de Src. A suspensão plaquetária ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml, $500 \mu\text{l}$) foi incubada com salina ou TNF- α (30pg/ml) por 30 min. Após adição de ADP ($5 \mu\text{M}$) ou salina, as amostras foram congeladas até o momento de uso. A determinação da concentração protéica da amostra foi feita pelo método de Lowry e $60 \mu\text{g}$ de proteína foi adicionada em cada poço do gel de poliácridamida 10%. A c-Src e a pTyr416-Src foram identificadas por western blotting utilizando os anticorpos primários anti-cSrc e anti p(Tyr416)-Src. Os painéis A e B mostram, respectivamente, o blotting representativo da detecção das bandas imunorreativas para c-Src e pTyr416-Src, bem como a densitometria das bandas. O painel C mostra razão das densitometrias das bandas correspondentes a c-Src fosforilada e não fosforilada. * $P < 0,05$ comparado às plaquetas ativadas na ausência do TNF- α . N= 4 animais.

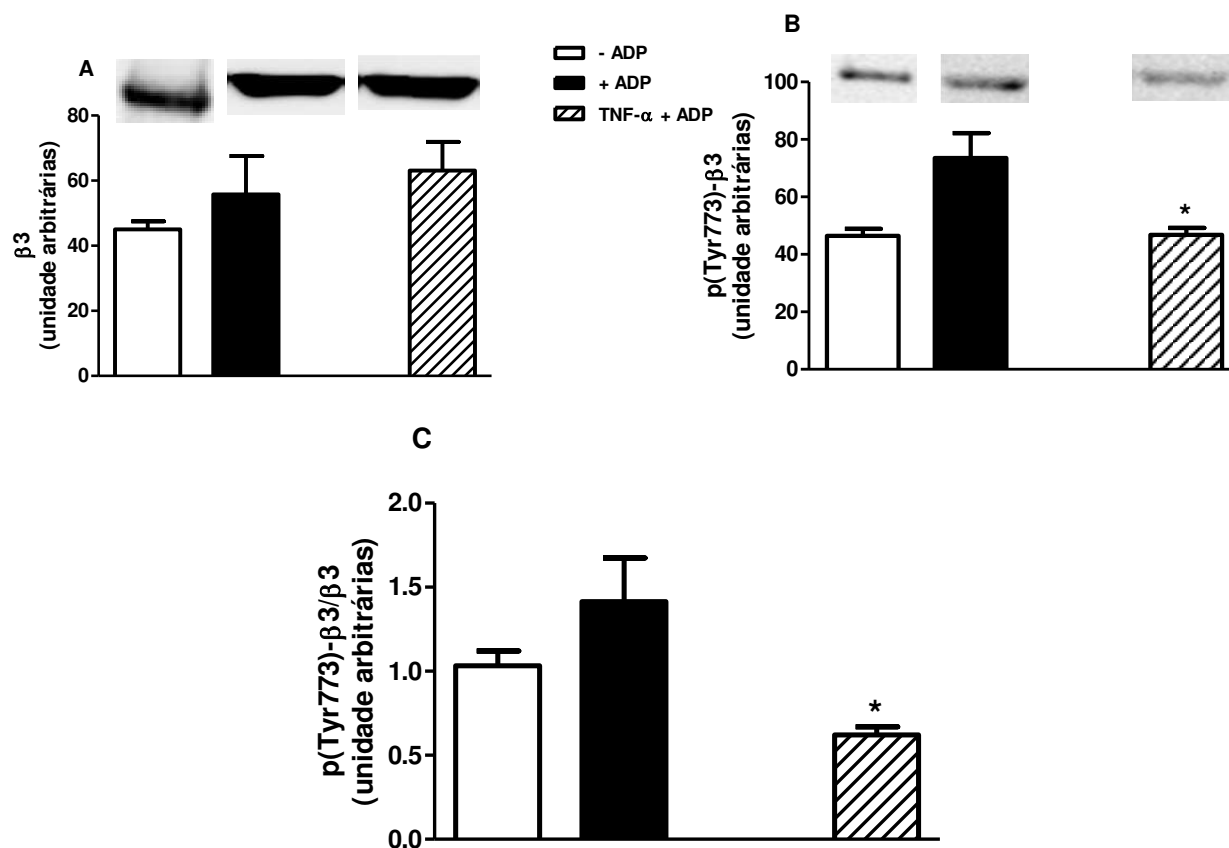


Figura 12: O TNF- α reduz a fosforilação do resíduo Tyr773 da subunidade $\beta 3$ do receptor de fibrinogênio. A suspensão plaquetária ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml, 500 μ l) foi incubada com salina ou TNF- α (30pg/ml) por 30 min. Após adição de ADP (5 μ M) ou salina, as amostras foram congeladas até o momento de uso. A determinação da concentração protéica da amostra foi feita pelo método de Lowry e 60 μ g de proteína foi adicionada em cada poço do gel de poliacrilamida 10%. A subunidade $\beta 3$ e a pTyr773- $\beta 3$ foram identificadas por western blotting utilizando os anticorpos primários anti- $\beta 3$ e anti p(Tyr773)- $\beta 3$. Os painéis A e B mostram, respectivamente, o blotting representativo da detecção das bandas imunorreativas para $\beta 3$ e pTyr773- $\beta 3$, bem como a densitometria das bandas. O painel C mostra razão das densitometrias das bandas correspondentes a $\beta 3$ fosforilada e não fosforilada. *P<0,05 comparado a plaquetas ativadas na ausência do TNF- α . N= 4 animais.

