

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RITA CAROLINA FIGUEIREDO DUARTE

**EFEITO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO NA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA E
PERFIL OXIDATIVO EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Belo Horizonte - MG

2012

RITA CAROLINA FIGUEIREDO DUARTE

**EFEITO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO NA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA E
PERFIL OXIDATIVO EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora: Prof. Dra. Maria das Graças Carvalho - UFMG

Co-orientadora: Prof. Dra. Karina Braga Gomes - UFMG

Belo Horizonte - MG

2012

Dedico este trabalho
À Deus por me abençoar todos os dias.
Aos meus pais e ao meu irmão pelo amor e incentivo.
As Profas. Graça e Karina pelos grandes ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me abençoar a cada dia.

Aos meus pais José Júlio e Maria José e ao meu irmão Túlio pelo amor, carinho e confiança. Agradeço também pelo incentivo e por nunca medirem esforços para que eu realizasse meus sonhos.

À Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho deixo meu agradecimento mais que especial e sincero. Obrigada pela amizade, generosidade, dedicação e grandes ensinamentos.

À querida Profa. Dra. Karina Braga Gomes pelos ensinamentos, dedicação, incentivo e amizade.

À Dra. Lillian Harboe por gentilmente ter disponibilizado os dados e as amostras de soro e plasma para que eu desenvolvesse este projeto.

Ao Dr. Olindo Martins Filho e à Dra. Fernanda Freire Campos Nunes pelos ensinamentos e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Valéria Sandrim e a Bryelle Eccard pela disposição em colaborar com os experimentos.

À Raquel Duque e à Profa. Dra. Lirlândia Sousa pelos ensinamentos e auxílio na padronização do TBARS.

As professoras Luci Maria Sant'Ana Dusse e Josianne Nicacio Silveira que colaboraram e acompanharam o desenvolvimento deste projeto.

À Gisele Santos Gonçalves, Mayara Faria e Caroline Penido pela parceria nos experimentos e amizade.

Ao professor Armando da Silva Cunha Júnior, coordenador do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela disponibilidade e auxílio constante. Agradeço também ao Eduardo, secretário deste Programa, pelo suporte e gentileza.

Aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pelo auxílio no desenvolvimento deste projeto.

Aos colegas dos laboratórios de Bioquímica e Hematologia Clínica pelos ótimos momentos de convívio, em especial, aos funcionários Fátima, Márcio e Marisa pela grande colaboração.

Aos meus queridos amigos pelos momentos alegres e por estarem sempre ao meu lado. Em especial, agradeço à Mayara Vianna e à Vivian Lara pelo incentivo, carinho e companheirismo.

Ao CNPq pela bolsa de estudos e à FAPEMIG pelo apoio financeiro em diversas oportunidades.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”
(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença metabólica associada a complicações macro e microvasculares, onde se observa hiperativação de plaquetas e consequente aumento na formação das micropartículas de plaquetas (MP). O estresse oxidativo também está relacionado às complicações macrovasculares do diabetes, sendo que as plaquetas ativadas produzem espécies reativas do oxigênio (ROS) que são pró-trombóticas e, além disso, as ROS estão relacionadas com a propagação da ativação plaquetária. O Ácido Acetilsalicílico (AAS) é um agente antiplaquetário utilizado na prevenção de eventos aterotrombóticos por bloquear a formação de tromboxano A₂, via inibição da ciclooxigenase-1 plaquetária. O efeito do AAS pode ser determinado pelos níveis de 2,3-dinor-tromboxano B₂ (2,3-dinor-TXB₂) e do 11-dihidro-tromboxano B₂ (11-dhTXB₂). Para avaliar a resposta ao tratamento com AAS, por meio da ativação plaquetária e do perfil oxidativo, foram coletadas amostras de sangue e urina de 81 pacientes com DM2 em dois momentos distintos, a saber: imediatamente antes do início do tratamento e aos 15 dias de uso diário de 100 mg deste medicamento. Foram quantificados os níveis urinários do 11 –dhTXB₂ e plasmáticos do 2,3 dinorTXB₂ e das MP. Ademais, foram determinados os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e do 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT), para avaliação da peroxidação lipídica e da capacidade antioxidante do soro, respectivamente. Foi observada uma diminuição significativa dos níveis de 2,3 dinorTXB₂ ($p < 0,001$) e de 11 –dhTXB₂ ($p = 0,00$) aos 15 dias de uso do AAS, porém a maioria dos pacientes apresentou uma redução dos níveis destes marcadores de, no máximo, 90%. Por outro lado, a comparação dos níveis de MP, TBARS e MTT antes e durante o uso de AAS não apresentou diferença significativa. Estes resultados analisados em conjunto, evidenciam que o uso do AAS não modificou os perfis de micropartículas e oxidativo, e que os pacientes não apresentaram uma resposta equânime e satisfatória ao uso deste medicamento. Tal achado está em consonância com relatos prévios da literatura de que os pacientes com DM2 não se beneficiam de forma igual com o uso do AAS para prevenção primária de eventos aterotrombóticos.

Palavras chave: ácido acetilsalicílico, tromboxano, plaquetas, estresse oxidativo, diabetes mellitus tipo 2.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (DM2) is a metabolic disorder associated with cardiovascular complications, hyperactivation of platelets and consequent increased formation of platelet microparticles (MP). Oxidative stress is also related to macrovascular and microvascular complications of the diabetes, and the activated platelets produce reactive oxygen species (ROS) which are prothrombotic and moreover, ROS are related to the propagation of platelet activation. Acetylsalicylic acid (ASA) is an antiplatelet agent used in the prevention of atherothrombotic events by blocking the formation of thromboxane A_2 via inhibition of platelet cyclooxygenase-1. The effect of ASA can be determined by the levels of 2,3-dinor-thromboxane B_2 (2,3-dinor-TXB₂), and 11-dehydro-thromboxane B_2 (11-dhTXB₂). In order to evaluate the response to ASA by means platelet activation and oxidative profile, we collected samples of blood and urine of 81 patients with DM2 in two distinct moments, the first immediately prior to initiation of treatment with ASA and the second, at the fifteenth day of treatment with 100 mg of this medication daily. These samples were analyzed to determine the urinary 11-dhTXB₂ and plasma levels of 2,3 dinorTXB₂ and MPs. Furthermore, were measured levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and 3 - (4,5-dimethylthiazol-2yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) for evaluation of lipid peroxidation and antioxidant status of serum, respectively. It was observed a significant decrease in the levels of 2,3 dinorTXB₂ ($p < 0.001$) and 11-dhTXB₂ ($p = 0.00$), however most of the patients showed a reduction in levels of these markers, at the maximum, 90%. On the other side, no significant difference was found between the levels of MP, TBARS and MTT before and after use of AAS. These results analysed together indicate that ASA did not change the MP and oxidative profiles and that patients did not show an equal and satisfactory response to this drug. This finding is consistent with previous reports in the literature that patients with DM2 do not benefit in an equal way from the use of aspirin for primary prevention of atherothrombotic events.

Key words: acetylsalicylic acid, thromboxane, platelet, oxidative stress, type 2 diabetes mellitus.

