

Maria Elisa Lopes Pires

**MODULAÇÃO DA AGREGAÇÃO DE PLAQUETAS DE RATOS TRATADOS COM
LPS POR ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO**

Campinas

2009

Maria Elisa Lopes Pires

**MODULAÇÃO DA AGREGAÇÃO DE PLAQUETAS DE RATOS TRATADOS COM
LPS POR ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Sisi Marcondes Paschoal



Campinas

2009

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

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

P665m Pires, Maria Elisa Lopes
Modulação da agregação de plaquetas de ratos tratados com LPS
por espécies reativas de oxigênio / Maria Elisa Lopes Pires.
Campinas, SP : [s.n.], 2009.

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

1. Plaquetas (Sangue). 2. Lipopolissacarídeo. 3. Espécies
reativas de oxigênio. I. Paschoal, Sisi Marcondes. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

**Título em inglês : Modulation of platelet aggregation of rats treated with
LPS by reactive oxygen species**

Keywords: • Blood Platelets
• Lipopolyssacaride
• Reactive oxygen species

Titulação: Mestrado em Farmacologia

Banca examinadora:

Profª. Drª. Sisi Marcondes Paschoal

Profª. Drª. Lúcia Rosseti Lopes

Profº. Drº. Marcelo de Carvalho Ramos


Data da defesa: 27-08-2009

C2
1705

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Maria Elisa Lopes Pires

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

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Lucia Rossetti Lopes	
Professor (a) Doutor (a) Marcelo de Carvalho Ramos	<i>Marcelo de Carvalho Ramos</i>
Professor (a) Doutor (a) Sisi Marcondes Paschoal	<i>Sisi Marcondes Paschoal</i>

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/08/2009

200929188

Dedicatória

Aos meus pais, Sr. José Pires e Sra. Inês Vieira, que serão eternamente meu espelho de dedicação e inteligência, para quem devo todas as conquistas de minha vida... Ao amor, conforto e compreensão infinitos que sempre me proporcionaram.

Aos meus irmãos, Sílvia Helena e Luís Henrique, minhas companhias eternas das quais me sinto completa... Pelo carinho, alegria e pelas palavras verdadeiras que me fazem seguir em frente.

Aos amigos que acreditam no meu potencial e fortalecem-me dia após dia.

À dança, que faz de mim uma pessoa alegre, realizada e motivada... Que finaliza meus dias dando-me força e energia para iniciar novas jornadas.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Sisi Marcondes, minha querida orientadora, pelos ensinamentos técnico-científicos, pela compreensão, amizade e sabedoria;

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pelo apoio, pelo laboratório, amizade e por fazer-me acreditar na ciência;

À amiga Dra. Julia Franceschi, por guiar-me ao caminho certo;

Ao Dr. Matheus Marin, pelo exemplo de inteligência e por socorrer-me nos momentos de desespero;

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pelo laboratório e ensinamentos;

Aos meus colegas André, Camila e Nádia, que me ajudaram nos experimentos e com os quais eu desenvolvi uma grande amizade;

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Unicamp, Sr. Miguel, Marcos e José Ilton pela atenção, ajuda e paciência;

Aos colegas da “Bioquímica”, “Célula”, “Cascata” e “Edema” pelos ensinamentos e amizade;

À Carla, Fernanda, Rosângela e Profa. Dra. Irene Lorand-Metze do Hemocentro e Laboratório de Marcadores Celulares, pela preciosa ajuda nos experimentos de determinação de ROS;

Ao Prof. Dr. Roger Frigério, do Laboratório de Patologia Clínica, pelos ensinamentos sobre peroxidação lipídica.

*“A potência intelectual de um homem se mede pela dose de humor
que ele é capaz de usar”*

Friedrich Nietzsche

Sumário

LISTA DE MATERIAIS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1-INTRODUÇÃO.....	14
1.1-Septicemia e Lipopolissacarídeo.....	14
1.2-Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na sepse	16
1.3-Plaquetas.....	19
1.4-Plaquetas e sepse.....	20
1.5-Plaquetas e espécies reativas de oxigênio.....	22
1.6-OBJETIVOS.....	24
1.6.1-Objetivos específicos.....	24
2-MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.1-Animais.....	25
2.2-Tratamento com LPS e N-acetilcisteína.....	25
2.3-Obtenção de plaquetas lavadas.....	25
2.4-Contagem de plaquetas do sangue total.....	26
2.5-Contagem total e diferencial de leucócitos.....	26
2.6-Agregação plaquetária.....	26
2.7-Determinação de ROS por citometria de fluxo.....	26
2.8-Análise estatística.....	27
3-RESULTADOS.....	28
3.1- Efeito do LPS sobre o número de leucócitos e plaquetas em sangue periférico de Ratos.....	28
3.2- Efeito do tratamento de ratos com LPS na agregação plaquetária induzida por ADP	32
3.3-Efeito do tratamento de ratos com LPS sobre a liberação de ROS plaquetária.....	36

4-DISSCUSSÃO.....	40
5- CONCLUSÕES.....	44
6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

Lista materiais

Substância

Procedência

ADP	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
Catalase polietileno glicol	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
DCFH-DA	Sigma- Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
DPI	Sigma- Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
LPS	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
N-acetilcisteína	Sigma- Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
Superóxido desmutase polietileno glicol	Sigma- Aldrich (St. Luis, MO, EUA)

Lista de abreviaturas

ADP	Adenosina di-fosfato
Akt	Treonina proteína quinase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
CYP2C9	Isoforma do citocromo P450
DCFH-DA	2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato
DPI	Difeniliodônio
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
GC	Guanilil cilase
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GPIIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
LBP	Proteína ligante de LPS
LPS	Lipopolissacarídeo

MAPK	Proteína quinase ativadora de mitógeno
NAD(P)H oxidase	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo (fosfato) oxidase
NF-κB	Fator nuclear κB
NO	Óxido Nítrico
c-NOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
e-NOS	Óxido nítrico sintase endotelial
i-NOS	Óxido nítrico sintase induzível
n-NOS	Óxido nítrico sintase neuronal
O₂⁻	Ânion superóxido
OH[·]	Radical hidroxila
ONOO⁻	Peroxinitrito
PAF	Fator de ativação plaquetária
PI3K	Fosfatidilinositol 3- quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PLC	Fosfolipase C
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>

RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido desmutase
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TXA₂	Tromboxano A ₂
vWf	Fator de von Willebrand
XD	Xantina desidrogenase
XO	Xantina oxidase
XOR	Xantina óxido redutase

Lista de figuras

Figura 1: Efeito do LPS sobre o número de leucócitos em sangue periférico de ratos

Figura 2: Efeito do LPS sobre a porcentagem de neutrófilos e linfócitos em sangue periférico de ratos.

Figura 3: Efeito do LPS sobre o número de plaquetas em sangue periférico de ratos.

Figura 4: O tratamento de ratos com LPS inibiu, de maneira dependente do tempo, a agregação plaquetária induzida por ADP

Figura 5: Efeito da PEG-catalase, PEG-SOD e NAC na agregação plaquetária de ratos tratados com LPS.

Figura 6: Efeito do tratamento de ratos com NAC na agregação plaquetária de ratos injetados com LPS.

Figura 7: Efeito do tratamento de ratos com LPS na produção de ROS em plaquetas

Figura 8: Efeito da inibição da NAD(P)H oxidase na geração de ROS em plaquetas de ratos tratados com LPS

Figura 9: Efeito do tratamento de ratos com N-acetilcisteína (NAC) na geração de ROS em plaquetas de ratos injetados com LPS

Resumo

O LPS é capaz de ativar diferentes células, incluindo plaquetas, causando a liberação de mediadores inflamatórios como o óxido nítrico, interleucinas e espécies reativas de oxigênio (ROS). Vários trabalhos têm sido publicados sobre os efeitos do LPS sobre a reatividade plaquetária, mas os resultados ainda são conflitantes e os mecanismos envolvidos nas cascatas de sinalização desencadeada pelo LPS permanecem indefinidos. Portanto, utilizamos plaquetas isoladas de ratos tratados com LPS para investigar o papel das ROS na modulação da agregação plaquetária. Os ratos foram injetados com LPS (1 mg / kg, i.p.) e após, 2 a 72 h depois, a agregação plaquetária foi avaliada. As espécies reativas de oxigênio foram determinadas através da sonda 2', 7'-dichlorofluorescein diacetato (DCFH-DA). A agregação plaquetária induzida por ADP foi, tempo-dependente, reduzida 4 a 72 h após a injeção LPS, e este efeito inibitório foi aumentado quando plaquetas foram incubadas com PEG-SOD, PEG-catalase ou N-acetilcisteína (NAC). O tratamento de ratos com NAC (150 mg / kg i.p., 30 minutos após a injeção LPS) impediu a inibição da agregação plaquetária. A incubação de plaquetas de animais controle com LPS (100 e 300 µg/ml, 2 h) *in vitro* não afetou a produção de ROS. Nas plaquetas de ratos tratados com LPS, ativadas com ADP, a produção de ROS foi significativamente maior comparado com os ratos controle. Este aumento da produção de ROS foi significativamente reduzido quando as plaquetas foram incubadas *in vitro* com o inibidor da NADPH-oxidase (DPI). O tratamento de ratos com NAC impediu o aumento da produção de ROS pelo LPS. Como conclusão, a produção sistêmica de ROS em resposta ao tratamento *in vivo* de LPS desempenha um importante papel modulatório na agregação plaquetária.

Abstract

LPS activates different cells, including platelets, causing the release of inflammatory mediators like nitric oxide, interleukins and reactive oxygen species (ROS). It has been published several reports about the effects of LPS on platelet reactivity but the results are still conflicting and the mechanisms underlying the LPS signaling pathway remains unclear. Therefore, we have used platelets isolated from LPS-treated rats to investigate the role of ROS in modulating the platelet aggregation. Rats were injected with LPS (1 mg/kg, i.p.), and at 2 to 72 h thereafter, platelet aggregation was evaluated. Reactive-oxygen species was determined 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). ADP-induced platelet aggregation was time-dependently reduced at 4 to 72 h after LPS injection, and this inhibitory effect was augmented when platelets were incubated with PEG-SOD, PEG-catalase or N-acetylcysteine (NAC). Treatment of rats with NAC (150 mg/kg i.p., 30 min after LPS injection) prevented the inhibition of platelet aggregation. Incubation of control platelets with LPS (100 and 300 µg/ml, 2 h) *in vitro* did not affect the ROS production. In ADP-activated platelets of LPS-treated rats, ROS production was significantly higher compared with control rats. This increased ROS production was significantly reduced when platelets were incubated *in vitro* with the NADPH-oxidase inhibitor (DPI). Treatment of rats with NAC prevented the increased ROS production by LPS. In conclusion, systemic or in situ ROS production in response to *in vivo* LPS treatment plays an important modulatory role on platelet aggregation.

1. Introdução

1.1 Septicemia e Lipopolissacarídeo

Um dos problemas mais frequentes e mais sérios com que os clínicos se deparam é o controle das infecções que provocam uma resposta inflamatória sistêmica denominada septicemia (1).

Pesquisas recentes realizadas nos Estados Unidos mostram que 2 a 11% do total dos casos admitidos em hospitais são devido à sepse severa e que 30 a 60% desses casos evoluem a óbito (2). No Brasil, estudo publicado em 2004 mostrou que 61,4% dos pacientes internados em unidades de tratamento intensivo desenvolveram sepse, e 35,6% desenvolveram sepse grave (3). Em 2005, segundo dados do DATASUS (4)¹, ocorreram 54.365 internações para tratamento de sepse no SUS, representando aproximadamente 0,5% do total de internações, sendo que 38,02% destes pacientes vieram a óbito .

Normalmente a sepse é causada por uma infecção bacteriana, mas também pode ser causada por outros microorganismos como vírus e fungos (2). De modo geral, a sepse caracteriza-se por uma diminuição da atividade cardiocirculatória resultante da liberação descontrolada de cininas, prostaglandinas, citocinas e óxido nítrico (NO) e, além disso, ocorre também a redução simultânea do débito cardíaco. Dessa forma, há o colapso do sistema vascular, quadro denominado de choque séptico, que é caracterizado ainda por sinais bioquímicos de déficit de oxigênio, danos vasculares e coagulação intravascular disseminada. A diminuição da pressão arterial e da perfusão tecidual juntamente com a reação inflamatória acaba gerando danos funcionais nos sistemas renal, hepático e pulmonar, que podem culminar na disfunção múltipla de órgãos (5).

¹ <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/miuf.def>.