5. DISCUSSÃO

A resposta inflamatória inclui alguns mecanismos fisiológicos de defesa que envolve diferentes tipos celulares e mediadores com o objetivo de limitar e reparar lesões teciduais (Perera et al., 2001; Sabroe et al., 2002; Zeuke et al., 2002; Andonegui et al., 2005). A liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α (uma das primeiras citocinas liberadas), IL-1 β e a IL-6 por macrófagos e outras células, desempenha um papel central na orquestração desses mecanismos.

Já foi mostrado que o TNF- α pode levar a vários efeitos característicos da inflamação como vasodilatação, através do aumento da expressão da óxido nítrico sintase do tipo induzível (iNOS) (Sanders et al., 2001), recrutamento de leucócitos, por aumentar a expressão de moléculas de adesão (Chandrasekharan et al., 2007), aumento da ativação da cascata de coagulação, através da indução da expressão do fator tecidual (Pawlinsk et al., 2003) e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente através da ativação da NADPH oxidase (Yoshida e Tsunawaki, 2008).

Nos últimos anos, vários trabalhos têm mostrado que as plaquetas têm um papel importante na inflamação. As plaquetas liberam mediadores inflamatórios clássicos como a quimiocina CXCL4, RANTES e a proteína inflamatória α (MIP-1 α) ou substâncias que aumentam a resposta inflamatória como o ligante de CD40 (Gleissner et al., 2008; von Hundelshausen e Schmitt, 2014).

Apesar do TNF- α ser uma citocina comum em várias condições inflamatórias e as plaquetas serem consideradas importantes células nesses processos, há poucos trabalhos que descrevem o efeito desta citocina em plaquetas. Além de raros, os resultados sobre a ação do TNF- α em plaquetas são controversos. A administração de TNF- α em camundongos saudáveis aumenta o tempo necessário para formação do trombo após dano da artéria mesentérica, o qual é reduzido em camundongos “knocked out” para os receptores desta citocina. As plaquetas isoladas de camundongos tratados com TNF- α apresentam expressão reduzida de P-selectina, diminuição da agregação e redução da ligação de fibrinogênio (Cambien et al., 2003). Por outro lado, plaquetas provenientes de pacientes com insuficiência cardíaca apresentam maior expressão de receptores de TNF- α e agregam mais ao colágeno, sendo este efeito reduzido na presença de antagonista da citocina (Pignatelli et al., 2005).

Além disso, estes autores mostraram que a incubação *in vitro* de TNF- α com plaquetas de indivíduos saudáveis aumenta a agregação ao colágeno, a qual é reduzida pela inibição de receptores de TNF- α (Pignatelli et al., 2005).

Portanto a proposta do presente trabalho foi estudar os efeitos do TNF- α na agregação plaquetária. Neste trabalho mostramos que a pré-incubação de plaquetas com o TNF- α inibiu a agregação induzida tanto por ADP, um agonista fraco, quanto pela trombina, um agonista forte. A concentração de TNF- α utilizada nos nossos experimentos foi de 1-3000 pg/ml, uma vez que trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram que os níveis da citocina se encontram no intervalo de 200-750 pg/ml em ratos injetados com LPS após 6 e 48h (intervalo de tempo onde ocorre a intensificação do quadro inflamatório na sepse). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Bar e colaboradores (1997) que mostram que o TNF- α *in vitro* inibe a agregação induzida por ADP em mulheres grávidas ou não grávidas, sendo este efeito mediado pelo receptor TNFR2 (CD120b, p75).

O efeito inibitório na agregação foi dependente da concentração de TNF- α e do tempo de incubação, sugerindo que esta inibição esteja ocorrendo através da ativação de receptor plaquetário específico. A ação do TNF- α em diferentes células se dá através, principalmente, da ativação do receptor TNFR1, mas o TNFR2 também pode mediar vários efeitos (Vandenabeele et al., 1995; Zelová e Hosck, 2013). Portanto, no presente trabalho nós procuramos verificar se o efeito inibitório do TNF- α sobre a agregação foi dependente dos receptores TNFR1 e/ou TNFR2, através da pré-incubação das plaquetas com antagonista inespecífico R7050. Esta droga age impedindo a associação do TNFR com as moléculas adaptadoras TRADD e RIP, limitando a internalização do receptor e prevenindo os eventos celulares subsequentes à ligação da citocina (King et al., 2013). A R7050 reverteu parcialmente os efeitos inibitórios do TNF- α indicando, portanto, que a citocina promoveu a inibição da agregação plaquetária através dos receptores TNFR1 e/ou TNFR2.

Tendo em vista que um dos principais efeitos do TNF- α é o recrutamento e ativação da cascata das enzimas caspase, resultando na apoptose celular, investigamos se o efeito inibitório desta citocina na agregação foi em virtude da morte celular. Para isso, realizamos o teste com MTT para verificar a viabilidade plaquetária, uma vez que neste teste o MTT é reduzido por desidrogenases mitocondriais de plaquetas metabolicamente ativas. Neste experimento, incubamos as plaquetas com uma concentração baixa de TNF- α (30 pg/ml),

mas que leva a inibição máxima, bem como uma concentração bastante alta (3000 pg/ml) por tempos tão longo quanto 60 min. Decidimos realizar este experimento utilizando diferentes concentrações de TNF- α e diferentes intervalos de tempo de incubação, pois dependendo da concentração esta citocina pode ter efeitos apoptóticos ou não. Em experimentos realizados *in vitro* o TNF- α nas doses de 0,1-1ng/ml possui efeitos anti-apoptóticos em neutrófilos humanos, mas a partir de 10ng/ml esse efeito é perdido (van den Berg et al., 2001). Além disso, Micheau e Tschopp (2003) mostraram que o TNF- α leva a apoptose de células de fibrosarcoma somente após 4h de incubação. Nossos resultados mostram que o efeito inibitório do TNF- α na agregação não é decorrente da redução da viabilidade plaquetária.