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura da plaqueta (CASTRO et al., 2006).....	27
2	Participação das plaquetas no processo de hemostasia durante a formação do tampão plaquetário. A - processo de injúria (lesão) com exposição de agonistas plaquetários; B - adesão das plaquetas ao subendotélio; C - mudança de forma da plaqueta com secreção dos grânulos; D - ligação plaqueta/plaqueta; e: depósito da fibrina sobre o tampão plaquetário (CASTRO et al., 2006).....	29
3	Representação esquemática do modelo clássico da coagulação com as vias extrínseca, intrínseca e comum da coagulação e fibrinólise. AT - Antitrombina; D-Di - Dímero -D; F1+2 - Fragmento 1+2 da protrombina; FPA - Fibrino peptídeo A; PS - Proteína S; PC - Proteína C; PDF - Produto de degração da fibrina; PAI-1 - Inibidor do ativador do plasminogênio; TAFI - Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina; TFPI - Inibidor da via do fator tecidual.....	32
4	Representação do modelo da coagulação baseado em superfícies celulares. (HOFFMAN, 2003 e revisado por FERREIRA et al., 2010).....	33
5	Peroxidação lipídica e produtos secundários formados (AUGUSTO, 2006).....	40
6	Inibição da formação do tromboxano A₂ (TXA₂) pelo AAS.....	42
7	Quantificação percentual das micropartículas de plaquetas no quadrante superior direito (Q2).....	53
8	Representação da reação da molécula de ácido tiobarbitúrico (TBA) com o malondialdeído (MDA). (WILLIANSON; HENSLEY; FLOYD 2003).....	54
9	Valores de 2,3-dinor-TXB₂ antes aos 15 dias de AAS (n = 65). Teste Wilcoxon.....	58
10	Valores de 11 -dhTXB₂ antes aos 15 dias de AAS (n = 81). Teste Wilcoxon.....	59
11	Correlação entre os níveis de TBARS e MTT antes do uso de 100 mg de AAS (r = 0,606, p < 0,001). Correlação de Spearman.....	66

12	Correlação entre os níveis de TBARS e MTT aos 15 dias de uso diário de 100 mg de AAS (r = 0,612, p < 0,001). Correlação de Spearman.....	67
13	Relação entre o pH da solução de H₃PO₄ e a absorvância (R² = 0,9946).....	106
14	Relação entre a diminuição do pH da solução de H₃PO₄ e a absorvância (R² = 0,9284).....	107
15	Comparação entre os valores de absorvância e o período de incubação no banho seco..	109
16	Valores de absorvância para diferentes volumes de amostras de soro.....	110

LISTA DE TABELAS

1 Perfil de uso de medicamentos pelos participantes do estudo (n=81).....	57
2 Relação entre a redução $\geq 75\%$ 2,3-dinor-TXB₂ e as características clínicas dos participantes (n = 65).....	60
3 Correlação da % de MP com os níveis de 2,3-dinor-TXB₂, 11 –dhTXB₂ e dímero D.....	61
4 Correlação da % de MP antes do tratamento com AAS com as características clínicas dos participantes.....	62
5 Valores de mediana da % de MP antes do tratamento com AAS de acordo com as características clínicas dos participantes.....	63
6 Correlação do TBARS com os níveis de 2,3-dinor-TXB₂, 11 –dhTXB₂ e % de MP antes e aos 15 dias de uso diário do AAS.....	64
7 Correlação dos níveis de TBARS antes do uso do AAS com as características clínicas dos participantes.....	64
8 Correlação do MTT com a idade dos participantes.....	65
9 Valores de mediana de TBARS de acordo com as características clínicas dos participantes.....	65
10 Correlação entre os valores de MTT antes e durante o uso de AAS e os níveis dos metabólitos do TXB₂ e % de MP.....	67
11 Correlação entre os valores de MTT e as características clínicas dos participantes.....	68
12 Correlação do MTT com a idade dos participantes.....	68
13 Valores de MTT antes do uso do AAS de acordo com as características clínicas dos participantes.....	69

14	Valores de absorvância média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) de 10 replicatas de soro controle.....	104
15	Comparação entre valores de absorvância média utilizando-se H₃PO₄ 14% e 28%.....	105
16	Volumes de H₃PO₄ e água miliQ utilizados para o preparo de soluções de H₃PO₄ em diferentes pHs.....	106
17	Volumes de H₃PO₄ e água miliQ utilizados para o preparo de soluções de H₃PO₄ com pH igual ou inferior a 0,53.....	107
18	Volumes de H₃PO₄ e água miliQ utilizados para o preparo de soluções de H₃PO₄ a 3,4%, 13,8% e 446%.....	108
19	Variação do pH em função da concentração de H₃PO₄.....	108
20	Valores de absorvância das amostras de soro e plasma.....	110
21	Comparação entre os valores de absorvância das amostras de soro fresco e congelado.....	111
22	Comparação entre os valores de absorvância encontrados pelos operadores A e B.....	112
23	Concentrações do TBARS calculadas utilizando a curva padrão de TMP e o coeficiente de extinção molar (ε) do TBARS.....	114
24	Valores de absorvância para as amostras de soro controle. DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.....	116
25	Comparação entre as absorvâncias das amostras de soro e plasma (EDTA e heparina)....	116
26	Comparação entre os valores de absorvância média das amostras de soro e plasma recém-coletados e após um mês congelamento.....	117
27	Comparação entre os valores de absorvância encontrados por diferentes operadores.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS

2,3-dinor-TXB ₂	2,3-dinor tromboxano B ₂
11-dhTXB ₂	11-dihidro tromboxano B ₂
AA	Ácido araquidônico
ADA	Associação Americana de Diabetes
AAS	Ácido acetilsalicílico
ADP	Difosfato de adenosina
AGEs	Produtos de glicação avançada
AT	Antitrombina
ATP	Trifosfato de adenosina
BHT	Butil Hidroxitolueno
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
CV	Coeficiente de variação
DG	Diacilglicerol
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
DV	Desvio Padrão
F 1+2	Fragmento 1+2 da protrombina
FPA	Fibrinopeptídeo A
FI	Fator I
FII	Fator II
FPA	Fibrinopeptídeo A
FPB	Fibrinopeptídeo B
FRAP	<i>Ferric-Reducing Ability of Plasma</i>
FV	Fator V
Fva	Fator V ativado
FVII	Fator VII
FVIIa	Fator VII ativado
FVIII	Fator VIII

FVIIIa	Fator VIII ativado
FIX	Fator IX
FIXa	Fator IX ativado
FX	Fator X
Fxa	Fator X ativado
FXI	Fator XI
FXIa	Fator XI ativado
FXIII	Fator XIII
FXIIIa	Fator XIII ativado
FT	Fator tecidual
FvW	Fator von Willebrand
GP Ib	Glicoproteína Ib
GPIIb	Glicoproteína lib
GPIIb/IIIa	Glicoproteína lib/IIIa
GPIV	Glicoproteína IV
GPVI	Glicoproteína VI
HbA _{1c}	Hemoglobina glicada
HOT	<i>Hypertension Optimal Treatment</i>
IC	Intervalo de Confiança
II	Intervalo Interquartil
IP3	Inositol-trifosfato
IMC	Índice de Massa Corporal
JPAD	<i>Japanese Primary Prevention of Atherosclerosis With Aspirin for Diabetes</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
NaOH	Hidróxido de Sódio
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
PC	Proteína C
PDF	Produtos de degradação da fibrina
PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina I ₂