As bactérias gram-negativas mais comuns presentes na sepse severa e no choque séptico são a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Klebsiella* que desencadeiam a maior parte de seus efeitos através do lipopolissacáride (LPS) presente na parede desses organismos (2). Os lipopolissacarídeos, componentes estruturais exclusivos da membrana externa das bactérias gram-negativas, são glicolipídeos complexos constituídos de uma porção lipídica denominada lipídeo A, uma região do centro polissacarídeo que possui, em geral, estrutura similar dentro de um gênero ou espécie de bactéria, e cadeias laterais O-específicas que são regiões de estrutura bioquímica variável que conferem uma identidade sorológica única às espécies de gram-negativas. O lipídeo A parece ser o principal componente responsável pelas manifestações da atividade de endotoxina em pacientes com septicemia por bactérias gram-negativas (7, 8). O LPS pode ativar muitos tipos de células, incluindo leucócitos polimorfonucleares, monócitos, macrófagos, células endoteliais e plaquetas (9, 10,11, 12). O mecanismo molecular de ativação se dá pela ligação do LPS a molécula CD14 presente em macrófagos, monócitos e neutrófilos a qual pode ser facilitada pela proteína ligante de LPS (LBP) (13, 14). Uma vez que a molécula CD14 não possui domínio transmembrana a sinalização intracelular se dá através do receptor TLR (toll-like receptor), uma glicoproteína transmembrana expressa em leucócitos, linfócitos, endotélio vascular e plaquetas (12,15). Até agora, 11 membros da família TLR foram identificados em mamíferos e 13 em ratos(16)².

² <http://www.imgenex.com/Toll-likeReceptors.php>

O TLR4 é responsável pelo reconhecimento da maioria das bactérias gram-negativas. O complexo CD14/TLR leva a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) através de uma cascata de fosforilações desencadeada por uma família de quinases denominada proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (17). A ativação do NF- κ B está envolvida na ativação de inúmeros genes inflamatórios que codificam proteínas como citocinas, quimiocinas, proteínas de adesão e proteínas do sistema complemento (18).

1.2 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na Seps

O LPS causa várias respostas biológicas através da ativação de células específicas incluindo monócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares que são capazes de liberar quantidades excessivas de diferentes mediadores. Além da liberação de mediadores inflamatórios clássicos como citocinas, metabólitos do ácido araquidônico e o fator de ativação plaquetária (PAF), ocorre grande geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) (19).

Entre as espécies reativas de oxigênio podemos citar o radical ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$). O O_2^- e $\cdot OH$ são classificados como radicais livres devido à presença de um elétron desemparelhado em sua estrutura atômica, enquanto as demais espécies coletivamente são classificadas como ROS (20).

A produção do O_2^- ocorre mais comumente na mitocôndria. A cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria é a principal fonte de ATP nas células sendo, portanto, fundamental para a vida e é nesta etapa que ocorre o “escape” de elétrons com concomitante formação de O_2^- . (21). Na realidade 1-3% de todos os elétrons da cadeia de transporte de elétrons “escapam” para gerar o ânion superóxido ao invés de contribuir para a redução do oxigênio para a formação de água (22).

O H_2O_2 pode ser formado pela superóxido desmutase (SOD) e rapidamente degradado pela catalase e glutathione peroxidase (23). Ele é mais estável que os outros ROS e é permeável às membranas celulares (24, 25). Os peroxissomos produzem grande quantidade de H_2O_2 pela ação de oxidases envolvidas no catabolismo de aminoácidos e na oxidação de ácidos graxos (26). Essa organela também contém catalase, que decompõe H_2O_2 , prevenindo o acúmulo deste composto tóxico. Quando há danos nos peroxissomos, o consumo de H_2O_2 se torna prejudicado e sua liberação no citosol contribui significativamente para o estresse oxidativo (23, 27).

O radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) é altamente reativo e com meia-vida em solução aquosa de 1ns. O $\cdot\text{OH}$ pode ser gerado pela mieloperoxidase ou reações catalisadas pelo ferro. A reação de Fenton é uma das principais vias de geração de $\cdot\text{OH}$ *in vivo* através da oxidação de Fe^{+2} a Fe^{+3} e decomposição do H_2O_2 ($\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+3} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$). Além disso, em situações onde há grande produção de O_2^- , a via envolvendo a reação de Haber-Weiss pode contribuir significativamente para produção de $\cdot\text{OH}$ ($\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$) (28).

Já dentre as RNS podemos citar o óxido nítrico (NO). Este gás bastante lipossolúvel (29), apesar de menos reativo que o radical $\cdot\text{OH}$, pode reagir com o O_2^- formando outra espécie reativa de nitrogênio - o peroxinitrito (ONOO^-). O ONOO^- pode se decompor produzindo potentes oxidantes em tampão fisiológico (20). O NO é gerado biologicamente nos tecidos, juntamente com a L-citrulina, pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). A NOS oxida o nitrogênio do grupo guanidino do aminoácido L-arginina, com a formação de NO (30). As isoformas de NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS) e a NOS induzível (i-NOS). A c-NOS é dependente de íons cálcio e de calmodulina, produz pequenas quantidades de NO e está envolvida na sinalização celular (31, 32). A isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal (n-NOS, tipo I), presente normalmente nos neurônios (33, 34), e a NOS endotelial (e-NOS, tipo III), primeiramente descrita em células endoteliais vasculares (35). Por outro lado a i-NOS independente dos íons cálcio não é expressa sob condições normais, mas é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, como macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos e plaquetas (32). Na realidade, a presença de i-NOS em plaquetas é bastante questionável e recentemente Gambaryan et al mostraram que as plaquetas humanas e de camundongos não contêm i-NOS e nem mesmo e-NOS (36). A i-NOS requer algumas horas para ser expressa, mas, uma vez sintetizada, libera maiores quantidades de NO que a c-NOS e a produção deste continua indefinidamente até que a L-arginina ou os cofatores necessários para sua síntese sejam depletados ou ocorra a morte celular (37).

O NO é um radical reativo abundante que age como um importante sinalizador molecular oxidativo em uma diversidade de processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa, relaxamento do músculo liso, inibição da atividade plaquetária e regulação imunológica (38, 39). Seus efeitos biológicos são iniciados através da ativação da enzima heterodimérica guanilil ciclase solúvel (GCs) e /ou através de

outras reações químicas que independem dessa enzima (40). A ativação de GCs resulta na produção de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), um segundo mensageiro que inicia várias cascatas bioquímicas de sinalização (41, 42).

A superprodução de espécies reativas de nitrogênio é chamada de estresse nitrosativo (43, 44) e pode ocorrer quando o sistema excede sua capacidade de neutralizar e eliminar a concentração de RNS produzida. O estresse nitrosativo é capaz de levar às reações de nitrosilação e nitração que podem alterar a estrutura das proteínas e inibir sua função normal (27,45).

Uma variedade de enzimas nas células do sistema vascular é capaz de produzir ROS como a nicotinamida adenosina dinucleotídeo (fosfato) oxidase (NA(P)H-oxidase), mitocôndria, isoformas 1 e 2 da ciclooxigenase (COX), isoforma 2C9 do citocromo P450 (CYP2C9), xantinas oxidase (XO), xantina óxido redutase (XOR) e xantina desidrogenase (XD) (23). Evidências sugerem que a NAD(P)H oxidase é a principal fonte de geração de O_2^- (46, 47), sendo ela um complexo enzimático formado por proteínas que ficam entre a membrana e o citosol celular. Dentre as subunidades citosólicas, tem-se a p47^{phox}, p67^{phox} e p40^{phox} que interagem com a Rac, uma pequena proteína G. Já os componentes associados à membrana são gp91^{phox} e p22^{phox} que juntos formam o flavocitocromo b₅₅₈. A ativação da enzima envolve a fosforilação e a translocação dos componentes citosólicos para o flavocitocromo b₅₅₈. (48).

A exposição a radicais livres tem levado os organismos a desenvolverem uma série de mecanismos de defesa (49) como substâncias e enzimas antioxidantes. As enzimas de defesas antioxidantes incluem a superóxido desmutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). Os antioxidantes não enzimáticos são representados pelo ácido ascórbico (Vitamina C), o α -tocoferol (Vitamina E), a glutathione (GSH), carotenóides, flavonóides entre outros. Em condições normais, há um balanço entre os níveis intracelulares dos antioxidantes e esse balanço é essencial para a sobrevivência dos organismos e para a sua saúde (50).

Sob condições fisiológicas, ocorre um equilíbrio entre a formação de espécies reativas e a remoção destas substâncias por compostos antioxidantes e enzimas (51). Em alguns processos patológicos, como na sepse, há uma quebra neste equilíbrio podendo haver aumento excessivo da geração de espécies reativas e/ou redução dos mecanismos antioxidantes como a superóxido desmutase (SOD), catalase, vitaminas C e E e glutathione reduzida (GSH) (52). Este estado é chamado de estresse oxidativo e pode resultar em danos celulares e teciduais dependendo da intensidade e se ocorrer por tempo prolongado (53). A proporção entre glutathione reduzida

e oxidada (GSH/GSSG) é importante para a medida do estresse oxidativo no organismo. (50, 54). A redução de GSH indica uma diminuição na capacidade antioxidante da célula e é associada ao envelhecimento, diabetes melitus, inflamação e doenças neurodegenerativas (55, 56, 57).

Há várias evidências indicando a participação de ROS na patogênese da sepse levando a disfunção múltipla de órgãos (58, 52). Pacientes com sepse apresentam aumento da atividade da enzima xantina oxidase, bem como dos níveis plasmáticos de malondialdeído (marcador do stress oxidativo), quando comparado a indivíduos normais (59, 60). Em 1999, Salvemini et al (61) demonstraram que o O_2^- e o peroxinitrito têm um papel importante na injúria intestinal observada durante a endotoxemia. Recentemente, foi demonstrado que a N-acetilcisteína, uma substância sequestradora de ROS, inibe o aumento da expressão de TNF-alfa em cardiomiócitos, a qual está intimamente relacionada à falência cardíaca observada na sepse (62).

Em resposta ao LPS a enzima NAD(P)H oxidase é ativada e produz alta quantidade de ROS que altera as funções celulares, podendo levar a morte celular (63). A produção de ROS pela NAD(P)H oxidase tem demonstrado contribuir para várias doenças cardiovasculares como hipertrofia cardíaca, hipertensão e aterosclerose (64, 65, 66, 67). Na sepse, a NAD(P)H oxidase ativada em neutrófilos induz os danos pulmonares (68, 69). No coração, a atividade da NAD(P)H oxidase e a liberação de ROS são aumentados em resposta ao LPS (70, 71). Wu et al (63) verificaram que LPS e $INF\gamma$ induzem a atividade da enzima e a expressão da $p47^{phox}$ em células endoteliais microvasculares.

1.3 Plaquetas

Plaquetas são pequenos fragmentos de megacariócitos anucleados de 2-3 μ m de diâmetro e estão numa concentração de 150.000-350.000 células/ μ l de sangue. Estes elementos são indispensáveis para a hemóstase fisiológica e para a trombose patológica, além de participar em processos inflamatórios (72, 73). As plaquetas, além de possuírem organelas comuns às outras células, também 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 (74).

Quando ativadas, as plaquetas, além de liberarem o conteúdo granular para o meio externo, elas sintetizam e liberam o tromboxano A_2 (TXA₂) (75) e o fator de ativação plaquetária (PAF) (76), dois mediadores conhecidos pela capacidade de amplificar a ativação plaquetária.

De modo geral, a ativação plaquetária se dá através de uma seqüência de sinalização denominada *inside-out* e *outside-in*. A primeira compreende a ligação de um agonista ao seu receptor específico, que por sua vez, está ligado à proteína G, levando a ativação da fosfolipase C (PLC) e, conseqüentemente, ao aumento de Ca^{+2} intracelular e ativação de uma série de enzimas dependentes deste íon (77, 78). Esta cascata de sinais intracelulares é a responsável pela conversão do receptor de fibrinogênio, integrina $\alpha IIb\beta 3$, do estado de baixa afinidade para o de alta afinidade, permitindo assim a ligação do seu ligante. A integrina $\alpha IIb\beta 3$ é responsável pela ligação das plaquetas ao fibrinogênio, fator de von Willebrand (vWf), vitronectina e fibronectina. Após a ligação da integrina $\alpha IIb\beta 3$ ao seu ligante, inicia-se a segunda etapa de sinalização denominada *outside-in*, responsável pela segunda onda de agregação e reorganização do citoesqueleto, sendo esta importante para a firme adesão bem como para a estabilização dos grandes agregados de plaquetas (79).

A agregação plaquetária pode ser induzida por vários agonistas fisiológicos como a adenosina difosfato (ADP), trombina, TXA₂ e colágeno (79, 80, 81) e é fortemente modulada por substâncias bastante conhecidas como a prostaciclina (PGI₂) e o NO que inibem a ativação plaquetária através do aumento de AMPc e GMPc, respectivamente (82, 83)

O ADP é um agonista bastante estudado e leva à ativação plaquetária através da interação com dois subtipos de receptores – o P2Y₁ e P2Y₂ (84). O receptor P2Y₁, classificado como receptor acoplado a proyeína G (GPCRs), está acoplado a proteína G_q e é essencial para a indução da mudança de forma plaquetária e agregação (85). A estimulação de receptores P2Y₁ leva a ativação da fosfolipase C β_2 (PLC β_2), responsável por regular a produção de trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG) levando a liberação de cálcio do sistema tubular denso e a ativação da proteína quinase C (PKC) (86). Já o receptor P2Y₁₂ acoplado à proteína G_{i2}, levando à inibição da adenilil ciclase e conseqüentemente, redução da concentração de AMP_c citosólico. Além disso, o receptor P2Y₁₂ leva a ativação da fosfoinositídeo-3-quinase (PI3-K), Akt/proteína quinase B, Rap1b e Src tirosina quinase (87, 88). Além disso, a cascata de sinalização desencadeada pela ligação do ADP aos receptores P2Y₁ e P2Y₁₂ leva à ativação do receptor de fibrinogênio e geração de TXA₂ (84).