O aumento de Ca^{2+} citosólico é fundamental para a ativação plaquetária, pois participa da ativação de várias vias de sinalização como a ativação do receptor de fibrinogênio (integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$), ativação da quinase da miosina de cadeia leve, importante para a mudança de forma da plaqueta, de liberação do conteúdo granular e ativação da fosfolipase A_2 , o que culmina com a produção de TXA_2 e amplificação da ativação plaquetária. O aumento de Ca^{2+} intracelular é resultante da liberação deste íon do sistema tubular denso e de seu influxo. O influxo se dá através de canais de cálcio ligados ao receptor como a integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ou por canais ativado por cisalhamento (Hjemdahl e Wallén, 1997). A incubação de plaquetas ativadas com o TNF- α levou a uma redução da concentração de Ca^{2+} intracelular em 2 vezes, que foi resultado da redução da mobilização interna deste íon, mas principalmente em virtude da diminuição do seu influxo o qual foi reduzido em quase 4 vezes. De forma semelhante, Church e colaboradores (2005) observaram que o tratamento crônico *in vitro* de células T CD4^+ com TNF- α (100-10000pg/ml) levou à diminuição significativa do influxo de cálcio através dos *store-operated channel* (SOC). Plaquetas humanas e de camundongo possuem grande expressão de Orai 1 (CRACM1), um dos membros da família dos canais SOC, e a redução de sua expressão promove a deficiência no influxo de cálcio em plaquetas ativadas (Braun A et al., 2009). Portanto, poderíamos criar a hipótese que o TNF- α reduz o aumento de Ca^{2+} citosólico plaquetário causado por trombina, especialmente por inibir canais do tipo SOC.

Os segundos mensageiros GMPc e AMPc são nucleotídeos cíclicos que participam da modulação negativa da ativação plaquetária. O AMPc é proveniente da ativação da enzima adenilil ciclase e leva a inibição plaquetária principalmente por ativar uma enzima

dependente deste nucleotídeo denominada PKA. A PKA age em diversos alvos, como em receptores de IP3 presentes no sistema tubular denso, inibindo a liberação de cálcio desta organela (Quinton et al., 1996). A prostaciclina, produto da metabolização do ácido araquidônico pela ciclooxigenase, é produzida especialmente no endotélio e inibe a ativação plaquetária por ativar a adenilil ciclase e assim aumentar os níveis de AMPc intraplaquetário. Portanto, decidimos investigar se o AMPc estaria envolvido na inibição plaquetária em resposta ao TNF- α . Nossos resultados mostraram que, na verdade, a incubação de plaquetas com TNF- α antes da adição de ADP levou a uma redução significativa dos níveis de AMPc intraplaquetário, indicando que o efeito inibitório desta citocina na agregação é independente deste nucleotídeo. Alguns estudos também mostram que o AMPc contribui para a apoptose de certos tipos celulares através da ativação da PKA e da proteína pro-apoptótica Bim (Insel et al., 2014). A redução dos níveis de AMPc em nossos experimentos poderia ser um mecanismo envolvido na manutenção da viabilidade plaquetária após a incubação com o TNF- α .

Até o momento, está bem estabelecido que o GMPc é formado pela enzima guanilil ciclase (GC). O NO é o principal agente endógeno que leva a ativação da GC solúvel que, ligando-se ao grupamento heme da enzima, aumenta a conversão do GTP a GMPc. O NO é proveniente da metabolização da L-arginina pela óxido nítrico sintase (NOS). Há três isoformas de NOS - endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS).

O NO, proveniente do endotélio ou de fármacos como o nitroprussiato de sódio (SNP), é um importante inibidor da atividade plaquetária. A inibição da ativação plaquetária pelo NO se dá por mecanismos dependentes e independentes de GMPc. Muitos dos efeitos dependentes de GMPc são mediados pela ativação da PKG, incluindo fosforilação do receptor de IP3 do sistema tubular denso e redução da ativação do receptor de fibrinogênio (Cavallini et al., 1996; Schwarz et al., 2001). Nossos resultados mostram que a incubação de plaquetas com TNF- α , antes da adição de ADP, levou a um aumento significativo dos níveis de GMPc. Entretanto, a pré-incubação das plaquetas com o inibidor da guanilil ciclase solúvel ODQ antes da adição do TNF- α não modificou o efeito inibitório do TNF- α na agregação plaquetária induzida por ADP, indicando que o efeito desta citocina na agregação não é dependente do aumento de GMPc. É importante lembrar que, a inibição da agregação plaquetária sempre é acompanhada de redução de Ca^{2+} citosólico (Schwarz et al., 2001;

Dangel et al., 2010). Trabalhos mostram que tanto a mobilização interna de Ca^{2+} em plaquetas, como seu influxo, podem ser modulados pela PKG (Geiger et al., 1994; Cavallini et al., 1996; Smolenski, 2012). Portanto, nossos resultados também sugerem que a inibição da mobilização de Ca^{2+} em plaquetas ativadas causada pelo $\text{TNF-}\alpha$ se dá por mecanismos independentes de GMPc.