MDA	Malondialdeído
MP	Micropartículas de plaquetas
MTT	[-(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)]
PC	Proteína C
PS	Proteína S
ROS	Espécies reativas do oxigênio
RR	Risco relativo
SF	Sistema fibrinolítico
TAFI	Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
t-PA	Ativador de plasminogênio do tipo tecidual
TXA ₂	Tromboxano A ₂
TXB ₂	Tromboxano B ₂
u-PA	Ativador do plasminogênio tipo uroquinase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	21
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
2.1 Diabetes Mellitus.....	24
2.2 Diabetes mellitus tipo 2.....	25
2.3 Hemostasia.....	26
<u>2.3.1 Plaquetas.....</u>	<u>26</u>
<u>2.3.2 Endotélio Vascular.....</u>	<u>30</u>
<u>2.3.3 Cascata da Coagulação.....</u>	<u>31</u>
2.4 Diabetes e hiperatividade plaquetária.....	36
2.5 Micropartículas de plaquetas.....	37
2.6 Estresse oxidativo.....	39
2.7 Diabetes e o uso do ácido acetilsalicílico.....	41
2.8 Resistência ao ácido acetilsalicílico.....	43
3 OBJETIVOS.....	46
3.1 Objetivo Geral.....	46
3.2 Objetivos Específicos.....	46
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 Desenho do Estudo.....	47
4.2 Critérios de inclusão.....	47
4.3 Critérios de exclusão.....	48
4.4 Casuística.....	48
4.5 Variáveis descritivas.....	49
4.6 Variáveis analíticas.....	50
4.7 Amostras biológicas.....	50
4.8 Métodos.....	51
<u>4.8.1 Marcador da produção de tromboxano A₂ (2,3-dinor tromboxano B₂).....</u>	<u>51</u>
<u>4.8.2 Isolamento das micropartículas de plaquetas e análise por citometria de fluxo.....</u>	<u>51</u>
<u>4.8.3 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS).....</u>	<u>53</u>
<u>4.8.4 Determinação da capacidade antioxidante do soro.....</u>	<u>55</u>
4.9. Análise estatística.....	55

5 RESULTADOS.....	57
5.1 Características dos participantes do estudo.....	57
5.2 Marcador da produção de tromboxano A₂ (2,3-dinor tromboxano B₂).....	58
5.3 Análise das micropartículas de plaquetas.....	61
5.4 Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS).....	63
5.5 Avaliação da capacidade antioxidante do soro (MTT).....	66
6 DISCUSSÃO.....	70
6.1 Marcadores da produção de tromboxano A₂.....	70
6.2 Micropartículas de plaquetas.....	76
6.3 Peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante do soro.....	79
6.4 Considerações Finais.....	82
7 CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
ANEXO 1 – Parecer COEP – UFMG.....	97
ANEXO 2 – Parecer CEP Santa Casa.....	98
APÊNDICE A – Ficha clínica.....	99
APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	101
APÊNDICE C - Padronização do protocolo de determinação da peroxidação lipídica.....	103
APÊNDICE D – Padronização do protocolo para determinação da capacidade antioxidante do soro.....	115

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica, de grande importância clínica, dada a sua frequência e complicações. Em 2010, a prevalência mundial era de aproximadamente 6,4%, afetando 285 milhões de adultos com idade entre 20 e 79 anos. É previsto que, em 2030, a prevalência aumente para 7,7%, afetando 439 milhões de adultos. Este aumento é decorrente do envelhecimento populacional e do aumento do número de indivíduos obesos e sedentários (BALASUBRAMANIAM et al., 2012; SHAW et al., 2010).

Os diabéticos apresentam um risco aumentado de 2 a 4 vezes de desenvolverem doença cerebral, coronariana e vascular periférica, que juntas constituem a principal causa de morte entre esses pacientes (KAKOUIROS et al., 2011).

Além disso, diabéticos necessitam de mais medicamentos e de maiores cuidados a longo prazo, apresentando maior probabilidade de serem hospitalizados quando comparados aos indivíduos que não possuem esta doença. No Brasil, em 2010, as despesas com o diabetes foram estimadas entre 4,3 e 7,7 milhões de dólares (ZHANG et al., 2010).

O Ácido Acetilsalicílico (AAS) é um agente antiplaquetário utilizado na prevenção de eventos aterotrombóticos em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Esse medicamento promove a inibição irreversível da enzima plaquetária ciclooxigenase-1 (COX-1), bloqueando a formação de tromboxano A_2 (TXA₂). Entretanto, tem sido relatado na literatura falha no tratamento com AAS o que pode resultar em uma proteção ineficaz contra a ocorrência de eventos tromboembólicos (FITZGERALD & PIRMOHAMED, 2011; KRASOPOULOS, et al. 2008; MANSOUR, et al. 2009).

A inibição da produção de TXA₂ pelo AAS pode ser determinada pela medida das concentrações do tromboxano B₂ (TXB₂) ou de seus metabólitos, 2,3-dinor-tromboxano B₂ (2,3-dinor-TXB₂) e o 11-dihidro-tromboxano B₂ (11-dhTXB₂) (ALBERT et al., 2005; FITZGERALD & PIRMOHAMED, 2011).

O TXA₂ é um potente agente ativador de plaquetas. A ativação plaquetária constitui um importante fator no desencadeamento de eventos tromboembólicos, contribuindo para oclusão de vasos, e o AAS diminui a frequência de tais eventos por inibir a síntese de TXA₂ (HAOUARI & ROSADO, 2008; KAKOUROS et al., 2011).

Em decorrência da ativação plaquetária, há liberação no plasma de micropartículas de plaquetas (MP) que expõem glicoproteínas como a GP IIb/IIIa e fosfolípidos de carga negativa. A exposição destes fosfolípidos favorece a ativação da cascata da coagulação, gerando trombina adicional que retroalimenta o sistema, culminando com a formação de quantidades crescentes de fibrina (MOREL et al., 2008).

As plaquetas ativadas também produzem espécies reativas do oxigênio (ROS) que promovem a peroxidação de lipídios, proteínas e do DNA e contribuem para amplificar a ativação plaquetária. Os níveis de ROS estão aumentados nos pacientes diabéticos e este aumento, sem uma elevação equivalente da capacidade antioxidante, gera um estado de estresse oxidativo que também contribui para o desenvolvimento das complicações macrovasculares do diabetes (GIACCO & BROWNLEE, 2010; VIOLI & PIGNATELLI, 2012).

O presente estudo foi delineado visando um maior entendimento sobre o efeito do AAS em pacientes com DM2. Este estudo propõe esclarecer algumas lacunas ainda existentes na literatura, tais como:

- Qual o desempenho do metabólito plasmático 2,3-dinor-TXB₂ para medir o efeito do uso do AAS em pacientes com diabetes tipo 2 em relação ao metabólito urinário 11-dhTXB₂?
- O uso do AAS protege pacientes com DM2 quanto à formação de MP consequentes à ativação plaquetária?
- Existe associação entre os níveis de 2,3-dinor-TXB₂ e de MP?

- Existe associação entre os níveis de MP e de Dímero D, um marcador da geração de fibrina?
- Existe associação entre os níveis de 2,3-dinor-TXB₂, e de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)?
- Existe associação entre os níveis de 2,3-dinor-TXB₂ e a capacidade antioxidante do soro?
- Existe associação entre os níveis TBARS e a capacidade antioxidante do soro?

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Diabetes Mellitus

No Brasil, em 2010, 7,6 milhões de adultos com idade entre 20 e 79 anos eram diabéticos e há projeções para atingir 12,7 milhões de adultos em 2030 (SHAW et al., 2010).