1.4 Plaquetas e sepse

O evento que ocorre mais precocemente na fase inicial da endotoxemia é a diminuição significativa do número de leucócitos e plaquetas no sangue periférico. Um estudo clínico demonstrou que já na primeira hora após a administração endovenosa de LPS em voluntários sadios há uma queda de 15% do número de plaquetas circulantes (89). Alguns trabalhos especulam que a queda de plaquetas no sangue periférico se deve ao acúmulo destes elementos em certos órgãos como pulmão e fígado. A injeção de LPS em camundongos causa, ao mesmo tempo, diminuição do número de plaquetas circulantes e acúmulo desses elementos no fígado e pulmão, sendo que neste último encontram-se retidos cerca de 80% das plaquetas perdidas da circulação (90). Em humanos, o número de plaquetas acumuladas em órgãos periféricos e o grau de ativação destas plaquetas, determinado através da expressão de proteínas presentes na membrana plaquetária como a CD62P e o receptor de fibrinogênio GP (IIb-IIIa), apresentam correlação positiva com a severidade da sepse e, por conseguinte, com o desenvolvimento da disfunção múltipla de órgãos (91, 92).

Vários efeitos do LPS, apesar de bastante controversos, têm sido observados em plaquetas, no entanto, somente em 2005 foi descrito pela primeira vez a presença do receptor funcional de LPS – “toll-like receptor-4” – nestes elementos (12).

O LPS derivado da bactéria *Proteus mirabilis*, de modo geral, leva à ativação plaquetária. A incubação de LPS com plaquetas de porco por 2 min já é capaz de induzir a liberação do conteúdo dos grânulos densos e alfa, bem como de levar à geração de ânion superóxido e síntese de TXA₂ (93, 94, 95). O aumento da síntese de TXA₂ também foi observado quando plaquetas humanas foram incubadas com LPS proveniente de *P. mirabilis*; entretanto, este aumento foi detectado somente após 3 h de incubação (96). Um trabalho recente mostrou que a incubação de plaquetas humanas com LPS de *P. mirabilis* causou aumento significativo dos níveis de nitrato e nitrito, metabólitos estáveis do NO, acompanhado de aumento discreto, mas significativo, da nitração de proteínas (97). Em estudos de adesão plaquetária *in vitro*, o LPS de *P. mirabilis* induziu aumento da adesão espontânea de plaquetas ao colágeno, mas curiosamente, inibiu a adesão de plaquetas estimuladas por trombina (98, 99).

Experimentos *in vivo* de microscopia intravital mostraram que o LPS de *E. coli* aumenta a adesão de plaquetas a vênulas de intestino de camundongo (100), entretanto este efeito parece ser

mediado por neutrófilos através da liberação de ânion superóxido (101). Outro grupo de pesquisadores também demonstrou que o LPS de *E. coli* é capaz de aumentar a adesão plaquetária em vênulas de mesentério de ratos através do efeito direto da endotoxina aumentando a expressão da P-selectina do endotélio e da GP Ib α da membrana plaquetária (102).

Por outro lado, a agregação de plaquetas humanas e de coelho induzida por colágeno é inibida, de forma dependente da concentração, por LPS de *Escherichia coli*, sendo este efeito acompanhado de aumento de GMPc, inibição da mobilização de Ca⁺² intracelular e inibição da ativação da proteína C quinase (103, 104). A incubação de plaquetas com endotoxinas de várias origens também inibe a agregação plaquetária induzida pelo ionóforo de Ca⁺⁺, A23187, mas não apresenta nenhum efeito na aglutinação plaquetária induzida pela ristocetina (105). E ainda, pacientes com sepse apresentaram diminuição da agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno, tromboxano e ácido araquidônico (106). Por outro lado, Zhang et al (107) mostraram que o LPS de *E.coli* estimula a secreção dos grânulos densos e alfa de plaquetas humanas, bem como potencializa a agregação induzida por trombina e colágeno em baixas concentrações.

1.5 Plaquetas e espécies reativas de oxigênio

O primeiro estudo mostrando que as plaquetas liberam ROS foi feito por Marcus et al (108) em 1977. Alguns autores sugerem que, assim como os neutrófilos, o ROS derivado de plaquetas está envolvido no mecanismo de defesa e contribuem para a morte de parasitas e bactérias (109).

Semelhante a outras células do organismo, as plaquetas possuem diversas fontes enzimáticas de produção de ROS como cicloxigenase (COX), xantina oxidase (XO), CYP2C9, cadeia de transportes de elétrons e a NAD(P)H oxidase, sendo que esta última tem ganhado maior atenção por ser ativada por agonistas que também induzem a ativação plaquetária como o colágeno e ácido araquidônico (23,110). As primeiras evidências de expressão de NA(P)H-oxidase em plaquetas surgiram em 2001 por Seno et al (111), que detectaram as subunidades p22^{phox} e p67^{phox} em plaquetas lisadas humanas. Mais tarde, foram encontradas as isoformas gp91^{phox} e p47^{phox} (112). Sabe-se que a ativação plaquetária esta associada à ativação da subunidade gp91^{phox} da enzima (113). O colágeno também induz a liberação de ânion superóxido pela NA(P)H-oxidase de plaquetas que por sua vez aumenta a liberação de ADP, resultando no aumento de recrutamento de plaquetas. (23).

Mais recentemente, vários trabalhos têm sugerido que as ROS podem ter um papel modulatório na atividade plaquetária (114). O O₂⁻ pode aumentar a agregação induzida por trombina,

colágeno, ADP ou ácido araquidônico (115). Já foi demonstrado também que a produção de ROS aumenta a ativação do receptor de fibrinogênio em plaquetas (112). O inibidor da NA(P)H-oxidase e o seqüestrador de ânion superóxido também reduzem a agregação plaquetária e a deposição de colágeno no trombo (116).

Além disso, a SOD, ao diminuir a disponibilidade de superóxido, promove o aumento de NO plaquetário e assim a inibição da agregação, indicando que o superóxido pode modular a ação inibitória do NO na agregação plaquetária (117).

1.6 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o envolvimento das espécies reativas de oxigênio na modulação da agregação de plaquetas de ratos tratados com LPS.

1.6.1 Objetivos Específicos

- Determinar os efeitos do tratamento de ratos com LPS em diferentes intervalos de tempo (2-72h) na agregação plaquetária induzida por ADP;
- Determinar os efeitos da incubação de plaquetas de ratos tratados com LPS com os sequestradores de O_2^- (SOD) e H_2O_2 (catalase) e também com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) na agregação plaquetária;
- Determinar os efeitos do tratamento de ratos com LPS na liberação de ROS em plaquetas na presença e na ausência do inibidor da NAD(P)H oxidase – DPI;
- Determinar os efeitos do tratamento de ratos com a NAC na agregação e na produção de ROS em plaquetas de ratos injetados com LPS;
- Verificar a ação do LPS *in vitro* sobre a liberação de ROS em plaquetas;

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, pesando 250-340g, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - Unicamp). Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP, protocolo nº 1056-1. Os animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia (Faculdade de Ciências Médicas), onde foram mantidos a 24°C, com iluminação diária de 12 h e com água e alimentação *ad libitum*.

2.2 Tratamento de ratos com LPS e N-acetilcisteína

Ratos Wistar machos (270-340g) receberam uma única injeção de solução de LPS de *Escherichia coli* (1mg/Kg, i.p.). Após 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72h do tratamento com LPS os animais foram anestesiados com isoflurano e uma incisão longitudinal no abdômen foi feita para a coleta de sangue arterial obtido do ramo descendente da artéria aorta. Ratos controles receberam uma injeção i.p. de solução fisiológica de mesmo volume que aqueles tratados com LPS. Em um terceiro grupo experimental, o antioxidante N-acetilcisteína (150 mg/kg i.p.) foi injetado em ratos 30 min após a injeção de LPS ou salina.

2.3 Obtenção de plaquetas lavadas

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

utilizando-se câmara de Neubauer. Ao final, foi adicionado cloreto de cálcio à suspensão plaquetária para uma concentração final de 1mM.

2.4 Contagem de plaquetas do sangue total

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

2.5 Contagem total e diferencial de leucócitos

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

2.6 Agregação plaquetária

400µl de suspensão plaquetária foi transferida para a cubeta de agregação e levada ao agregômetro de 2 canais (Chrono-log Lumi-Aggregometer model 560-Ca, Havertown, PA, EUA). O aparelho foi calibrado para 0% (suspensão de plaquetas lavadas) e 100% (solução de Krebs-Ringer). Em seguida a agregação foi induzida por ADP (3-10 µM) e monitorada por 10 min. Em alguns experimentos as plaquetas foram incubadas com PEG-SOD (30U/ml), PEG-Catalase (1000U/ml) ou NAC (100µM) por 5 min antes da adição de ADP 5µM.

2.7 Determinação de ROS por citometria de fluxo

A determinação dos níveis de ROS em plaquetas foi realizada como descrito por Swith e Weidemann, 1993 (118).

Foram realizados dois tipos de experimentos: com LPS *in vitro* e *in vivo*.

In vitro: a suspensão de plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaq/ml) foi incubada com LPS (100 ou 300µg/ml) por 2h e após foi adicionado 5µM de 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA). A suspensão plaquetária (500µl) foi transferida para os tubos de citometria.

In vivo: à suspensão de plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaq/ml) foi adicionado 5µM de 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA). A suspensão plaquetária (500µl) foi transferida para os

tubos de citometria e incubada ou não com ADP (20 μ M) por 20 min. Em algumas amostras, as plaquetas foram pré-incubadas com DPI (10 μ M) por 15 min antes da adição do DCFH-DA.

Em seguida, tanto nos experimento *in vitro* quanto *in vivo*, as suspensões plaquetária foram cetrifugadas a 800g em temperatura ambiente por 10 min. Os sobrenadantes foram desprezados e o pellet plaquetário ressuspenso em 500 μ l de solução de Krebs-Ringer. Uma amostra contendo somente a suspensão plaquetária, na ausência de DCFH-DA, foi utilizada como controle negativo, enquanto que o controle positivo foi realizado adicinando-se H₂O₂ (8mM) à suspensão. A liberação de ROS foi quantificada usando um citômetro de fluxo (FACSCalibur Becton Dickinson, NJ, EUA) equipado com 488nm wavelength argon laser, 525 e 575nm band pass filters. As plaquetas foram identificadas pelos sinais *forward and side scatter*. Dez mil eventos específicos plaquetários foram analisados pelo citômetro. Plaquetas ativadas (ou não) foram selecionadas para não analisar agregados plaquetários ou micropartículas

2.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias (EPM) de *n* experimentos. Diferenças estatísticas significativas foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni. O teste *t* de Student não-pareado foi usado para comparar grupos específicos quando apropriado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3. Resultados

3.1 Efeito do LPS sobre o número de leucócitos e plaquetas em sangue periférico de ratos

A figura 1 mostra que o número total de leucócitos do sangue periférico de ratos 2, 4 e 6h após o tratamento com LPS (1mg/Kg, i.p.) está significativamente reduzido em relação ao controle, sendo a maior redução observada após 6h (60%). Por outro lado, o LPS causou um aumento significativo do número de leucócitos totais nos tempos de 12, 24, 48 e 72h (10, 66, 70 e 39% de aumento em relação ao controle, respectivamente). A contagem diferencial de leucócitos mostrou que a porcentagem de neutrófilos 2-48h após o tratamento dos ratos com LPS aumentou significativamente em relação ao controle, enquanto que a porcentagem de linfócitos foi significativamente reduzida (fig. 2A e 2B). Já a porcentagem de neutrófilos e linfócitos não foi modificada 72h após a infecção de LPS (fig. 2A e 2B). Na contagem diferencial dos leucócitos não foi observado a presença de monócitos ou eosinófilos no sangue de ratos controles ou tratados com LPS.

Conforme mostra a figura 3, há uma redução significativa no número de plaquetas em ratos tratados com LPS nos tempos de 4-72h sendo esta redução mais pronunciada nos tempos de 6, 8, 12 e 24h (57, 67.5, 69 e 85% de redução com relação ao controle, respectivamente). Cabe ressaltar que o número de plaquetas 2h após a injeção com LPS não está alterado com relação ao controle.