Atualmente, a presença de NOS em plaquetas é bastante controversa (Naseem, 2008; Smolenski, 2012). Muitos autores demonstraram que plaquetas expressam a eNOS utilizando diferentes abordagens experimentais tais como a realização de ensaios de agregação plaquetária na presença de inibidores da eNOS (Radomski et al., 1990), western blotting para eNOS (Bergandi et al., 2010; Ognibene et al., 2010) e ensaios utilizando [^3H]L-citrulina (Riba et al., 2006). Entretanto, Gambaryan e colaboradores (2008) mostraram, pela primeira vez, que a iNOS ou eNOS não estão presentes em plaquetas humanas ou de camundongos. No presente trabalho mostramos que a incubação de plaquetas com o $\text{TNF-}\alpha$ levou ao aumento dos níveis de GMPc, indicando que neste modelo houve aumento da produção de NO. Como já mencionado, o NO pode modular a atividade plaquetária por mecanismos independentes de GMPc. O NO pode se ligar ao ânion superóxido (O_2^-) formando o peroxinitrito. Resultados ainda não publicados do nosso grupo mostram que a incubação de plaquetas com o $\text{TNF-}\alpha$ aumenta a formação de O_2^- , portanto, é possível que ocorra um aumento da produção de peroxinitrito em plaquetas incubadas com $\text{TNF-}\alpha$.

O efeito do peroxinitrito em plaquetas é bastante controverso. Em plaquetas lavadas, concentrações elevadas do peroxinitrito induzem agregação acompanhada pela expressão de P-selectina e desgranulação (Moro et al., 1994; Brown et al., 1998). Por outro lado, em plasma rico em plaquetas (PRP), o peroxinitrito inibe a agregação induzida por colágeno (Moro et al., 1994; Brown et al., 1998). Também foi mostrado que o peroxinitrito pode inibir a ativação plaquetária por diminuir a produção de energia mitocondrial (Rusak et al., 2006; Misztal et al., 2014).

Já está bem estabelecido que o peroxinitrito é um dos agentes químicos responsáveis pela nitração de resíduos de tirosina levando, na maioria das vezes, à inibição da atividade de diferentes enzimas e inibição celular. Já foi demonstrado que parte do efeito inibitório de doadores de NO, como o SNP e SIN-1, na atividade plaquetária é dependente da nitração de resíduos de tirosina da alfa-actinina (Marcondes et al., 2006; Cardoso et al., 2010).

Desta forma, o efeito inibitório do TNF- α na agregação plaquetária pode ser em decorrência do aumento da produção de NO e formação de peroxinitrito.

Como já mencionado anteriormente, a ativação da c-Src e do receptor de fibrinogênio são essenciais para ativação plaquetária e estabilização do agregado formado (Senis et al., 2014). A c-Src faz parte da família das Src quinases (SFKs). Em plaquetas já foram descritas a presença de cinco enzimas da família Src – a c-Src, Fyn, Lyn, Hck e Yes (Clark e Brugge, 1993; Ichinohe et al. 1995; Law et al., 1999; Senis et al., 2014).

A fosforilação do resíduo de tirosina 530 da c-Src humana (em camundongos o resíduo 527) tem efeito regulatório, inibindo sua própria atividade enzimática (Cooper et al., 1986, Cooper and King, 1996). A maior parte das moléculas de c-Src quinase em plaquetas em repouso, ou plaquetas não ativadas, está fosforilada na tirosina 530, cuja fosforilação é atribuída à ação da enzima Csk (Okada and Nakagawa, 1989, Okada et al., 1991, Nada et al., 1991). Quando as plaquetas são estimuladas, a c-Src tem seu resíduo 530 desfosforilado por fosfatases, levando à ativação da enzima (Falet et al., 1996, Somani et al., 1997). A desfosforilação da Tyr530 permite que a c-Src se autofosforile no resíduo de tirosina 418, causando um aumento da atividade desta enzima (Falet et al., 1996, Somani et al., 1997). A c-Src é uma das principais enzimas envolvidas na propagação de sinal após a ativação da subunidade β_3 da integrina $\alpha IIb\beta_3$. O domínio SH3 da c-Src está ligada a porção citosólica C-terminal da subunidade β_3 da integrina. Quando a integrina $\alpha IIb\beta_3$ torna-se ativada pela fosforilação da subunidade β_3 no resíduo Tyr773, ocorre desfosforilação do resíduo Tyr530 da c-Src, possibilitando sua ativação através da autofosforilação. A c-Src ativada leva à fosforilação de vários substratos importantes para a ativação plaquetária incluindo a β_3 , a proteína adaptadora Shc, proteínas do citoesqueleto – paxilina, vinculina e actinina e a fosfolipase $Cy2$ (Senis et al., 2014). Portanto, a ligação do fibrinogênio ao seu receptor (integrina $\alpha IIb\beta_3$) leva à ativação da c-Src, que por sua vez leva a um aumento da ativação deste receptor.

Nossos resultados mostram que a incubação de plaquetas ativadas com o TNF- α levou a uma redução tanto da fosforilação do resíduo Tyr416 da c-Src quanto do resíduo Tyr773 da subunidade β_3 , indicando que o efeito inibitório do TNF- α na agregação envolve a inibição da ativação da c-Src e do receptor de fibrinogênio.