O DM é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica, resultante de defeitos na ação ou secreção da insulina ou ambas (ADA, 2011a).

A hiperglicemia pode provocar danos a longo prazo em diversos órgãos, principalmente nos olhos, rins, coração e vasos sanguíneos. Com isso, há uma grande incidência de aterosclerose e doenças cerebrovasculares em diabéticos. A hipertensão e anormalidades no metabolismo das lipoproteínas também são frequentemente encontradas (ADA, 2011b).

O diabetes é classificado em quatro grupos: diabetes mellitus tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), diabetes gestacional e diabetes devido a outros mecanismos específicos ou doenças (ADA, 2011a).

Cerca de 85% dos pacientes que possuem DM2 possuem resistência à ação da insulina que precede o desenvolvimento de hiperglicemia (GRANT, 2007).

Já, no DM1, a hiperglicemia ocorre devido à destruição auto-imune das células beta do pâncreas resultando na deficiência absoluta de secreção de insulina (GRANT, 2007).

O diagnóstico de DM, de acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA, 2011a) é baseado nos seguintes critérios:

- Hemoglobina glicada (HbA_{1c}) ≥ 6,5%
- Glicemia após 8h de jejum ≥ 126 mg/dL
- Teste de tolerância à glicose após sobrecarga com 75g de glicose com valor ≥ 200 mg/dL
- Medida aleatória da glicose plasmática com valor ≥ 200 mg/dL em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crises hiperglicêmicas.

2.2 Diabetes mellitus tipo 2

O DM2 corresponde a cerca de 90% dos casos de diabetes e afeta mais de 170 milhões de indivíduos em todo mundo (HAOUARI & ROSADO, 2008). Sua frequência varia entre grupos étnicos e está associada à predisposição genética (ADA 2011a).

Ocorre mais frequentemente em mulheres, indivíduos hipertensos ou dislipidêmicos e em pacientes obesos ou que possuem grande parte da gordura corporal concentrada na região abdominal (ADA, 2011a).

Esse tipo de diabetes é caracterizado por uma combinação de resistência à insulina e uma resposta inadequada da secreção compensatória de insulina (ADA, 2011a).

A resistência à insulina é caracterizada por uma redução da sensibilidade à ação da insulina, nos tecidos envolvidos no metabolismo da glicose, incluindo fígado e músculo esquelético. Acredita-se que a resistência no DM2 acarreta um aumento compensatório na secreção de insulina pelas células beta do pâncreas. Além disso, a resistência à insulina ocorre em células envolvidas em doenças vasculares, incluindo células endoteliais, plaquetas, macrófagos e miócitos, estando associada a uma grande variedade de alterações hemostáticas (GRANT, 2007).

2.3 Hemostasia

A hemostasia é um processo fisiológico no qual vários componentes se inter-relacionam, prevenindo a ocorrência de hemorragia ou trombose (ZAGO et al., 2005).

O sistema hemostático é constituído por vasos sanguíneos, plaquetas, proteínas da coagulação, fibrinólise e pelos anticoagulantes naturais. É composto por três fases: primária, secundária e terciária. A fase primária da hemostasia compreende a vasoconstrição reflexa dos vasos, adesão, ativação e agregação plaquetária. Na fase secundária da hemostasia ocorre ativação dos fatores da coagulação e formação do coágulo de fibrina e a fase terciária compreende o sistema fibrinolítico, em que há dissolução do trombo e restauração do fluxo sanguíneo (ZAGO et al., 2005).

2.3.1 Plaquetas

As plaquetas são originadas de megacariócitos da medula óssea e são retiradas da circulação por células retículo endoteliais do baço e fígado (MALARA & BALDUINI, 2012).

Do total de plaquetas presentes no organismo, 70% está na circulação sanguínea, em número de 150.000 a 400.000/mL e 30% no baço. Estas permanecem na circulação sanguínea de 7 a 10 dias e são removidas por células retículo endoteliais do baço e do fígado (ZAGO et al., 2005).

As plaquetas possuem estrutura discóide, dividida em quatro zonas: periférica, sol-gel, organelas e sistema membranar (**Figura 1**). A zona periférica é composta pelas membranas interna e externa. A membrana externa possui receptores que medeiam os processos de adesão, agregação, ativação plaquetária e sinalização bidirecional. Dentre estes estão as glicoproteínas (GP) Ib-IX, IIb/IIIa, IV, VI e receptores de difosfato de adenosina (ADP), epinefrina e TXA₂. Além disso, possui fosfolípidos,

necessários para a ativação de alguns fatores da coagulação. Os fosfolípidos constituem o substrato para a produção de ácido araquidônico (AA) e consequente formação de TXA_2 . A membrana interna possui o sistema canicular aberto, responsável pela troca de moléculas com o meio externo (CASTRO et al., 2006).

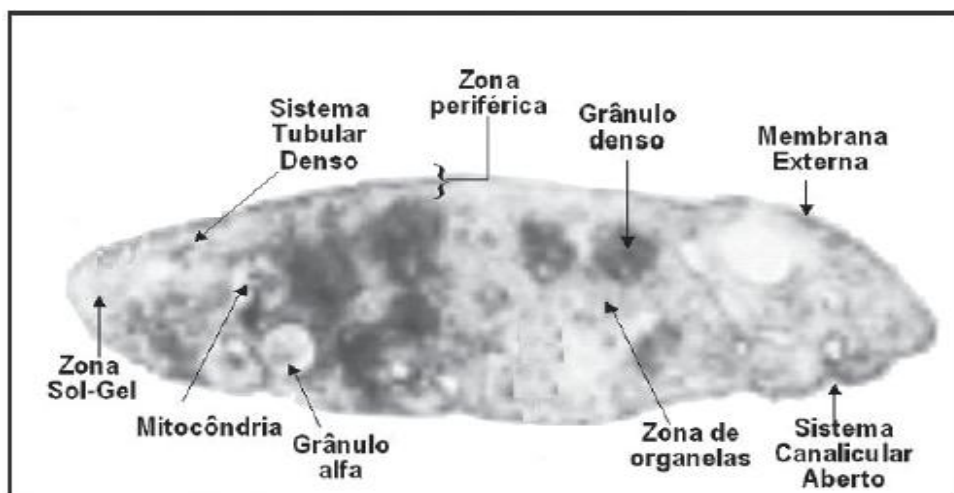


Figura 1 – Estrutura da plaqueta (CASTRO et al., 2006).

A zona sol-gel possui o citoesqueleto que fornece sustentação para a forma discóide e o sistema contrátil, que na plaqueta ativada, permite a mudança desta forma com o prolongamento de pseudópodes, a contração interna e a liberação dos constituintes dos grânulos (ZAGO et al., 2005).

A zona de organelas é constituída por grânulos alfa, grânulos densos, mitocôndrias e lisossomos. Os grânulos alfa, possuem proteínas de adesão como o fator de von Willebrand (FvW), o fibrinogênio e a trombospondina, fatores de crescimento, fatores da coagulação, fator 4 plaquetário, β trombomodulina e inibidor do ativador do plasminogênio. Já os grânulos densos, contêm íons cálcio, trifosfato de adenosina (ATP), ADP e serotonina (CASTRO et al., 2006).

O sistema membranar é constituído pelo sistema tubular denso, que possui íons cálcio, responsáveis pelos eventos contráteis e pelo sistema enzimático, envolvido na síntese de prostaglandinas (ZAGO et al., 2005).