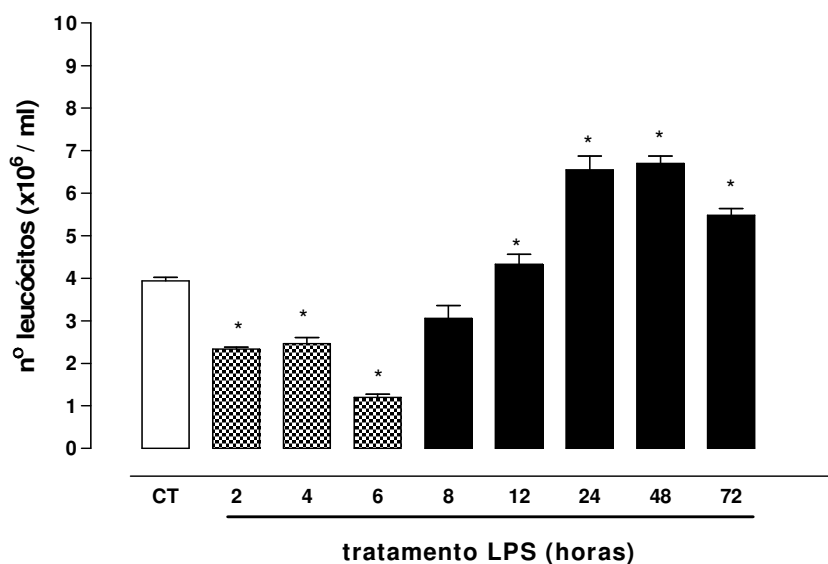


Figura 1: Efeito do LPS sobre o número de leucócitos em sangue periférico de ratos. A contagem de leucócitos totais foi realizada no sangue periférico de ratos 2-72h após a injeção de LPS (1mg/Kg, i.p.). Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. provenientes de 3-5 animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (CT)

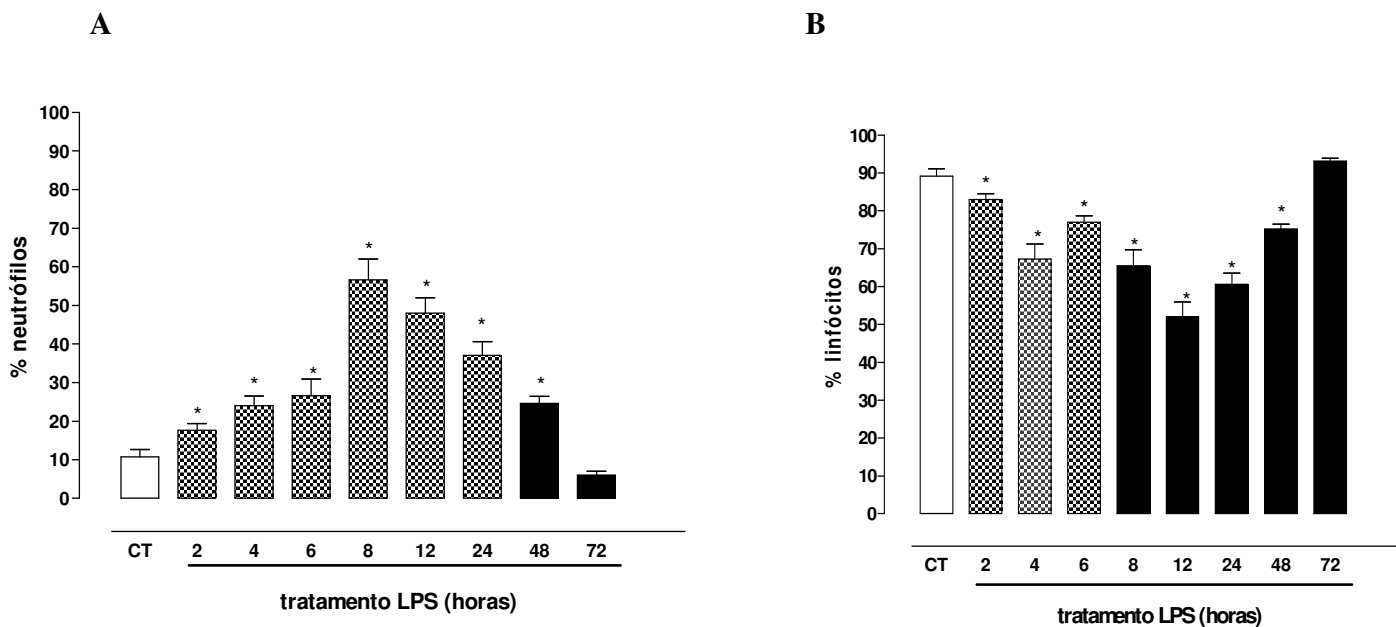


Figura 2: Efeito do LPS sobre a porcentagem de neutrófilos e linfócitos em sangue periférico de ratos. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada no sangue periférico de ratos 2-72h após a injeção de LPS (1mg/Kg, i.p.). O painel A mostra a porcentagem de neutrófilos e o painel B a porcentagem de linfócitos. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. provenientes de 3-5 animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (CT).

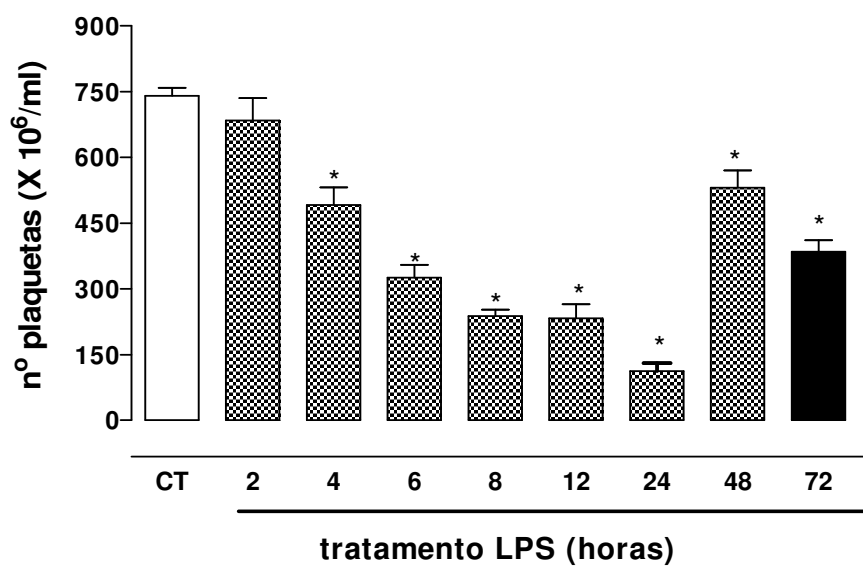


Figura 3: Efeito do LPS sobre o número de plaquetas em sangue periférico de ratos. A contagem de plaquetas foi realizada no sangue periférico de ratos 2-72h após a injeção de LPS (1mg/Kg, i.p.). Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. provenientes de 3-5 animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (CT)

3.2 Efeito do tratamento de ratos com LPS na agregação plaquetária induzida por ADP

A agregação de plaquetas de ratos 4-72h após a injeção com LPS induzida por ADP (3-10 μ M) foi significativamente reduzida com relação ao controle (figura 4), enquanto que em 2h somente a agregação induzida por baixa concentração de ADP (3 μ M) apresentou-se reduzida (18% de redução comparada ao controle). A agregação plaquetária de ratos 24h após a exposição ao LPS não foi realizada, pois não foi obtido número de plaquetas suficiente para a realização do experimento.

A incubação de plaquetas controles com PEG-catalase (1000u/ml) por 5 min reduziu significativamente a agregação induzida por ADP 5 μ M (figura 5). Da mesma forma, a PEG-SOD (30u/ml) reduziu de forma marcante (58%) a agregação de plaquetas dos ratos controles (figura 5). O efeito inibitório do LPS em 6, 8 e 48h foi aumentado quando as plaquetas foram incubadas *in vitro* com PEG-SOD ou PEG-catalase (agregação 6h após o tratamento com LPS: 25 \pm 12%, 2 \pm 2% e 4 \pm 3%, para os grupos controle, na presença de PEG-SOD ou na presença de PEG-catalase, respectivamente; figura 5). A agregação de plaquetas de ratos controles incubadas *in vitro* com NAC (100 μ M) foi similar a agregação na ausência do antioxidante. Assim como observado no grupo controle, NAC não afetou a agregação plaquetária de ratos 6h após o tratamento com LPS. Entretanto, a incubação *in vitro* de NAC em plaquetas de ratos 6 e 48h após a injeção com LPS aumentou significativamente o efeito inibitório do LPS (figura 5).

Por outro lado, a injeção de ratos com NAC (150mg/Kg, i.p.) 30 min após o tratamento com LPS (4-72h), reverteu a inibição da agregação plaquetária causada pelo LPS (figura 6 A e B). A agregação plaquetária foi da mesma magnitude em ratos controles tratados e não tratados com NAC (figura 6 B)

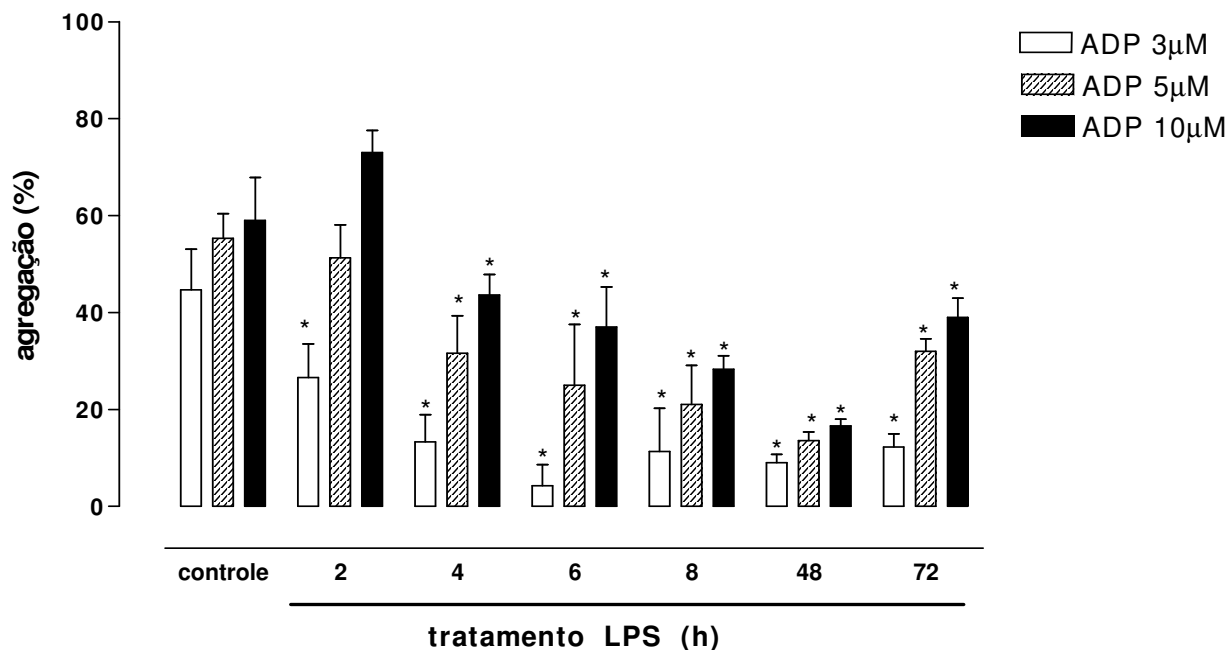


Figura 4: Agregação de plaquetas de ratos tratados com LPS induzida por ADP. Ratos foram injetados com LPS (1mg/Kg,i.p.) e após 2-72h o sangue foi coletado. As plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foram estimuladas com ADP (3-10 μ M). Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. provenientes de 3-5 animais por grupo. * P < 0,05 comparado ao grupo controle em suas respectivas concentrações.

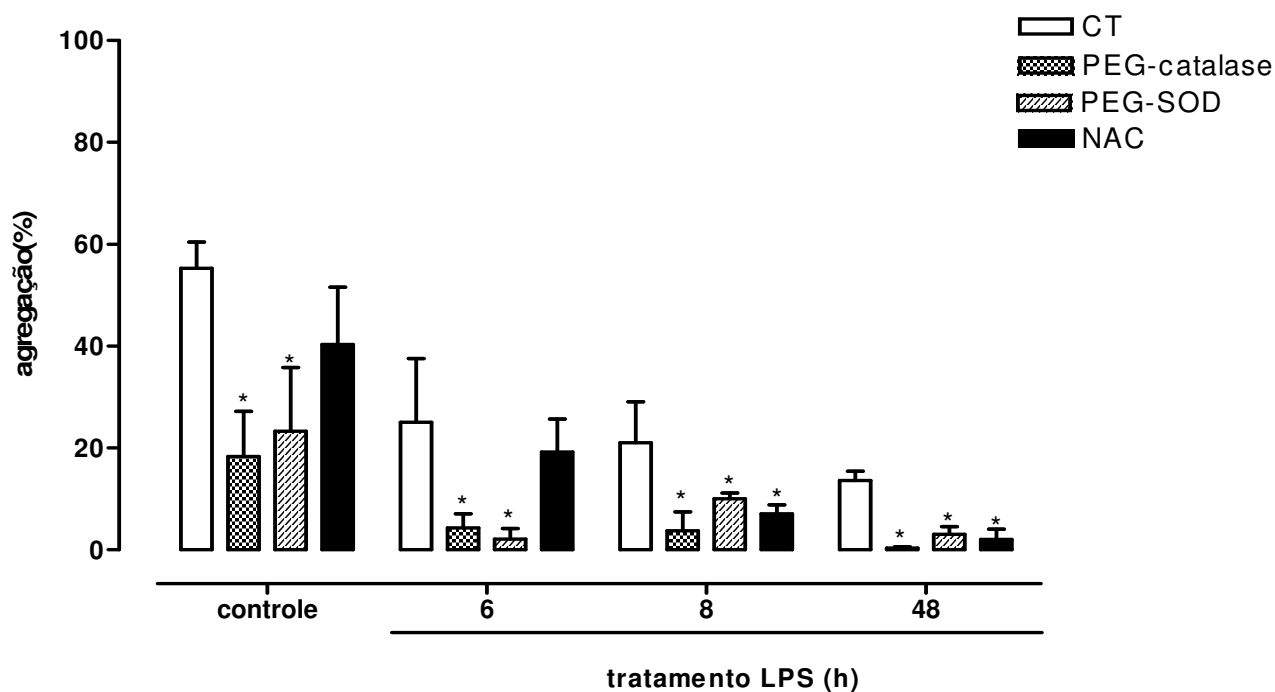


Fig. 5: Efeito da PEG-catalase, PEG-SOD e NAC na agregação plaquetária de ratos tratados com LPS. Os ratos foram injetados com LPS (1mg/Kg, i.p.) e após 6, 8, e 48h o sangue foi coletado. As plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foram incubadas com PEG-catalase (1000u/ml), PEG-SOD (30u/ml) ou NAC (1000 μ M) por 5 min antes da adição de ADP (5 μ M). Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. provenientes de 3-5 animais por grupo. * P < 0,05 comparado com o respectivo conrole.