Além disso, a inibição do receptor de fibrinogênio pode estar envolvida na redução do influxo de Ca^{2+} em plaquetas expostas ao $\text{TNF-}\alpha$, já que o influxo deste íon em plaquetas envolve canais de cálcio ligados à ativação deste receptor (Hjemdahl e Wallén, 1997).

Portanto, neste trabalho concluímos que o $\text{TNF-}\alpha$ modula a reatividade plaquetária, o que poderia ser importante em diversas condições inflamatórias, como na sepse, onde é observada, por muitos autores, uma redução da adesão e agregação plaquetária.

6. CONCLUSÕES

- A incubação, por 5 a 60 min, do TNF- α (30 e 3000 pg/ml) não reduz a viabilidade plaquetária;
- O TNF- α , via ativação de receptor TNFR1 e/ou TNFR2, inibe a agregação plaquetária induzida por trombina e ADP, de forma dependente do tempo de incubação e da concentração utilizada;
- O efeito inibitório do TNF- α na agregação plaquetária é acompanhado da redução de cálcio citosólico e diminuição da ativação da c-Src e do receptor de fibrinogênio (integrina α IIb β 3);
- O TNF- α reduz a concentração de cálcio citosólico plaquetário através, tanto da redução da mobilização de cálcio interno como de seu influxo;
- O efeito inibitório do TNF- α na agregação plaquetária é independente dos níveis intraplaquetários de AMPc e GMPc.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamzik M, Görlinger K, Peters J, Hartmann M. Whole blood impedance aggregometry as a biomarker for the diagnosis and prognosis of severe sepsis. *Crit Care*. 2012; 16(5):R204.
- Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol*. 2006; 72(11): 1605-21.
- Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KVJ, Pate KD, Kubes P. Platelets Express functional Toll-like receptor-4. *Blood*. 2005; 106(7): 2417-23.
- Andrae J, Gallini R, Betscholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008; 22(10): 1276-312.
- André P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation*. 2002; 106(8): 896-9.
- André P, Srinivasa Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, Phillips DR & Wagner DD. CD40L stabilizes arterial thrombi by a β_3 integrin-dependent mechanism. *Nature Medicine*. 2002; 8:247-252.
- Araújo CA, Vasconcelos DO, Cavalcanti DC, Silva FML, Souza W, Coutinho MH. Fator Inibidor de Macrófagos e Septicemia. *Rev. Port. Imunoalergologia*. 2005; 13(1): 19-23.
- Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002; 13(2): 135-41.
- Bar J, Zosmer A, Hod M, Elder MG, Sullivan MH. The regulation of platelet aggregation in vitro by IL-1 β and TNF- α : changes in pregnancy and in pré-eclampsia. *Thromb Haemost*. 1997; 78(4):1255-61.
- Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*. 2001; 11(9): 372-7.

Bergandi L, Cordero M, Anselmino M, Ferraro G, Ravera L, Dalmaso P, Moiraghi C, Trevi GP, Ghigo D, Bosia A, Bergerone S. Altered nitric oxide/cGMP platelet signaling pathway in platelets from patients with acute coronary syndromes. *Clin Res Cardiol*. 2010;99(9):557-64.

Bithell TC. Plaquetas e Megacariócito. (Capítulo 17). In: Lee, GR; Bithell, TC; Foerster, J; Athens, JW; Lukens, JN. *Wintrobe Hematologia Clínica*, volume 1, 1ª edição. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1998. pgs: 555, 556, 573, 574.

Brass LF, Newman DK, Wannermacher KM, Zhu L, Stalker TJ. Signal transduction during platelet plug formation. In: *Platelets*. Elsevier. 3ªed, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123878373000651>. Acesso em: 13 out. 2014.

Braun A, Varga-Szabo D, Kleinschnitz C, Pleines I, Bender M, Austinat M, Bösl M, Stoll G, Nieswandt B. Orai1 (CRACM1) is the platelet SOC channel and essential for pathological thrombus formation. *Blood*. 2009; 113(9): 2056-63.

Brown AS, Moro MA, Masse JM, Cramer EM, Radomski M, Darley-Usmar V. Nitric oxide-dependent and independent effects on human platelets treated with peroxynitrite. *Cardiovasc Res*. 1998;40(2):380-8.

Cambien B, Bergmeier W, Saffaripour S, Mitchell H A, Wagner D D. Antithrombotic activity of TNF- α . *J clin Invest*. 2003; 112 (10): 1589-96.

Campos MM, Souza GE, Calixto JB. Modulation of kinin B1 but not B2 receptors-mediated rat paw edema by IL-1 β and TNF α . *Peptides*. 1998; 19(7): 1269-76.

Cardoso MH, Morganti RP, Lilla S, Murad F, De Nucci G, Antunes E, Marcondes S. The role of superoxide anion in the inhibitory effect of SIN-1 in thrombin-activated human platelet adhesion. *Eur J Pharmacol*. 2010; 627(1-3): 229-34.

Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*. 1993; 119(8): 771-8.