Quando a integridade do sistema vascular é rompida, as plaquetas, através dos receptores de adesão (GPIb-IX e GPVI), interagem com os componentes da matriz extracelular expostos na parede do vaso sanguíneo (**Figura 2**). Após a lesão vascular, ocorre interação entre o FvW e o colágeno subendotelial e a GPIb-IX plaquetária liga-se ao FvW, possibilitando a adesão das plaquetas na superfície vascular. Assim, será formada uma monocamada de células que cobrirá o tecido exposto (ANDREWS & BERNDT, 2004; ZAGO et al., 2005).

Após a adesão ocorre a exposição da GPIIb/IIIa plaquetária e formação de agregados entre as plaquetas através da ligação dessa glicoproteína com o fibrinogênio. A adesão e agregação plaquetária induzem uma sinalização celular que leva à liberação de constituintes dos grânulos plaquetários e a síntese de agonistas, promovendo a ativação e o recrutamento de mais plaquetas para o local da lesão (HAOUARI & ROSADO, 2008).

A subunidade β_3 (GPIIIa) da glicoproteína plaquetária GPIIb/IIIa pode apresentar um polimorfismo, na posição 33, que consiste na substituição de uma leucina (PI^{A1}) por uma prolina (PI^{A2}), resultante de uma única transição nucleotídica no gene da GPIIIa ($C^{155} \rightarrow T$) (NEWMAN et al., 1989). Estudos anteriores relataram que esse polimorfismo está associado ao aumento da agregação plaquetária e pode contribuir para resistência ao AAS (COOKE et al., 2006; PAPP et al., 2005; SZCZEKLIK et al., 2000). Entretanto, essa associação é controversa, já que em alguns estudos esta não foi encontrada e em outros a existência desse polimorfismo foi associada a uma maior sensibilidade ao AAS (LEV et al., 2007; MICHELSON et al., 2000; PAMUKCU et al., 2005).

Os principais agonistas plaquetários são o TXA_2 , colágeno, trombina, epinefrina, serotonina, ADP, vasopressina e o fator de ativação plaquetária. Esses agonistas interagem com receptores plaquetários que estão associados à proteína G. Após a interação entre o agonista e o receptor plaquetário, o sistema de proteínas G irá promover a ativação da fosfolipase C, que hidrolisa o fosfatidilinositol da membrana plaquetária, gerando diacilglicerol (DG) e o inositol-trifosfato (IP3). O DG ativa a proteína quinase C promovendo a alteração da conformação da GPIIb/IIIa, e possibilitando assim a sua ligação com o fibrinogênio no processo de agregação

plaquetária. Já o IP₃, promove a mobilização do cálcio intracelular. O cálcio contribui para a ativação da fosfolipase A₂, e liberação do ácido araquidônico (AA) da membrana fosfolipídica. O AA é convertido em endoperóxidos (PGG₂/PGH₂) pela enzima ciclooxigenase plaquetária. Esses metabólitos são convertidos pela tromboxano sintetase em TXA₂ (RAO & FAREED, 2012; ZAGO et al., 2005).

O TXA₂ produzido é rapidamente eliminado da circulação. Seu produto de hidratação quimicamente estável, TXB₂, é metabolizado por meio de desidrogenação e beta-oxidação resultando na formação de 11-dhTXB₂ e 2,3-dinor-TXB₂ respectivamente (PATRONO, 1990).

Esses metabólitos possuem diferentes polaridades, o que reflete na excreção urinária dos mesmos. O 11-dhTXB₂ é menos polar e, portanto, é excretado em uma taxa superior quando comparado ao 2,3-dinor-TXB₂ (LAWSON, et al. 1986).

Em resposta aos agonistas, as plaquetas produzem também grandes quantidades de ROS. Estas promovem o aumento na expressão das glicoproteínas plaquetárias, da mobilização do cálcio, ativam a proteína tirosina quinase e estimulam a síntese de TXA₂ (HAOUARI & ROSADO, 2008).

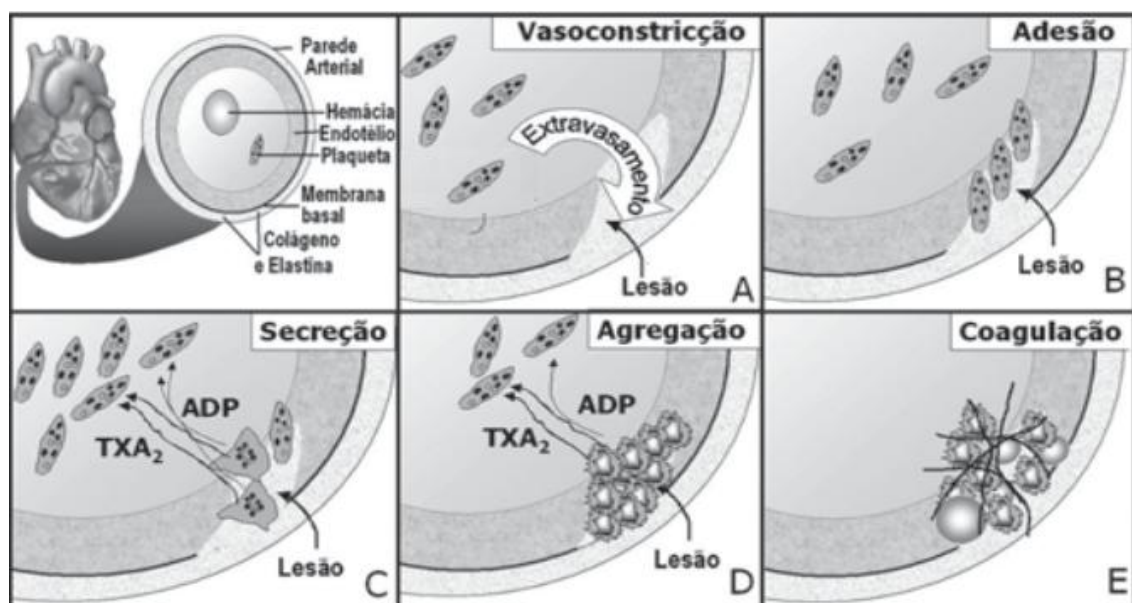


Figura 2 – Participação das plaquetas no processo de hemostasia durante a formação do tampão plaquetário. A - processo de injúria (lesão) com exposição de agonistas plaquetários; B - adesão das plaquetas ao subendotélio; C - mudança de forma da plaqueta com secreção

dos grânulos; D - ligação plaqueta/plaqueta; E: depósito da fibrina sobre o tampão plaquetário (CASTRO et al., 2006).

A regulação negativa das plaquetas é essencial para prevenir a trombose. O óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI₂), liberados pelas células endoteliais, são potentes vasodilatadores e promovem a inibição da agregação e ativação plaquetária. Além disso, a insulina inibe a ativação plaquetária ao se ligar a receptores presentes nas membranas das plaquetas, promovendo diminuição da resposta à trombina, ADP, AA, e colágeno. A insulina promove também a liberação do NO e o aumento do número de receptores de PGI₂, na plaqueta (HAOUARI & ROSADO, 2008; SCHNEIDER, 2009).

As plaquetas de indivíduos diabéticos são menos sensíveis a essa ação da insulina, sendo que no DM2 ocorre uma diminuição da afinidade e do número de receptores para insulina, o que pode justificar a maior ativação plaquetária observada nestes pacientes (HAOUARI & ROSADO, 2008; KAKOUROS et al., 2011; SCHNEIDER, 2009).