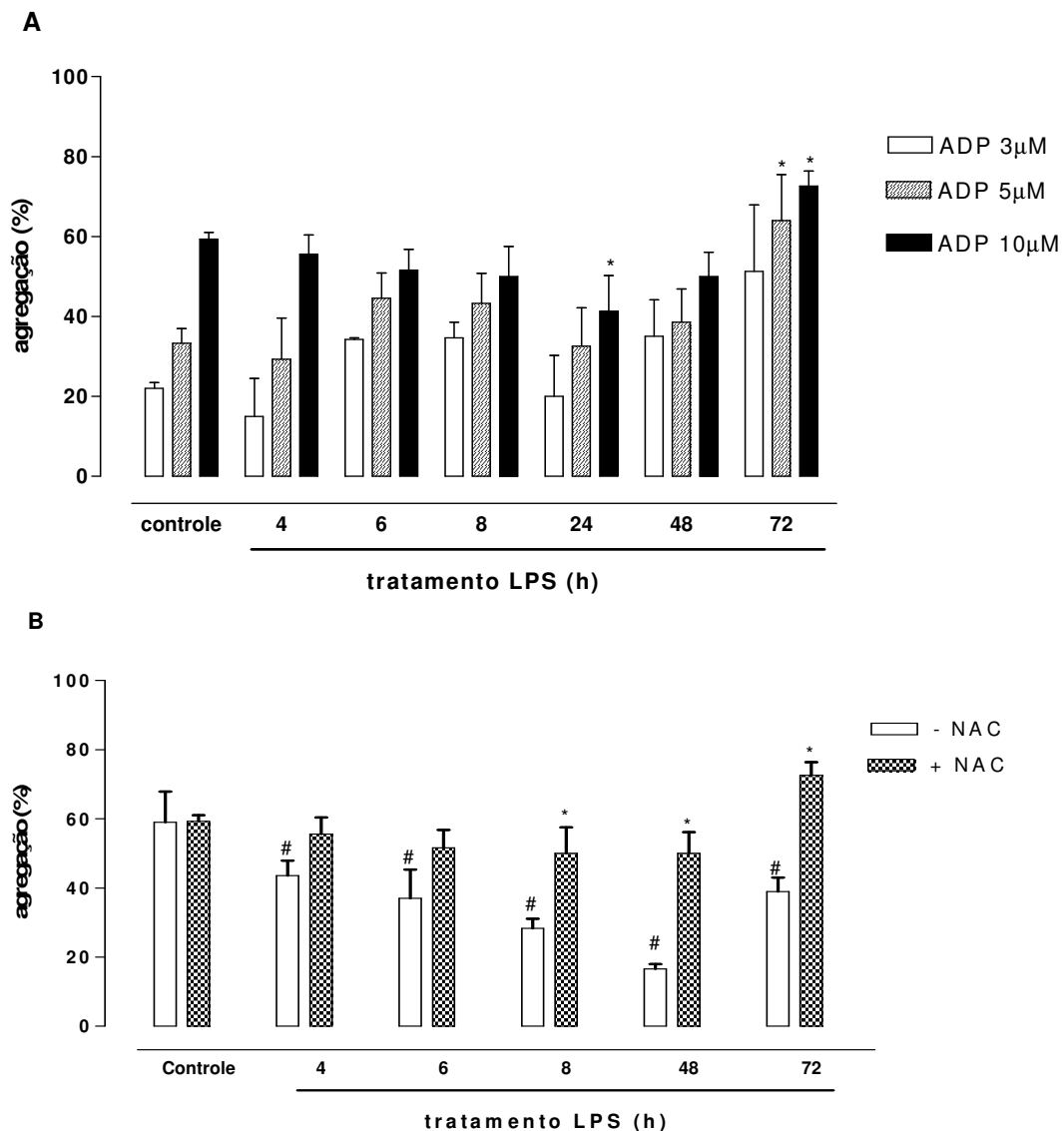


Figura 6: Efeito do tratamento de ratos com NAC na agregação plaquetária de ratos injetados com LPS. Os ratos foram tratados com NAC (150mg/Kg, i.p.) 30 min após a injeção com LPS (1mg/Kg, i.p.). O sangue foi coletado 4-72h após a injeção de LPS e a agregação plaquetária foi induzida por ADP (3-10μM). (A) Agregação plaquetária de ratos tratados com NAC na presença ou na ausência de LPS. (B) Comparação da agregação de plaquetas de ratos controles, bem como de ratos injetados com LPS, na presença ou na ausência de NAC. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. provenientes de 3-5 animais por grupo. * P < 0,05 comparado ao grupo controle.

3.3 Efeito do tratamento de ratos com LPS sobre a liberação de ROS plaquetária

A incubação *in vitro* de plaquetas com LPS (100 e 300µg/ml) por 2 h não aumentou a geração de ROS em plaquetas não ativadas ou em plaquetas estimuladas com ADP 20µM (figura 7 A). Entretanto, o tratamento de ratos com LPS em 6, 8 e 48h aumentou significativamente a liberação de ROS em plaquetas estimuladas por ADP (aumento de 2.3, 2.5 e 3.6 vezes a quantidade liberada de ROS em 6, 8 e 48h comparado ao controle, respectivamente) (figura 7B). Entretanto, o tratamento de ratos com LPS não aumentou a liberação de ROS de plaquetas não ativadas. A fim de verificarmos a origem da liberação de ROS em plaquetas de ratos tratados com LPS, incubamos as plaquetas com DPI, um inibidor da NAD(P)H oxidase. A figura 8 mostra que a incubação de plaquetas de ratos 8 e 48h após a injeção com LPS com DPI (10µM) por 15min reduziu significativamente a produção de ROS em plaquetas ativadas com ADP 20µM (redução de 28 e 60% em ratos tratados com LPS 8 e 48h, respectivamente). Entretanto, a geração de ROS em plaquetas de ratos tratados 6h após a injeção com LPS não foi reduzida pela incubação com DPI. O tratamento de ratos com NAC (15mg/Kg, i.p.) reduziu significativamente a produção de ROS em plaquetas ativadas de ratos 8 e 48h após a injeção com LPS enquanto que em 6h a mesma não foi modificada (figura 9). O tratamento de ratos controles com NAC não interferiu na geração de ROS em plaquetas ativadas com ADP 20 µM.

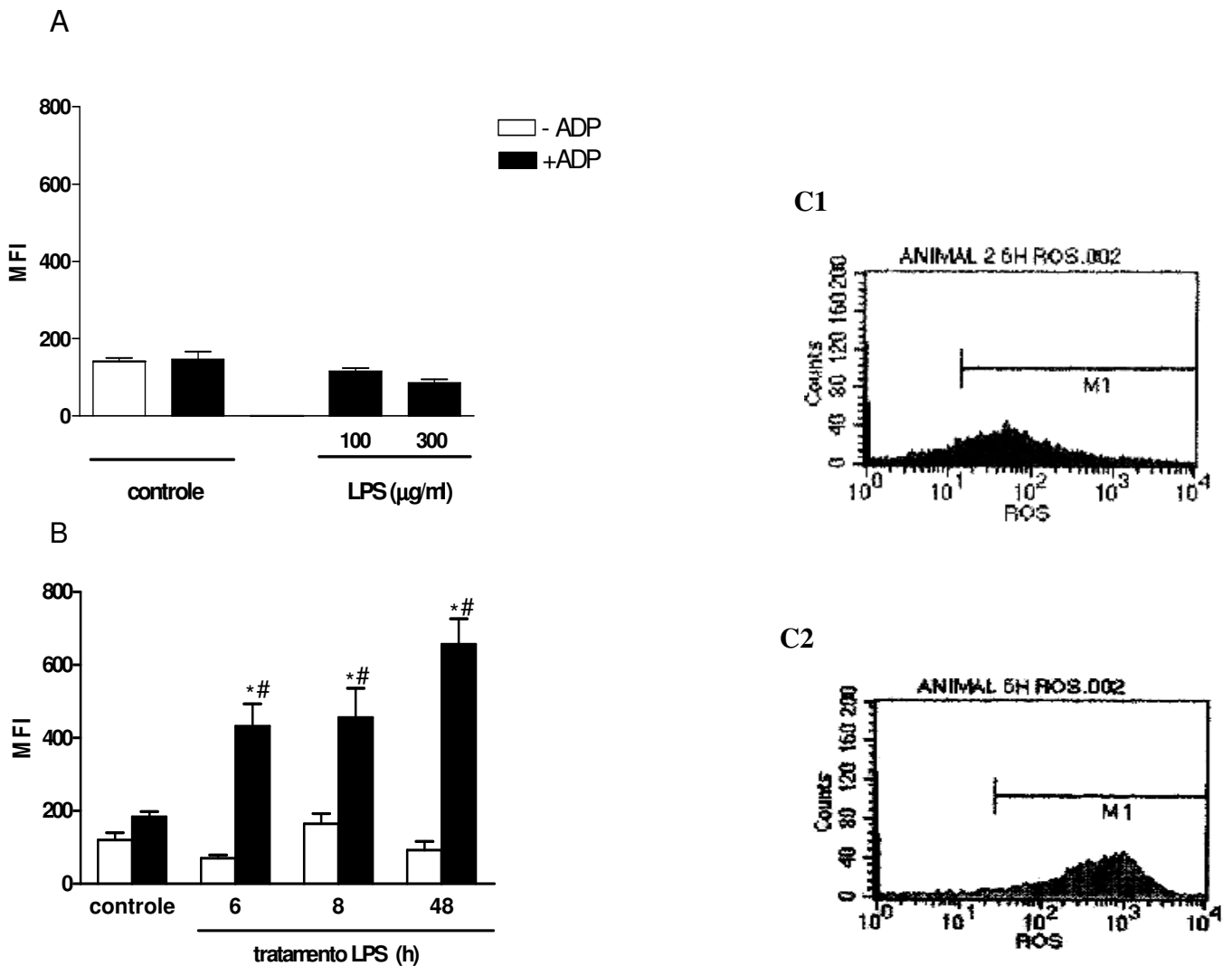


Figura 7: Efeito do tratamento de ratos com LPS na produção de ROS em plaquetas

(A) As plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foram isoladas de ratos controles e incubadas com LPS (100 e $300 \mu\text{g/ml}$) por 2h. A produção de ROS foi quantificada por citometria de fluxo utilizando-se DCFH-DA em plaquetas não estimuladas e estimuladas com ADP $20 \mu\text{m}$. (B) Os ratos foram injetados com LPS (1mg/Kg , i.p.) e após 6, 8 e 48h o sangue foi coletado. A produção de ROS foi quantificada em plaquetas não ativadas e ativadas com ADP $20 \mu\text{m}$. (C1) Traçado representativo da produção de ROS por citometria de fluxo em plaquetas não ativadas e (C2) ativadas com ADP $20 \mu\text{m}$ de ratos tratados com LPS. Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. provenientes de 3-4 animais por grupo. # $P < 0,05$ comparando com o respectivo controle de ratos não tratados com LPS. * $P < 0,05$ comparado com o respectivo controle de ratos injetados com LPS. MFI=Índice de Fluorescência Média

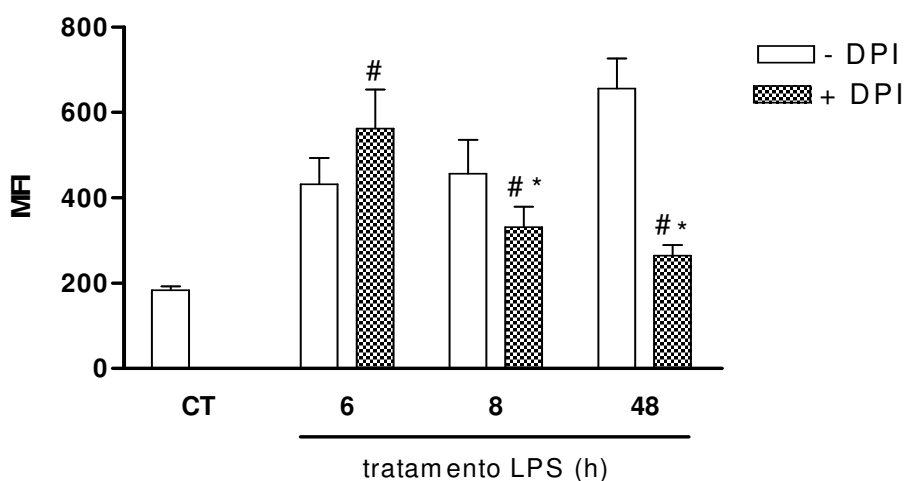


Fig. 8: Efeito da inibição da NAD(P)H oxidase na geração de ROS em plaquetas de ratos tratados com LPS. Os ratos foram injetados com LPS (1mg/Kg, i.p.) e após 6, 8 e 48h o sangue foi coletado. Plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foram incubadas com DPI $10 \mu\text{M}$ por 15 min e a geração de ROS foi quantificada após a adição de ADP $20 \mu\text{M}$. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. provenientes de 3-5 animais por grupo. [#] $P < 0,05$ comparado com ratos controles. ^{*} $P < 0,05$ comparado com o respectivo controle de ratos injetados com LPS. MFI=Índice de Fluorescência Média.