- 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.
- Chandrasekharan UM, Siemonow M, Unsal M, Yang L, Poptic E, Bohn J, Ozer K, Zhou Z, Howe PH, Penn M, DiCorleto PE. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) receptor-II is required for TNF-alpha-induced leukocyte-endothelial interaction in vivo. *Blood.* 2007; 109(5): 1938-44.
- Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, Fitzgerald GA. Role of prostacyclin In the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science.* 2002; 296(5567): 539-41.
- Chung SH, Polgár J, Reed GL. Protein kinase C phosphorylation of syntaxin 4 in thrombin-activated human platelets. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(33): 25286-91.
- Church LD, Goodall JE, Rider DA, Bacon PA, Young SP. Persistent TNF- α exposure impairs store operated calcium influx in CD4+ T lymphocytes. *FEBS Lett.* 2005; 579(6): 1539-44.
- Cooper JA, Gould KL, Cartwright CA, Hunter T. Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science.* 1986; 231(4744): 1431-4.
- Cooper JA, King CS. Dephosphorylation or antibody to the carboxy terminus stimulates pp60c-Src. *Mol Cell Biol.* 1986; 6(12): 4467-77.
- Dangel O, Mergia E, Karlisch K, Groneberg D, Koesling D, Friebe A. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is the only nitric oxide receptor mediating platelet inhibition. *J Thromb Haemost.* 2010; 8(6): 1343-52.
- Ebisui O, Fukata J, Murakami N, Kobayashi H, Segawa H, Muro S, Hanaoka I, Naito Y, Masui Y, Ohmoto Y, et al. 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; 266(6 Pt 1): E986-92.

Falet H, Ramos-Morales F, Bachelot C, Fischer S, Rendu F. Association of the protein tyrosine phosphatase PTP1C with the protein tyrosine kinase c-Src in human platelets. *FEBS Lett.* 1996; 383(3): 165-9.

Feije MA, Ansinka K, Vabschoonbeek K, Heemskerk JWM. Control of platelet activation by cyclic AMP turnover and cyclic nucleotide phosphodiesterase type-3. *Biochemical Pharmacology.* 2004; 67: 1559–67.

Ferreira SH, Lorenzetti BB, Poole S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol.* 1993; 110(3): 1227-31.

Ferroni P, Vazzana N, Riondino S, Cuccurullo C, Guadagni F, Davi G. Platelet Function in Health and Disease: from Molecular Mechanisms, Redox Considerations to Novel Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2012; 17(10): 1447-1485.

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; 41 (11): 1607-14.

Foster CJ, Prosser DM, Agans JM, Zhai Y, Smith MD, Lachowicz JE, Zhang FL, Gustafson E, Monsma FJ Jr, Wiekowski MT, Abbondanzo SJ, Cook DN, Bayne ML, Lira SA, Chintala MS. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J Clin Invest.* 2001; 107(12): 1591-8.

Gachet C. ADP Receptors of platelets and their inhibition. *Thromb. Haemost.* 2001; 86: 222-32.

Gambaryan S, Kobsar A, Hartmann S, Birschmann I, Kuhlencordt PJ, Müller-Esterl W, Lohmann SM, Walter U. NO-synthase-/NO-independent regulation of human and murine platelet soluble guanylyl cyclase activity. *J Thromb Haemost.* 2008; 6(8): 1376-84.

Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends in Neurosciences.* 1991; 14: 60-68.

Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, Schömig A. Vitronectin receptor ($\alpha(v)\beta_3$) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation*. 1997; 96(6): 1809-18.

Gawaz M. Platelets in the onset of atherosclerosis. *Blood Cells Molecules and Diseases*. 2006; 36: 206-10.

Geiger J, Nolte C, Walter U. Regulation of calcium mobilization and entry in human platelets by endothelium-derived factors. *Am J Physiol*. 1994; 267(1 Pt 1): C236-44.

Geiger J, Brich J, Honig-Liedl P, Eigenthaler M, Schanzenbächer P, Herbert JM, Walter U. Specific impairment of human platelet P2Y₁ ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19 (8): 2007-11.

Gleissner CA, von Hundelshausen P, Ley K. Platelet chemokines in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(11): 1920-7.

Harburger DS, Calderwood DA. Integrin signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2009; 122(Pt 2): 159-63.

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.

Hjemdahl P, Wallén NH. Calcium antagonist treatment, sympathetic activity and platelet function. *Eur Heart J*. 1997; 18(suppl A): A36-50.

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.

Huang MM, Bolen JB, Barnwell JW, Shattil SJ, Brugge JS. Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88(17): 7844-8.

Ichinohe T, Takayama H, Ezumi Y, Yanagi S, Yamamura H, Okuma M. Cyclic AMP-insensitive activation of c-Src and Syk protein-tyrosine kinases through platelet membrane glycoprotein VI. *J Biol Chem*. 1995; 270(47): 28029-36.

Ignarro LJ. Nitric oxide-mediated vasorelaxation. *Thromb Haemost*. 1993; 70(1): 148-51.

Insel PA, Wilderman A, Zhang L, Keshwani MM, Zambon AC. Cyclic AMP/PKA-Promoted Apoptosis: Insights from Studies of S49 Lymphoma Cells. *Horm Metab Res*. Jul 16, 2014.

Jantzen HM, Gousset L, Bhaskar V, Vincent D, Tai A, Reynolds EE, Conley PB. Evidence for two distinct G-protein-coupled ADP receptors mediating platelet activation. *Thromb Haemost*. 1999; 81(1): 111-7.

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.

Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science*. 1999; 283(5401): 543-6.

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(4): 2030-4.

Kilpatrick LE, Song YH, Rossi MW, Korchak HM. Serine phosphorylation of p60 tumor necrosis factor receptor by PKC-delta in TNF-alpha-activated neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000; 279(6): C2011-8.

Kilpatrick LE, Sun S, Korchak HM. Selective regulation by delta-PKC and PI3-Kinase in the assembly of the antiapoptotic TNFR-1 signaling complex in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 287(3): C633-42.