2.3.2 Endotélio Vascular

A integridade do endotélio vascular é fundamental para a manutenção da hemostasia. Além de gerar uma barreira física entre a parede do vaso e seu conteúdo luminal, o endotélio secreta mediadores que regulam o tônus vascular e interagem com proteínas e células circulantes para regular a adesão de plaquetas, coagulação e fibrinólise e a adesão de leucócitos à superfície de células endoteliais (GRANT, 2007).

Em pacientes diabéticos ocorre alteração na função das células endoteliais. Há aumento na expressão de moléculas de adesão e nas concentrações de FvW e selectina E, o que contribui para o desenvolvimento de aterosclerose, inflamação na parede do vaso, e desenvolvimento de lesão. Além disso, a glicação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) provoca diminuição na produção de NO. Assim, o mecanismo de dilatação vascular e a inibição da ativação plaquetária são prejudicados (SOBEL & SCHNEIDER, 2004).

Fatores associados à resistência à insulina, como hipertensão, níveis elevados de LDL (lipoproteína de baixa densidade) e de ácidos graxos livres também são associados com o desenvolvimento de disfunção endotelial (GRANT, 2007).

2.3.3 Cascata da Coagulação

Em 1964, Macfarlane, Davie e Ratnoff propuseram o modelo clássico da cascata da coagulação. Neste modelo a coagulação é dividida em uma via extrínseca e uma intrínseca (**Figura 3**) Essas vias convergem para a formação de uma via comum, com geração do complexo protrombinase desencadeando a formação de trombina e subsequentemente fibrina (DAVIE & RATNOFF, 1964; MACFARLANE, 1964).

Na via extrínseca, o fator VII (FVII) plasmático é ativado na presença de fator tecidual (FT) formando o complexo FVII ativado/FT (FVIIa/FT), que ativa o fator X (FX). Na via intrínseca, quando o sangue entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas, ocorre ativação do fator XII (FXII). Esse processo requer a presença de pré-caliceína e cininogênio de alto peso molecular. O fator XIIIa ativa o fator XI (FXI) que, por sua vez ativa o fator IX (FIX). O FIXa na presença do fator VIII (FVIII), ativado por traços de trombina, e em presença de íons cálcio ativa o FX (HOFFMAN, 2003 e revisado por FERREIRA et al., 2010).

A formação do complexo protrombinase ocorre nas plaquetas, monócitos, e em outras membranas fosfolipídicas. Esse complexo é formado pelos fatores V e X ativados (FVa e FXa), íons cálcio e fosfolípidos. Este age sobre a protrombina (FII) convertendo-a em trombina e levando à formação dos fragmentos 1+2 da protrombina (F1+2). A trombina promove a clivagem do fibrinogênio (FI) levando à formação de fibrina e dos fibrinopeptídeos A (FPA) e B (FPB). Posteriormente, é formado um tampão de plaquetas e fibrina (HOFFMAN & MONROE, 2007; SOBEL & SCHNEIDER, 2004).

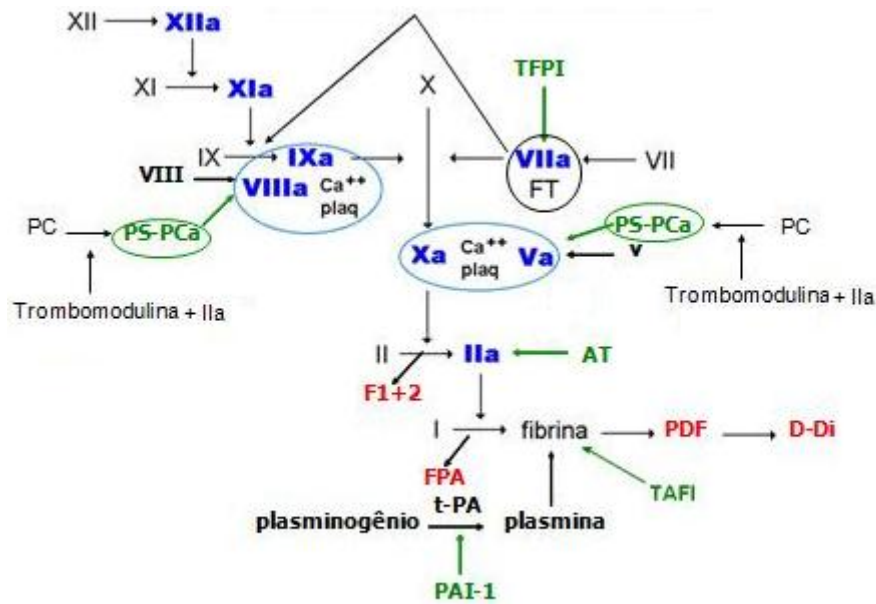


Figura 3 – Representação esquemática do modelo clássico da coagulação com as vias extrínseca, intrínseca e comum da coagulação e fibrinólise. AT - Antitrombina; D-Di - Dímero – D; F1+2 - Fragmento 1+2 da protrombina; FPA - Fibrino peptídeo A; PS - Proteína S; PC - Proteína C; PDF - Produto de degração da fibrina; PAI-1 - Inibidor do ativador do plasminogênio; TAFI - Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina; TFPI - Inibidor da via do fator tecidual.

Nos últimos anos, deficiências nesse modelo clássico tornaram-se evidentes, uma vez que o mesmo não refletia completamente os eventos da hemostasia *in vivo* e não conseguia explicar certos eventos clínicos. Além disso, foi observado que as vias extrínseca e intrínseca não eram vias independentes (HOFFMAN, 2003 e revisado por FERREIRA et al., 2010).

Dessa forma, foi desenvolvido um modelo da cascata da coagulação baseado na interação dos fatores da coagulação com superfícies celulares específicas que substitui o modelo clássico (HOFFMAN, 2003 e revisado por FERREIRA et al., 2010).

De acordo com este novo modelo (**Figura 4**), a coagulação é composta de três fases: iniciação, amplificação e propagação (FERREIRA et al., 2010).

Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares

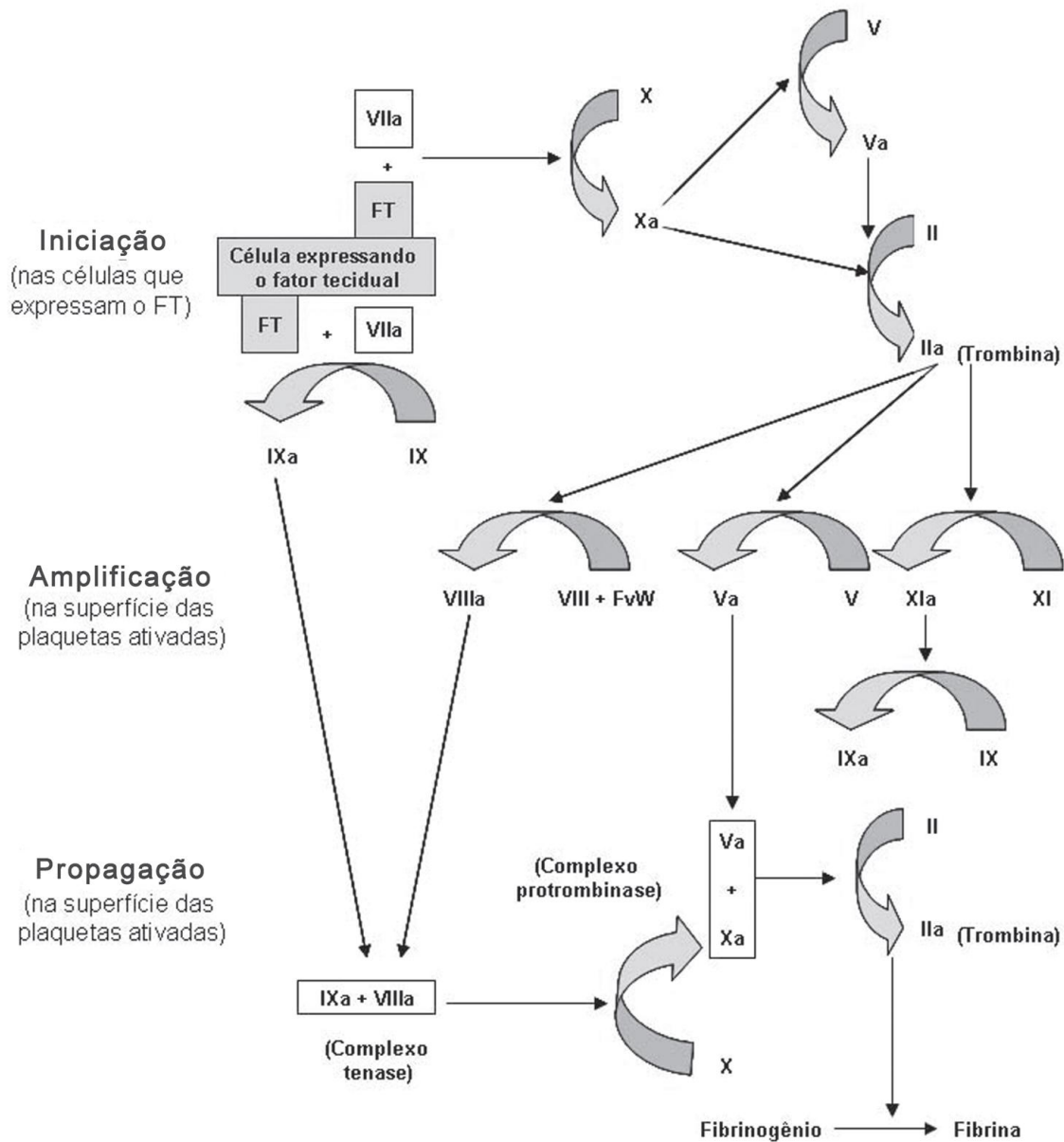


Figura 4 – Representação do modelo da coagulação baseado em superfícies celulares. (HOFFMAN, 2003 e revisado por FERREIRA et al., 2010).

O processo de coagulação é iniciado quando células que expressam FT são expostas ao sangue no local da lesão vascular. O FT está presente na membrana das células do músculo liso vascular, de fibroblastos, monócitos e em micropartículas celulares provenientes de leucócitos e plaquetas (HOFFMAN, 2003 e revisado por FERREIRA et al., 2010).

O FT é uma proteína transmembrana que atua como receptor e cofator para o FVII. Quando o FVII se liga ao FT é convertido em FVIIa. O complexo FVIIa/FT catalisa a ativação de pequenas quantidades do FIX e FX (HOFFMAN & MONROE, 2007).

O FXa, formado nas células que expressam FT, interage com o FVa, íons cálcio e fosfolípidos para formar o complexo protrombinase e transformar pequenas quantidades de protrombina em trombina. A trombina formada é insuficiente para completar o processo de formação do coágulo de fibrina (HOFFMAN, 2003 e revisado por FERREIRA et al., 2010; HOFFMAN & MONROE, 2007).

O FIXa ativado por FVIIa/FT não atua nas células que expressam fator tecidual e não desempenha um papel significativo na fase inicial da coagulação (HOFFMAN & MONROE, 2007). A atuação do FXa é restrita a células que expressam FT porque quando o FXa é dissociado da superfície celular, este é inibido pelo inibidor da via do fator tissular (TFPI). Já o FIXa pode se difundir para superfícies de plaquetas adjacentes porque não é inibido pelo (TFPI) (HOFFMAN & MONROE, 2007).

Na fase de amplificação, uma quantidade suficiente de trombina gerada nas células que expressam FT promove a ativação de plaquetas presentes no local da lesão, que expõe receptores para os fatores da coagulação ativados e liberam FV. Além disso, a trombina promove a ativação dos fatores V, VIII e XI na superfície das plaquetas ativadas e interage com o complexo FVIII/FvW. Esse complexo é dissociado e o FvW medeia a adesão e agregação plaquetárias no sítio da lesão (HOFFMAN, 2003 e revisado por FERREIRA et al., 2010; HOFFMAN & MONROE, 2007).

Já a fase de propagação, primeiramente o FIXa ativado durante a fase de iniciação se liga ao FVIIIa na superfície das plaquetas formando o complexo tenase. Além disso, nessa fase o fator XIa ligado à superfície das plaquetas produz uma quantidade adicional de FIXa (DAVIE, 2003; HOFFMAN, 2003 e revisado por FERREIRA et al., 2010).

O complexo tenase produz FXa que se associa ao FVa, ligado à plaqueta formando o complexo protrombinase, o qual converte a protrombina em grande quantidade de

trombina. Esta é responsável pela formação de um coágulo de fibrina estável (HOFFMAN, 2003 e revisado por FERREIRA et al., 2010; HOFFMAN & MONROE, 2007).

Para controlar a disseminação da ativação da coagulação e evitar a oclusão do vaso, intervêm quatro anticoagulantes naturais (**Figura 2**), o TFPI, a proteína C (PC), a proteína S (PS) e a antitrombina (AT) (HOFFMAN, 2003 e revisado por FERREIRA et al., 2010).

A PC ativada promove a proteólise dos fatores Va e VIIIa. Esta é ativada pela trombina, que está ligada a proteína trombosmodulina. A ERO é um cofator da PC, promovendo o aumento da atividade da PC (HOFFMAN, 2003 e revisado por FERREIRA et al., 2010). Já a AT inibe a atividade da trombina e dos fatores IXa, Xa, XIa e XIIa e o TFPI inibe o complexo FT/FVIIa e o FXa (HOFFMAN, 2003 e revisado por FERREIRA et al., 2010).

O sistema fibrinolítico é responsável pela dissolução do coágulo formado, impedindo a deposição de fibrina que é associada ao desenvolvimento de trombose. Nesse sistema, a plasmina cliva a fibrina em seus produtos solúveis de degradação (**Figura 3**). Dentre os produtos de degradação da fibrina (PDF) está o dímero-D. O plasminogênio é o precursor da plasmina e é ativado pelo ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA) e pelo ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) (DAVIE, 2003; HOFFMAN & MONROE, 2007; SAIGO et al. 2004).

O inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI) e o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) são responsáveis pela inibição do sistema fibrinolítico (**Figura 3**). O TAFI promove a quebra de resíduos carboxiterminais da fibrina, resultando assim na perda de sítios de ligação para o plasminogênio e o t-PA. Já o PAI-1, inibe o t-PA e conseqüentemente a ativação do plasminogênio em plasmina (ZAGO et al., 2005).