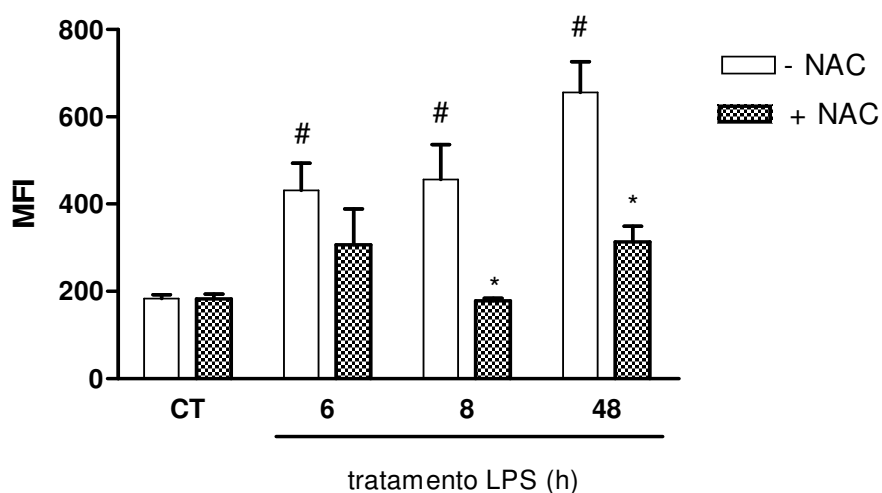


Fig. 9: Efeito do tratamento de ratos com N-acetilcisteína (NAC) na geração de ROS em plaquetas de ratos injetados com LPS. Os ratos foram tratados com NAC (150mg/Kg, i.p.) 30 min após a injeção com LPS (1mg/Kg, i.p.) e após 6, 8, 48h o sangue foi coletado. A geração de ROS na plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foi quantificada após a adição de ADP $20 \mu\text{M}$. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. provenientes de 3-5 animais por grupo. [#] $P < 0,05$ comparado com ratos controles. ^{*} $P < 0,05$ comparado com o respectivo controle na ausência de NAC. MFI=Índice de Fluorescência Média

4. Discussão

A importância das plaquetas na hemostasia já é bastante reconhecida, mas nos últimos anos vêm aumentando as evidências que sugerem um papel importante desses elementos em reações inflamatórias, incluindo a sepse. Vários estudos mostraram que a administração de LPS em animais e humanos leva a vários sinais observados na sepse como trombocitopenia, leucopenia, febre, aumento de concentração de interleucinas circulantes e aumento da produção de NO (5, 119, 120).

Apesar de numerosos estudos investigando a ação do LPS em plaquetas, os dados continuam controversos, variando de acordo com o protocolo experimental empregado e a fonte de LPS. Estudos prévios mostraram que em alguns casos, o LPS promove a inibição plaquetária (103, 105, 106, 119, 121) outros grupos nenhum efeito (122, 123, 124) e ainda grupos que observaram a ativação da adesão ou da agregação plaquetária (94, 95, 100, 102, 107, 125).

Em nosso trabalho, observamos que os números de leucócitos e de plaquetas do sangue periférico de ratos tratados com LPS apresentaram-se diminuídos, sendo que as quedas mais acentuadas foram observadas após 6h e 24h de tratamento com LPS, respectivamente. Alguns trabalhos mostram que o evento que ocorre mais precocemente na fase inicial da endotoxemia é a diminuição significativa do número de leucócitos e plaquetas no sangue periférico (89) e que a queda de plaquetas no sangue periférico se deve ao acúmulo destes elementos em certos órgãos como pulmão e fígado. A injeção de LPS em camundongos causa, ao mesmo tempo, diminuição do número de plaquetas circulantes e acúmulo desses elementos no fígado e pulmão, sendo que neste último encontram-se retidos cerca de 80% das plaquetas perdidas da circulação (90). Em humanos, o número de plaquetas acumuladas em órgãos periféricos e o grau de ativação destas plaquetas, determinado através da expressão de proteínas presentes na membrana plaquetária como a CD62P e o receptor de fibrinogênio GP (IIb-IIIa), apresentam correlação positiva com a severidade da sepse e, por conseguinte, com o desenvolvimento da disfunção múltipla de órgãos (91, 92). Sendo assim, nossos resultados indicam que a concentração de LPS utilizada neste trabalho foi suficiente para levar a sepse nos animais.

O LPS é capaz de ativar diversos tipos de células e desencadear a produção de diferentes substâncias incluindo ROS. No presente trabalho nós mostramos que o tratamento de ratos com LPS 6-48h causa um significativo aumento da produção de ROS em plaquetas ativadas com ADP. Há poucos estudos mostrando que o LPS causa aumento de ROS em plaquetas, sendo que nestes

trabalhos foi utilizado LPS de *Proteus mirabilis* (126,127). Em plaquetas, diferentes fontes contribuem para a produção de ROS, como a COX, XO, mitocôndria e NAD(P)H oxidase (114). Todas estas fontes, provavelmente, geram maiores quantidades de ROS quando as plaquetas são ativadas. Isto explicaria a observação que as plaquetas não ativadas de ratos controles ou tratados com LPS geram quantidades similares de ROS.

A primeira evidência da expressão de NAD(P)H oxidase em plaquetas foi mostrada por Seno et al (111), que detectaram as subunidades p22²² e p67^{phox} em plaquetas lisadas. Mais tarde, foram encontradas as subunidades gp91^{phox} e p47^{phox} (23,112). A redução da formação de O₂⁻ plaquetário pelo inibidor da NAD(P)H oxidase DPI vem sendo mostrado por diferentes grupos (128, 129) mas a contribuição desta enzima para a geração de O₂⁻ em plaquetas de ratos tratados com LPS ainda é pouco estudada. Nossos resultados mostraram que o aumento da produção de ROS em plaquetas de ratos tratados com LPS em 8 e 48h é parcialmente dependente da ativação da NAD(P)H oxidase. De fato, há estudos mostrando que o LPS ativa a NAD(P)H oxidase e, portanto, leva a um aumento da formação de O₂⁻ (130, 131, 132). Recentemente, Li e Frei (133) demonstraram que a incubação de células endoteliais de aorta humana com LPS por 24h aumenta a atividade da NAD(P)H oxidase e também a expressão da subunidade p22^{phox}. É interessante notar que em ratos 6h após a injeção de LPS, o DPI não diminuiu a liberação de ROS, indicando que neste caso a geração de O₂⁻ se dá por outras fontes. Em 2001, Zielinski et al (126) verificaram que a incubação de plaquetas com o inibidor de COX, indometacina, não afetou a produção de ROS causada por LPS de *Proteus mirabilis*. Estes resultados sugerem que a COX, provavelmente, não contribui para a geração de ROS induzida por LPS em 6h. No presente trabalho, a incubação de plaquetas com LPS *in vitro*, mesmo em concentrações tão altas com 300µg/ml, não causou aumento na produção de ROS. Esta aparente discrepância entre os resultados poderia ser explicada pela ação de substâncias geradas sistemicamente pelo LPS, quando este é injetado em ratos, que poderiam modular positivamente a produção de ROS, como TNF-α (134, 135, 136), o interferon-γ (135) e o NO (137).

A injeção de ratos com LPS causou uma redução significativa da agregação plaquetária induzida por ADP, sendo esta mais marcante 48h após o tratamento com LPS. Estes resultados estão de acordo com um recente trabalho que também mostra que a agregação de plaquetas de ratos está reduzida 48h após a injeção com LPS (138).

Um número crescente de trabalhos mostram que ROS modulam a reatividade plaquetária, entretanto, seus efeitos nas plaquetas são ainda bastante controversos. Alguns trabalhos mostram que ROS diminuem a atividade plaquetária (139, 140), enquanto outros mostram um aumento na atividade plaquetária (23, 141). Em nosso estudo, o sequestrador de O_2^- , PEG-SOD, bem como o sequestrador de H_2O_2 PEG-catalase, praticamente aboliram a agregação de plaquetas de ratos tratados com LPS. Este aumento do efeito inibitório do LPS pela PEG-SOD e PEG-catalase pode ser decorrente do efeito direto de ROS nas plaquetas. Alguns trabalhos mostram que o O_2^- ativa plaquetas por aumentar a liberação de ADP pelos grânulos densos e por ativar o receptor de fibrinogênio, a integrina $\alpha IIb\beta 3$ (114, 141). Embora os reais efeitos gerados pelo H_2O_2 em plaquetas ainda não sejam claros, alguns trabalhos mostram que o H_2O_2 tem atividade pró-agregante e é capaz de aumentar a concentração de cálcio intracelular em plaquetas (142, 143, 144). Em contraste com os nossos resultados, Dong et al (145) mostraram que a catalase atenua o efeito inibitório do tratamento de ratos com LPS em plaquetas. Esta discrepância nos resultados pode ser causada pelas diferenças nas condições experimentais. No presente estudo, foram utilizados ratos Wistar e a agregação de plaquetas lavadas foi analisada 6-48h após a injeção de LPS 1mg/Kg (i.p.), enquanto que no trabalho citado os autores utilizaram ratos Sprague-Dawley e a agregação foi realizada em plasma rico m plaquetas 90 min após a injeção de LPS (2mg/Kg, i.v.). O aumento da biodisponibilidade do NO, um potente inibidor da função plaquetária, também poderia contribuir para o efeito da PEG-SOD, já que o O_2^- pode reagir com o NO gerando o peroxinitrito. É interessante notar que a PEG-SOD e a PEG-catalase, em menor extensão, também inibem significativamente a agregação plaquetária de ratos controles. Portanto, nós concluímos que o O_2^- e H_2O_2 são importantes moduladores da reatividade plaquetária tanto em ratos tratados com LPS como em ratos controles.

A NAC é um antioxidante largamente utilizado em estudos de estresse oxidativo (146, 147, 148). No Nosso trabalho, a incubação de plaquetas com NAC *in vitro*, não modificou a agregação de plaquetas de ratos controles ou de ratos 6h após a injeção de LPS, enquanto que a agregação em 8 e 48h após a administração de LPS foi significativamente reduzida. Estes resultados indicam que a inibição da agregação plaquetária causada por NAC *in vitro* não foi devido ao seqüestro de ROS, já que em 6h após a injeção de LPS a produção de ROS é tão grande quanto em 8 e 48h. Além disso,

diferente da NAC, a PEG-SOD e PEG-catalase, conhecidos como seqüestradores de ROS, aumentaram o efeito inibitório do LPS em 6, 8 e 48h.

A ativação da NAD(P)H oxidase envolve a fosforilação e a translocação das subunidades citosólicas (p47^{phox}, p67^{phox} e p40^{phox}) para o flavocitocromo b₅₅₈ (gp91^{phox} e p22^{phox}) situado na membrana citoplasmática (48). Trabalhos mostram que a NAC inibe a translocação da p47^{phox} e da p67^{phox} em neutrófilos humanos (149) e em eosinófilos (146) quando estas células são ativadas.

De fato a NAC, além de ser um seqüestrador de ROS, aumenta o conteúdo celular de glutathione, inibe a ativação do fator NF-κB, inibe a produção de TNF-α e inibe a enzima NAD(P)H oxidase (49, 146, 147, 148, 150, 151, 152).

Diferente dos resultados obtidos com NAC *in vitro*, o tratamento de ratos com este antioxidante, após a exposição ao LPS, preveniu o efeito inibitório do LPS na agregação plaquetária induzida por ADP. Como mencionado acima, a NAC pode aumentar o conteúdo de um importante antioxidante celular, a glutathione (146, 149, 150). O aumento dos níveis da glutathione pode recuperar o balanço redox apropriado no animal (149, 153) e assim, restaurar a resposta plaquetária normal nos ratos com LPS.