King MD, Alleyne CH Jr, Dhandapani KM. TNF-alpha receptor antagonist, R7050, improves neurological outcomes following intracerebral hemorrhage in mice. *Neurosci Lett*. 2013; 542: 92-6.

Köck A, Schwarz T, Kirnbauer R, Urbanski A, Perry P, Ansel JC, Luger TA. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med*. 1990; 172(6): 1609-14.

Larosa S, Opal SM. Sepsis. *ACP Medicine*. 2007; 1-15.

Law DA, Nannizzi-Alaimo L, Ministri K, Hughes PE, Forsynth J, Turner M, Shattil SJ, Ginsberg MH, Tybulewicz VL, Phillips DR. Genetic and pharmacological analyses of Syk function in alphaIIb beta3 signaling in platelets. *Blood*. 1999; 93(8): 2645-52.

Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*. 1990; 323(4): 236-41.

Leytin V, Shakoor S, Mody M, Allen D, Garvey B, Freedman J. Sepsis- and endotoxemia-generated cytokines do not trigger activation of human platelets. *Crit Care Med*. 2002; 30: 2771-3.

Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30(12): 2341-49.

Lind L. Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003; 169(2): 203-14.

Lopes-Pires ME, Casarin A, Pereira-Cunha F, Lorand-Metze I, Antunes E, Marcondes S. Lipopolysaccharide treatment reduces rat platelet aggregation independently of intracellular reactive-oxygen species generation. *Platelets*. 2012; 23 (3): 195-201.

Lu N, Zhan M, Gao C, Wu G, Zhang H. I4, a new synthetic sulfonylurea compound, inhibits the action of TXA2 in vivo and in vitro on platelets and aorta vascular smooth muscle. *Thromb Res*. 2012; 130(4): e209-15.

Marcondes S, Cardoso MH, Morganti RP, Thomazzi SM, Lillas 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; 103(9): 3434-9.

Mark KS, Trickler WJ, Miller DW. Tumor necrosis factor-alpha induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 297(3): 1051-8.

Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 2003; 114(2): 181-90.

Misztal T, Rusak T, Tomasiak M. Peroxynitrite may affect clot retraction in human blood through the inhibition of platelet mitochondrial energy production. *Thromb Res*. 2014; 133(3): 402-11.

Moheimani F, Jackson DE. P2Y₁₂ receptor: platelet thrombus formation and medical interventions. *Int J Hematol*. 2012; 96(5): 572-87.

Montenegro MR, Bogliolo L. Artérias, Veias e Linfáticos. (Capítulo 15). In: Filho, GB; Pittela, JEH; Pereira, FEL; Bambirra, EA; Barbosa, AJA. *Bogliolo Patologia*. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1994 pg. 375.

Morganti RP. Efeito da incubação de enterotoxinas estafilocócicas e do lipopolissacáride na agregação e na adesão de plaquetas humanas [Dissertação de Doutorado]. Campinas, SP: UNICAMP; 2008.

Moro MA, Darley-Usmar VM, Goodwin DA, Read NG, Zamora-Pino R, Feelisch M, Rodomski MW, Moncada S. Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(14): 6702-6.

Moro MA, Russel RJ, Cellek S, Lizasoaini I, Su Y, Darley-Usmar VM, Rodomski MW, Moncada S. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996; 93(4): 1480-5.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2): 55-63.

- Nada S, Okada M, MacAuley A, Cooper JA, Nakagawa H. Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature*. 1991; 351(6321): 69-72.
- Nakahata N. Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*. 2008; 118: 18-35.
- Naseem KM. eNOS, iNOS or no NOS, that is the question! *J Thromb Haemost*. 2008; 6(8): 1373-5.
- Ognibene DT, Moss MB, Matsuura C, Brunini TM, de Moura RS, Mendes-Ribeiro AC, Resende AC. Characterization of the L-arginine-NO-cGMP pathway in spontaneously hypertensive rat platelets: the effects of pregnancy. *Hypertens Res*. 2010; 33(9): 899-904.
- 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.
- Okada M, Nakagawa H. A protein tyrosine kinase involved in regulation of pp60c-src function. *J Biol Chem*. 1989; 264(35): 20886-93.
- Okada M, Nada S, Yamanashi Y, Yamamoto T, Nakagawa H. CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases. *J Biol Chem*. 1991; 266(36): 24249-52.
- Otterdal K, Pedersen TM, Solum NO. Release of soluble CD40 ligand after platelet activation: studies on the solubilization phase. *Thromb Res*. 2004; 114(3): 167-77.
- Pawlinski R, Pedersen B, Kehrle B, Aird WC, Frank RD, Guha M, Mackman N. Regulation of tissue factor and inflammatory mediators by Egr-1 in a mouse endotoxemia model. *Blood*. 2003; 101(10): 3940-7.
- Perera PY, Mayadas TN, Takeuchi O, Akira S, Zaks-Zilberman M, Goyert SM, Vogel SN. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J. Immunol*. 2001; 166(1): 574-81.

Pignatelli P, De Biase L, Lenti L, Tocci G, Brunelli A, Cangemi R, Riondino S, Grego S, Volpe M, Violi F. Tumor necrosis factor- α as trigger of platelet activation in patients with heart failure. *Blood*. 2005; 106(6): 1992-4.

Pignatelli P, Cangemi R, Celestini A, Carnevale R, Polimeni L, Martini A, Ferro D, Loffredo L, Violi F. Tumour necrosis factor α upregulates platelet CD40L in patients with heart failure. *Cardiovasc Res*. 2008; 78(3): 515-22.