Portanto, os resultados neste trabalho mostram claramente que ROS, geradas em plaquetas ou sistemicamente, têm um papel importante na modulação da agregação de plaquetas de ratos tratados com LPS.

5. Conclusão

Os resultados apresentados neste estado nos permitem concluir:

- O tratamento de ratos com LPS causa inibição da agregação plaquetária induzida por ADP
- A incubação de plaquetas com PEG-SOD, PEG-catalase e NAC aumenta o efeito inibitório do LPS sobre a agregação plaquetária indicando o papel modulatório de ROS nesta resposta
- A NAD(P)H oxidase participa da geração de ROS em plaquetas de ratos expostos a LPS por tempo mais prolongado (8-48h)
- O tratamento de ratos com NAC previne o aumento da geração de ROS em plaquetas de ratos tratados com LPS e também a inibição da agregação plaquetária induzida por ADP, indicando que a geração de ROS sistemicamente também modula a função plaquetária

6. Referências Bibliográficas

- (1) 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.
- (2) Bochud PY, Calantra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *Clin. Rev.* 2003; 326(7383):262-66.
- (3) Silva E, Pedro MA, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, de Matos, GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES Study). *Crit. Care*. 2004; 8(4): R251-60.
- (4) Datasus. Departamento de Informação e Informática do SUS [on-line] 2006 [Acesso 3jun 2007]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/miuf.def>.
- (5) Brandtzaeg P. Significance and pathogenesis of septic shock. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996; 216:15-37.
- (6) Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol. Med. Today*. 1999; 5(3):123-32.
- (7) Golenbock DT, Hampton RY, Qureshi N, Takayama K, Raetz CR. Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J. Biol. Chem.* 1991; 266(29):19490-98.
- (8) Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and immunity. *J. Endotoxin Res.* 2001; 7(3):167-202.
- (9) 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.
- (10) 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.

- (11) 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.
- (12) 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.
- (13) Amura CR, Kamei T, Ito N, Soares MJ, Morrison DC. Differential regulation of lipopolysaccharide (LPS) activation pathways in mouse macrophages by LPS-binding proteins. *J. Immunol.* 1998; 161(5):2552-60.
- (14) Ibeagha-Awemu EM, Lee J, Ibeagha AE, Zhao X. Bovine CD14 characterization and relationship between polymorphisms and surface expression on monocytes and polymorphonuclear neutrophils. *BMC Genetics.* 2008; 9: 50.
- (15) Jayachandran M, Brunn JG, Karnicki K, Miller RS, Owen WG, Miller VM. In vivo of lipopolysaccharide and TLR4 on platelet production and activity: implications for thrombotic risk. *J. Appl. Physiol.* 2007; 102(1): 429.
- (16) Imgenex. Imgenex Corp. [on-line] [Aceso em 2 jun 2009]. Disponível em: <http://www.imgenex.com/Toll-likeReceptors.php>.
- (17) Jean-Baptiste E. Cellular Mechanisms in Sepsis. *Journal Intensive Care Medicine.* 2007; 22(2): 63-72.
- (18) Heuman D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta.* 2002; 323(1-2): 59-72.
- (19) McCuskey R, Urbaschek R, Urbaschek B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovascular research.* 1996; 32(4): 752-63.
- (20) Zhang H, Joseph J, Feix J, Hogg N, Kalyanaraman B. Nitration and oxidation of a hydrophobic tyrosine probe by peroxynitrite in membranes: comparison with nitration and oxidation of tyrosine by peroxynitrite in aqueous solution. *Biochemistry.* 2001; 40(25):7675-86.
- (21) Kovacic P, Pozzos RS, Somanathan R, Shangari N, O'Brien PJ. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Curr. Med. Chem.* 2005; 12(22): 2601-23.

- (22) Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: High-dosage Vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann. Intern. Med.* 2005; 142(1): 37-46.
- (23) Krötz F, Sohn HY, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele TM, Becker BF, Theisen K, Klauss V, Pohl U. NAD(P)H-oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood.* 2002; 100(3): 917-24.
- (24) Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira.* 1997; 43 (1): 1-16.
- (25) Norberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine.* 2001; 31 (11): 1287-1312.
- (26) Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger princípios da bioquímica.* In: Lehninger AL. 3^o ed. São Paulo. Sarvier, 2000: 973.
- (27) Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 39(1): 44-84.
- (28) Liochev PS, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle-70 years later: An alternative view. *Redox Rep.* 2002; 7(1): 55-7.
- (29) Wolf G. Nitric oxide and nitric oxide synthase: biology, pathology, localization. *Histol Histopathol.* 1997; 12(1): 251-61.
- (30) Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol. Sci.* 2005; 26(4): 190-95.
- (31) Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 1993; 268 (17): 12231-4.
- (32) Moncada, S., Palmer, R.M. & Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Reviews* 43(2): 109-42.
- (33) Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci.* 1989; 86(22):9030-33.
- (34) Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2003; 39 (4): 343-50.
- (35) Förstermann U, Pollock JS, Schimidt HHH, Heller M, Murad, F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in

the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991; 88(5): 1788-92.

(36) Gambaryan S, Kobsar A, Hartmann S, Birschmann I, Kuhlencordt PJ, Müller-Esterl W, Lahmann SM, Walter U. NO-synthase-NO-independent regulation of human and murine platelet soluble guanylyl cyclase activity. *J Thromb Haemost.* 2008; 6 (8): 1373-75.

(37) Dusting GJ, Macdonald PS. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. *Ann Med.* 1995; 27(3):395-406.

(38) Bergenti L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 1999; 65(18-19): 1865-74.

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

(40) Bian K, Murad F. Nitric oxide (NO): biogeneration, regulation and relevance to human diseases. *Front. Biosci.* 2003; 8:d264-78

(41) Brecht DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Ann. Rev. Biochem.* 1994; 63: 175-95.

(42) Hartwig J, Italiano Jr. JE. The Birth of the platelets. *J. Thromb. Haemost.* 2003; 1(7): 1580-86.

(43) Klatt P, Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem.* 2000; 267(16):4928-44.

(44) Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolocci N, Feelisch M, Fukuto J, Wink DA. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species putting perspective on stressful biological situations. *Biol. Chem.* 2004; 385(1): 1-10.

(45) Marcondes S, Turko IV, Murad F. Nitration of succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase in rats after endotoxin administration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2001; 98(13):7146-51.

(46) Somers MJ, Burchfield JS, Harrison DG. Evidence for a NADH/NADPH oxidase in human umbilical vein endothelial cells using electron spin resonance. *Antioxid Redox Signal.* 2000; 2(4): 779-87.

- (47) Krause KH. Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. *Exp Gerontol.* 2007; 42 (4): 256-62.
- (48) Bokock GM. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1994; 6(2): 212-18.
- (49) Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors.* 1997; 6(4): 391-97.
- (50) Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.* 2005;16(10):577-86.
- (51) Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(11):1191-212.
- (52) Bhattacharyya J, Biswas S, Datta AG. Mode of action of endotoxin: role of free radicals and antioxidants. *Curr. Med. Chem.* 2004; 11(3):359-68.
- (53) Freedman JE. Oxidative Stress and Platelets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2008; 28(3): s11-s16.
- (54) Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Che. Rev.* 2004; 104(12): 6255-85.
- (55) Thomas JA, Mallis RJ. Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls. *Exp Gerontol.* 2001;36(9):1519-26.
- (56) Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; 82(1): 47-95.
- (57) Drake J, Kanski J, Varadarajan S, Tsoras M, Butterfield DA. Elevation of brain glutathione by γ -glutamylcysteine ethyl ester protects against peroxynitrite-induced oxidative stress. *J. Neurosci. Res.* 2002; 68(6): 776-84.
- (58) Keen RR, Stella L, Flanigan DP, Lands WE. Differential detection of plasma hydroperoxides in sepsis. *Crit. Care Med.* 1991; 19(9):1114-19.
- (59) Galley HF, Davies MJ, Webster NR. Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome. *Crit. Care Med.* 1996; 24(10):1649-53.
- (60) Huet O, Obata R, Aubron C, Spraul-Davit A, Charpentier J, Laplace C, Nguyen-Khoa T, Conti M, Vicaut E, Mira JP, Duranteau J. Plasma-induced endothelial oxidative stress is related to the severity of septic shock. *Crit Care Med.* 2007;35(3):821-6.

- (61) Salvemini D, Riley DP, Lennon PJ, Wang ZQ, Currie MG, Macarthur H, Misko TP. Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage. *Br. J Pharmacol.* 1999; 127(3):685-92.
- (62) Shang F, Zhao L, Zheng Q, Wang J, Xu Z, Liang W, Liu H, Liu S, Zhang L. Simvastatin inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal rat cardiomyocytes: The role of reactive oxygen species. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 2006; 351(4):947-52.
- (63) Wu F, Schuster DP, Tysl K, Wilson JX. Ascorbate inhibits NADPH oxidase subunit p47phox expression in microvascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42(1):124-31.
- (64) Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, Shah AM. Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation.* 2002;105(3):293-6.
- (65) Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996;97(8):1916-23.
- (66) Meyer JW, Schmitt ME. A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. *FEBS Lett.* 2000;472(1):1-4.
- (67) Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Böhm M, Meinertz T, Münzel T. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation.* 1999; 99(15):2027-33.
- (68) Wang W, Suzuki Y, Tanigaki T, Rank DR, Raffin TA. Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on septic lung injury in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150(5 Pt 1):1449-52
- (69) Gao XP, Standiford TJ, Rahman A, Newstead M, Holland SM, Dinauer MC, Liu QH, Malik AB. Role of NADPH oxidase in the mechanism of lung neutrophil sequestration and

microvessel injury induced by Gram-negative sepsis: studies in p47phox^{-/-} and gp91phox^{-/-} mice. *J Immunol.* 2002;168(8):3974-82.

(70) Khadour FH, Panas D, Ferdinandy P, Schulze C, Csont T, Lalu MM, Wildhirt SM, Schulz R. Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(3):H1108-15.

(71) Ben-Shaul V, Lomnitski L, Nyska A, Zurovsky Y, Bergman M, Grossman S. The effect of natural antioxidants, NAO and apocynin, on oxidative stress in the rat heart following LPS challenge. *Toxicol Lett.* 2001;123(1):1-10.

(72) Klinger MH. Platelets and inflammation. *Anat Embryol (Berl).* 1997;196(1):1-11.

(73) Yeaman MR. The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clin Infect Dis.* 1997;25(5):951-68.

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

(75) Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Tromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975; 72(8): 2994-98.

(76) Chignard M, Le Couedic JP, Vargaftig BB, Benveniste J. Platelet-activating factor (PAF-acether) secretion from platelets: effect of aggregating agents. *Br. J. Hematol.* 1980; 46(3): 455-64.

(77) Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil, S. J. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood.* 1990; 75(1): 128-38.

(78) Lévi-Toledano S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a “hierarchy”? *Haemostasis.* 1999; 29(1):4-15.

(79) Offermanns S. Activation of platelets function through G protein-coupled receptors. *Circ. Res.* 2006; 99(12): 1293-1304.

(80) Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost.* 2002; 88: 186-93.

(81) Colman RW, Figures WR, Scarce LM, Strimpler AM, Zhou R, Rao AK. Inhibition of collagen-induced platelet activation by 5'-p-fluorosulfonylbenzoyl adenosine: Evidence for

an ADP requirement and synergistic influence of prostaglandin endoperoxides. *Blood*. 1986; 68(2): 563.

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

(83) Cheng Y, 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.

(84) Kahner BN, Shankar H, Murugappan S, Prasad GL, Kunapuli SP. Nucleotide receptor signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2006;4(11):2317-26.

(85) Kunapuli SP, Dorsam RT, Kim S, Quinton TM. Platelet purinergic receptors. *Curr Opin Pharmacol*. 2003; 3(2): 175-80.

(86) Berridge MJ. Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature*. 1993; 361(6410): 315-25.

(87) Hirsch E, Bosco O, Tropel P, Laffargue M, Calvez R, Altruda F, Wymann M, Montrucchio G. Resistance of thromboembolism in PI3K gamma-deficient mice. *FASEB J*. 2001; 15(11): 2019-21.

(88) Dorsam RT, Kim S, Murugappan S, Rachoor S, Shankar H, Jin J, Kunapuli SP. Differential requirements for calcium and Src family kinases in platelet GPIIb/IIIa activation and thromboxane generation downstream of different G-protein pathways. *Blood*. 2005; 105(7): 2749-56.

(89) Stohlawetz P, Folman CC, von dem Borne AE, Pernerstorfer T, Eichler HG, Panzer S, Jilka B. Effects of endotoxemia on thrombopoiesis in men. *Thromb Haemost*. 1999; 81(4):613-7.

(90) Shibasaki M, Nakamura M, Endo Y. Biphasic, organ-specific, and strain-specific accumulation of platelets induced in mice by a lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and its possible involvement in shock. *Infect Immun*. 1996; 64(12):5290-4.

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

(92) Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S, Neumann FJ. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med*. 1997; 23(4): 379-85.

- (93) Wachowicz B, Saluk J, Kaca W. Response of blood platelets to *Proteus mirabilis* lipopolysaccharide. *Microbiol. Immunol.* 1998; 42(1):47-9.
- (94) Saluk-Juszczak J, Wachowicz B, Kaca W. Stimulatory effects of endotoxin on the platelet secretory process. *Microbios.* 1999; 99(392):45-53.
- (95) Saluk-Juszczak J, Wachowicz B, Kaca W. Endotoxins stimulate generation of superoxide radicals and lipid peroxidation in blood platelets. *Microbios.* 2000; 103(404): 17-25.
- (96) Young JM, Panah S, Satchawatcharaphong C, Cheung PS. Human whole blood assays for inhibition of prostaglandin G/H synthases-1 and -2 using A23187 and lipopolysaccharide stimulation of thromboxane B2 production. *Inflamm. Res.* 1996; 45(5):246-53.
- (97) Saluk-Juszczak J, Olas B, Nowak P, Kolodziejczyk J, Wachowicz B, Zgirski, A. The effect of lipopolysaccharide from *Proteus mirabilis* on the level of the stable end metabolic products of nitric oxide in blood platelets. *Current Microbiology.* 2007; 54(1): 27-30.
- (98) Saluk-Juszczak J, Wachowicz B, Zielinski T, Kaca W. Adhesion of thrombin-stimulated and unstimulated blood platelets to collagen in the presence of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharides. *Platelets.* 2001; 12(8):470-5.
- (99) Zielinski T, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Kaca W. Polysaccharide part of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharide may be responsible for the stimulation of platelet adhesion to collagen. *Platelets.* 2002, 13(7):419-24.
- (100) Cerwinka WH, Cooper D, Krieglstein CF, Feelisch M, Granger DN. Nitric oxide modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venule. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002; 282(3):H1111-17.
- (101) Cerwinka WH, Cooper D, Krieglstein CF, Ross CR, McCord JM, Granger DN. Superoxide mediates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2003; 284(2):H535-41.
- (102) Katayama T, Ikeda Y, Handa M, Tamatani T, Sakamoto S, Ito M, Ishimura Y, Suematsu, M. Immunoneutralization of glycoprotein Iba α attenuates endotoxin-induced interactions of platelets and leukocytes with rat venular endothelium in vivo. *Circ. Res.* 2000; 86(10):1031-37.

- (103) Sheu JR, Hung WC, Kan YC, Lee YM, Yen MH. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of Escherichia coli lipopolysaccharide in human platelets. *Br. J. Haematol.* 1998; 103(1):29-38.
- (104) Sheu JR, Hung WC, Su CH, Lin CH, Lee LW, Lee YM, Yen MH. The antiplatelet activity of Escherichia coli lipopolysaccharide is mediated through a nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Eur. J. Haematol.* 1999; 62(5):317-26.
- (105) Saba HI, Saba SR, Morelli G, Hartmann RG. Endotoxin-mediated inhibition of human platelet aggregation. *Thromb. Res.* 1984; 34(1):19-33.
- (106) Yaguchi A, Lobo FL, Vincent JL, Pradier O. Platelet function in sepsis. *Journal of thrombosis and haemostasis.* 2004; 2 (12): 2096-2102.
- (107) Zhang G, Han J, Welch EJ, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya TA, Malik AB, Du X, Li Z. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol.* 2009;182(12):7997-8004.
- (108) Marcos AJ, Silk ST, Safier LB, Ulman HL. Superoxide production and reducing activity in human platelets. *J Clin Invest.* 1977; 59(1): 149-58.
- (109) Cesbron JY, Capron A, Vargaftig BB, Lagarde M, Pincemail J, Braquet P, Taelman H, Joseph M. Platelets mediate the action of diethylcarbamazine on microfilariae. *Nature.* 1987; 325 (6104): 533-36.
- (110) Pignatelli P, Lenti L, Sanguigni V, Frati G, Simeoni I, Gazzaniga PP, Pulcinelli FM, Violi F. Carnitine inhibits arachidonic acid turnover, platelet, and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 284(1): H41-8.
- (111) Seno T, Inoue N, Gao D, Okuda M, Sumi Y, Matsui K, Yamada S, Hirata KI, Kawashima S, Tawa R, Imajoh-Ohmi S, Sakurai H, Yokoyama M. Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production. *Thromb Res.* 2001;103(5):399-409
- (112) Pignatelli P, Sanguigni V, Lenti L, Ferro D, Finocchi A, Rossi P, Violi F. Gp91phox-dependent expression of platelet CD40 ligand. *Circulation.* 2004;110(10):1326-9.
- (113) Stokes KY, Russel JM, Jennings MH, Alexander JS, Granger DN. Platelet-associated NAD(P)H oxidase contributes to the thrombogenic phenotype induced by hypercholesterolemia. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 43(1): 22-30.

- (114) Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(11):1988-96.
- (115) Handin RI, Karabin R, Boxer GJ. *J Clin Invest.* 1977;59(5):959-65. Enhancement of platelet function by superoxide anion.
- (116) Begonja AJ, Gambaryan S, Geiger J, Aktas B, Pozgajova M, Nieswandt B, Walter U. Platelet NAD(P)H-oxidase-generated ROS producton regulates alphaIIbeta3-integrin activation independent of the NO/cGMP pathway. *Blood.* 2005; 106(8): 2757-60.
- (117) Clutton P, Miermont A, Freedman JE. Regulation of endogenous reactive oxygen species in platelets can reverse aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(1):187-92.
- (118) Smith JA, Weidemann MJ. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1993 ;162(2):261-8.
- (119) Stohlawetz P, Folman CC, von dem Borne AE, Pernerstorfer T, Eichler HG, Panzer S, Jilma B. Effects of endotoxemia on thrombopoiesis in men. *Thromb Haemost.* 1999;81(4):613-7.
- (120) Ramzi J, Mohamed Z, Yosr B, Karima K, Raihane B, Lamia A, Hela BA, Zaher B, Balkis M. Predictive factors of septic shock and mortality in neutropenic patients. *Hematology.* 2007;12(6):543-8.
- (121) Cicala, C.; Santacrose, C.; Itoh, H.; Douglas, G.J.; Page, C.P. A study on rat platelet responsiveness following intravenous endotoxin administration. *Life Sci.* **60**:PL31-PL38; 1997.
- (122) Mueller-Eckhardt C, Lüscher EF. Immune reactions of human blood platelets. IV. Investigations on the problem of an immunologically induced effect of endotoxin on human platelets. *Thromb Diath Haemorrh.* 1968 ;20(3):336-44.
- (123) Whitworth NH, Barradas MA, Mikhailidis DP, Dandona P. An investigation into the effects of bacterial lipopolysaccharide on human platelets. *Eur J Haematol.* 1989;43(2):112-9.
- (124) Nystrom ML, Barradas MA, Jeremy JY, Mikhailidis DP. Platelet shape change in whole blood: differential effects of endotoxin. *Thromb Haemost.* 1994; 71(5):646-50.
- (125) Ward JR, Bingle L, Judge HM, Brown SB, Storey RF, Whyte MK, Dower SK, Buttle DJ, Sabroe I. Agonists of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 are unable to modulate

platelet activation by adenosine diphosphate and platelet activating factor. *Thromb Haemost.* 2005; 94(4):831-8.

(126) Zielinski T, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Kaca W . The generation of superoxide anion in blood platelets in response to different forms of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharide: effects of staurosporin, wortmannin, and indomethacin. *Thromb Res.* 2001;103(2):149-55

(127) Olas B, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Zieliński T, Kaca W, Buczyński A. Antioxidant activity of resveratrol in endotoxin-stimulated blood platelets. *Cell Biol Toxicol.* 2001;17(2):117-25

(128) Leo R, Praticò D, Iuliano L, Pulcinelli FM, Ghiselli A, Pignatelli P, Colavita AR, FitzGerald GA, Violi F. Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. *Circulation.* 1997;95(4):787-9.

(129) Tajima M, Sakagami H. Tetrahydrobiopterin impairs the action of endothelial nitric oxide via superoxide derived from platelets. *Br J Pharmacol.* 2000 Nov;131(5):958-64.

(130) Sheh YL, Hsu C, Chan SH, Chan JY . NADPH oxidase- and mitochondrion-derived superoxide at rostral ventrolateral medulla in endotoxin-induced cardiovascular depression. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42(10):1610-23

(131) Teshima S, Tsunawaki S, Rokutan K. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide enhances the expression of NADPH oxidase components in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *FEBS Lett.* 1999;452(3):243-6

(132) DeLeo FR, Renee J, McCormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss JP, Nauseef WM. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest.* 1998;101(2):455-63.

(133) Li L, Frei B. Prolonged exposure to LPS increases iron, heme, and p22phox levels and NADPH oxidase activity in human aortic endothelial cells: inhibition by desferrioxamine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(5):732-8

1 – 12.

(134) Basuroy S, Bhattacharya S, Leffler CW, Parfenova H . Nox4 NADPH oxidase mediates oxidative stress and apoptosis caused by TNF-alpha in cerebral vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;296(3):C422-32.

- (135) Kuwano Y, Kawahara T, Yamamoto H, Teshima-Kondo S, Tominaga K, Masuda K, Kishi K, Morita K, Rokutan K. Interferon-gamma activates transcription of NADPH oxidase 1 gene and upregulates production of superoxide anion by human large intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 ;290(2):C433-43.
- (136) De Biase L, Pignatelli P, Lenti L, Tocci G, Piccioni F, Riondino S, Pulcinelli FM, Rubattu S, Volpe M, Violi F. Enhanced TNF alpha and oxidative stress in patients with heart failure: effect of TNF alpha on platelet O₂⁻ production. *Thromb Haemost.*2003;90(2):317-25.
- (137) Owayed A, Dhaunsi GS, Al-Mukhaizeem F. Nitric oxide-mediated activation of NADPH oxidase by salbutamol during acute asthma in children. *Cell Biochem Funct.* 2008t;26(5):603-8.
- (138) Vuaden FC, Furstenau CR, Savio LE, Sarkis JJ, Bonan CD. Endotoxemia alters nucleotide hydrolysis in platelets of rats. *Platelets.* 2009; 20(2):83-9.
- (139) Belisario MA, Tafuri S, Di Domenico C, Squillacioti C, Della Morte R, Lucisano A, Staiano N. H₂O₂ activity on platelet adhesion to fibrinogen and protein tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1495(2):183-93.
- (140) Ohyashiki T, Kobayashi M, Matsui K. Oxygen-radical-mediated lipid peroxidation and inhibition of ADP-induced platelet aggregation. *Arch Biochem Biophys.* 1991;288(1):282-6.
- (141) Salvemini D, Radziszewski W, Mollace V, Moore A, Willoughby D, Vane J. Diphenylene iodonium, an inhibitor of free radical formation, inhibits platelet aggregation. *Eur J Pharmacol.* 1991;199(1):15-8.
- (142) Redondo PC, Salido GM, Rosado JA, Pariente JA. Effect of hydrogen peroxide on Ca²⁺ mobilisation in human platelets through sulphhydryl oxidation dependent and independent mechanisms. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(3):491-502.
- (143) Redondo PC, Salido GM, Pariente JA, Rosado JÁ. Dual effect of hydrogen peroxide on store-mediated calcium entry in human platelets. *Biochem Pharmacol.* 2004 Mar 15;67(6):1065-76.
- (144) Redondo PC, Jardin I, Hernández-Cruz JM, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA. Hydrogen peroxide and peroxynitrite enhance Ca²⁺ mobilization and aggregation in

platelets from type 2 diabetic patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Aug 5;333(3):794-802.

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

(146) Martinez-Losa M, Cortijo J, Juan G, O'Connor JE, Sanz MJ, Santangelo F, Morcillo EJ. Inhibitory effects of N-acetylcysteine on the functional responses of human eosinophils in vitro. *Clin Exp Allergy.* 2007 May;37(5):714-22.

(147) Asehnoune K, Strassheim D, Mitra S, Kim JY, Abraham E. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *J Immunol.* 2004;172(4):2522-9.

(148) Wu JN, Huang J, Yang J, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Caspase inhibition augmented oridonin-induced cell death in murine fibrosarcoma 1929 by enhancing reactive oxygen species generation. *J Pharmacol Sci.* 2008;108(1):32-9.

(149) Kitaoka N, Liu G, Masuoka N, Yamashita K, Manabe M, Kodama H. Effect of sulfur amino acids on stimulus-induced superoxide generation and translocation of p47phox and p67phox to cell membrane in human neutrophils and the scavenging of free radical. *Clin Chim Acta.* 2005;353(1-2):109-16

(150) Bernard GR. N-acetylcysteine in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Med.* 1991;91(3C):54S-59S.

(151) Victor VM, Rocha M, De la Fuente M.. N-acetylcysteine protects mice from lethal endotoxemia by regulating the redox state of immune cells. *Free radic. Res.* 2003; 37(9):919-29

(152) Ritter C, Andrades ME, Reinke A, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med.* 2004;32(2):342-9

(153) Kimura Y, Pierro A, Eaton S. Glutathione synthesis in intestinal ischaemia-reperfusion injury: effects of moderate hypothermia. *J Pediatr Surg.* 2009;44(2):353-7.