Piguet P F, Vesin C, Kan C D. Activation of platelet caspases by TNF and its consequences for kinetics. *Cytokine*. 2002; 18(4): 222-30.

Pólgar J, Lane WS, Chung SH, Houng AK, Reed GL. Phosphorylation of SNAP-23 in activated human platelets. *J. Biol. Chem*. 2003; 278(45): 44369-76.

Qiu P, Cui X, Barochia A, Li Y, Natanson C, Eichacker PQ. The evolving experience with therapeutic TNF inhibition in sepsis: considering the potential influence of risk of death. *Expert Opin Investig Drugs*. 2011; 20 (11): 1555-64.

Quinton TM, Brown KD, Dean WL. Inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca^{2+} release from platelet internal membranes is regulated by differential phosphorylation. *Biochemistry*. 1996; 35(21): 6865-71.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87(13): 5193-7.

Riba R, Oberprieler NG, Roberts W, Naseem KM. Von Willebrand factor activates endothelial nitric oxide synthase in blood platelets by a glycoprotein Ib-dependent mechanism. *J Thromb Haemost*. 2006; 4(12): 2636-44.

Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am*. 1992; 267(2): 54-61.

Rusak T, Tomasiak M, Ciborowski M. Peroxynitrite can affect platelet responses by inhibiting energy production. *Acta Biochim Pol*. 2006; 53(4): 769-76.

Russwurm S, Vickers J, Meier-Hellmann A, Spangenberg P, Bredle D, Reinhart K, Lösche W. Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock*. 2002; 17(4): 263-8.

Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MK, Dower SK. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J. Immunol*. 2002; 168(9): 4701-10.

Sanders DB, Larson DF, Hunter K, Gorman M, Yang B. Comparison of tumor necrosis factor-alpha effect on the expression of iNOS in macrophage and cardiac myocytes. *Perfusion*. 2001; 16(1): 67-74.

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.

Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol*. 2001; 62(9): 1153-61.

Senis YA, Mazharian A, Mori J. Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood*. 2014; 124(13): 2013-24.

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

Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological Reviews*. 2004; 56: 387-437.

Smolenski A. Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2012; 10(2): 167-76.

Somani AK, Bignon JS, Mills GB, Siminovich KA, Branch DR. Src kinase activity is regulated by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem*. 1997; 272(34): 21113-9.

Stalker TJ, Newman DR, Ma P, Wannemacher KM, Brass LF. Platelet Signaling. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer, 2012; 59-85.

Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. Tumor necrosis factor- α as a tumor promoter. 2006; 42(6): 745-50.

Texeira MM, Gristwood RW, Cooper N. Phosphodiesterase (PDE) 4 inhibitors: antiinflammatory drugs of the future? TIPS. 1997; 18: 164-170.

Thorphy TJ. Phosphodiesterase isozymes. Molecular targets for novel antiasthma agents. Am J Respir Crit Care Med. 1998; 157: 351-70.

Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. Annu Rev Cell Biol. 1993; 9: 317-43.

Van Den Berg M, Weyer S, Weening JJ, Roos D, Kuijpers TW. Divergent effects of tumor necrosis factor α on apoptosis of human neutrophils. J Leukoc Biol. 2001, 69(3): 467-73.

Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. Trends Cell Biol. 1995; 5(10): 392-9.

von Hundelshausen P, Schmitt MM. Platelets and their chemokines in atherosclerosis-clinical applications. Front Physiol. 2014; 5: 294.

Vuaden FC, Furstenau CR, Savio LE, Sarkis JJ, Bonan CD. Endotoxemia alters nucleotide hydrolysis in platelets of rats. Platelets. 2009; 20(2): 83-9.

Wang Y, Wu TR, Cai S, Welte T, Chin YE. Stat1 as a component of tumor necrosis factor α receptor 1-TRADD signaling complex to inhibit NF- κ B activation. Molecular and Cellular Biology. 2000; 20(13): 4505-4512.

Weber C. Platelets and Chemokines in Atherosclerosis. Partners in Crime. Circ. Res. 2005; 96: 612-16.

Yacoub D, Hachem A, Théorêt JF, Gillis MA, Mourad W, Merhi Y. Enhanced levels of soluble CD40 ligand exacerbate platelet aggregation and thrombus formation through a CD40-dependent tumor necrosis factor receptor-associated factor-2/Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(12): 2424-33.

Yoshida LS, Tsunawaki S. Expression of NADPH oxidases and enhanced H₂O₂-generating activity in human coronary artery endothelial cells upon induction with tumor necrosis factor- α . *Int Immunopharmacol.* 2008; 8(10): 1377-85.

Zelová H, Hosck J. TNF α Signaling and Inflammation: interactions between old Acquaintances. *Inflamm. Res.* 2013; 62(7): 641-51.

Zeuke S, Ulmer AJ, Kusumoto S, Katus HA, Heine H. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc. Res.* 2002; 56(1): 126-34.

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 Bio*

8. ANEXOS

8.1 Lista de Materiais

Substância	Procedência
ADP	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
ODQ	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
Anti-C-Src quinase	Merck Millipore
Anti-fosfo (Tyr 416)-c-Src	Merck Millipore
Anti β_3	Cell Signalling Technology
Anti-fosfo (Tyr 773)-β_3	Gene Tex
R7050	Calbiochem
TNFα	Biolegend
Fluo 3 AM	Life technologies
Trombina (humana)	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
Iloprost	Schering (Alemanha)