O dímero D é um marcador de coagulação e fibrinólise associado a doenças como trombose venosa profunda e aterosclerose, sendo este o menor fragmento de fibrina e indicativo de depósito da mesma nos vasos. No diabetes tem sido relatado

aumento dos níveis de dímero D (ASO et al., 2002; MCBANE et al., 2010; NWOSE et al., 2007).

Os distúrbios de hipercoagulabilidade, presentes nos indivíduos com DM2, relacionam-se, à maior ativação da cascata da coagulação e plaquetas e/ou inibição do processo de anticoagulação natural e estão relacionados ao desenvolvimento de trombose, considerada como sendo uma complicação crônica da doença (CARR, 2001).

O desenvolvimento da doença aterotrombótica é acelerado em indivíduos com DM2. Como resultado, a aterotrombose é a causa da redução de até 30% na expectativa de vida e 80% das mortes entre os pacientes diabéticos (GRANT, 2007; MOREL, 2008).

2.4 Diabetes e hiperatividade plaquetária

A hiperativação das plaquetas está envolvida em complicações cardiovasculares associadas ao DM2, uma vez que a alteração no comportamento das plaquetas contribui para o desenvolvimento de angiopatias observadas no diabetes (HAOUARI & ROSADO, 2008).

As plaquetas de pacientes com DM2 possuem as seguintes alterações: (1) aumento da síntese de TXA₂; (2) diminuição da atividade da enzima NOS; (3) maior produção de ROS; (4) maior concentração intracelular de íons cálcio; (5) diminuição da sensibilidade à insulina, PGI₂ e NO; (6) aumento da sensibilidade aos agonistas plaquetários; (7) aumento na expressão dos receptores selectina-P, GPIb e GPIIb/IIIa; (8) redução na fluidez da membrana devido às alterações na composição de lipídeos ou glicação de proteínas das membranas; (9) aumento na adesão e agregação e (10) aumento no turnover plaquetário. Essas alterações contribuem para a hiperatividade plaquetária (HAOUARI & ROSADO, 2008; KAKOUROS et al., 2011).

Além disso, a hiperglicemia promove o aumento da reatividade plaquetária por três mecanismos diferentes: (1) glicação não enzimática de proteínas da superfície

celular; (2) efeito osmótico da glicose e (3) ativação da proteína quinase C (KAKOUROS et al., 2011; SCHNEIDER, 2009).

Episódios recorrentes de hiperglicemia levam ao aumento das interações não enzimáticas entre o grupo carbonil de açúcares redutores e o grupo amino de proteínas levando a uma cascata de reações que tem como resultado final um grupo heterogêneo de compostos conhecidos como produtos de glicação avançada (AGEs). Alguns AGEs promovem a externalização da fosfatidilserina na membrana plaquetária, o que contribui para a ativação dos fatores da coagulação na superfície das plaquetas, aumentando assim o estado trombogênico. Além disso, a presença de níveis aumentados de proteínas de membrana glicadas causa a diminuição da fluidez da membrana e aumento da sensibilidade plaquetária aos agonistas (KAKOUROS et al., 2011; SCHNEIDER, 2009).

O segundo mecanismo através do qual a hiperglicemia pode aumentar a reatividade plaquetária é pelo efeito osmótico da glicose. A exposição *in vitro* de plaquetas a soluções hiperosmolares promove o aumento de sua reatividade. Já o terceiro mecanismo está relacionado com a ativação da proteína quinase C. A hiperglicemia aguda e crônica promove *in vivo* a ativação desta proteína, um mediador da ativação plaquetária (KAKOUROS et al., 2011; SCHNEIDER, 2009).

Os fatores descritos acima podem estar relacionados a uma resposta inadequada aos agentes antiplaquetários, como o AAS, medicamento utilizado por um grande número de pacientes diabéticos (KAKOUROS et al., 2011).

2.5 Micropartículas de plaquetas

As micropartículas foram descritas, por Wolf, em 1967, o qual relatou a presença de fragmentos da membrana das plaquetas no plasma, os quais ele denominou de “poeira de plaquetas”.

Além das plaquetas, leucócitos, células endoteliais e eritrócitos também liberam, na circulação, micropartículas originados da membrana plasmática. As micropartículas derivadas das plaquetas (MP) constituem aproximadamente 70% a 90% das

micropartículas presentes na corrente sanguínea. As MP podem ser formadas a partir de plaquetas ativadas ou durante o envelhecimento e destruição das mesmas. Estas possuem os mesmos receptores de superfície da célula de origem (AYERS et al., 2010; ITALIANO et al., 2010; NOMURA et al., 2008).

A membrana das plaquetas é formada por uma bicamada lipídica que contém diferentes tipos de fosfolípidos, como a fosfatidilserina, fosfatidietanolamina, fosfatidilcolina e esfingomiéline. Esses fosfolípidos são distribuídos assimetricamente na membrana. A fosfatidilcolina e esfingomiéline, fosfolípidos sem carga, estão presentes no exterior da bicamada enquanto no interior estão localizados a fosfatidilserina e a fosfatidietanolamina que possuem carga negativa (MOREL et al., 2008; NOMURA et al., 2008).

Durante ativação plaquetária e formação das MP ocorre uma mudança na distribuição dos fosfolípidos ao longo da membrana e a fosfatidilserina e a fosfatidietanolamina, fosfolípidos de carga negativa, são expostas na superfície celular. A formação de bolhas na membrana plaquetária permite a liberação das vesículas, caracterizando as MP (MOREL et al., 2008; NOMURA et al., 2008).

Assim como as plaquetas, as MP possuem na superfície glicoproteínas como a GP Ib (CD42b), GPIIb/IIIa (CD41), e GPIIb/IIIa (CD41) que são amplamente utilizados como marcadores para identificação das mesmas (HORSTMAN & AHN, 1999; NOMURA et al., 2008; SILJANDER, 2011).

Além disso, podem ser encontradas nas MP substâncias como a trombospondina, fator 4 plaquetário, fator ativador de plaquetas, interleucina 1, β -tromboglobulina e actina (HORSTMAN & AHN, 1999).

Assim como as plaquetas, as MP possuem atividade pró-coagulante e estão envolvidas no desenvolvimento da aterosclerose no diabetes. As MP se ligam ao FT, sendo capazes de iniciar o processo de coagulação. Além disso, estas possuem fosfolípidos com carga negativa que permitem a ligação do FVa, FVIIIa e FIXa e a formação do complexo protrombinase, contribuindo para a ativação da cascata da

coagulação e levando à formação de trombina; (BALASUBRAMANIAM et al., 2012; HORSTMAN et al., 2004; ITALIANO et al., 2010; MOREL et al., 2008).

As MP também são capazes de se ligar ao subendotélio vascular e ao fibrinogênio através da GPIIb/IIIa e se agregar com plaquetas (BALASUBRAMANIAM et al., 2012; ITALIANO et al., 2010). Além disso, experimentos realizados *in vitro* comprovaram que as MPs podem sintetizar TXA₂ a partir do AA transferido das células endoteliais para a MPs (PFISTER, 2004).

2.6 Estresse oxidativo

A produção de ROS e espécies reativas do nitrogênio são observadas em diversas condições fisiológicas, tais como a produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. As ROS são produzidas por células endoteliais, monócitos, neutrófilos e plaquetas e distribuem-se em dois grupos, os radicalares, incluindo a hidroxila, superóxido, peroxila e alcoxila; e os não-radicalares, incluindo o oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Já o NO, óxido nítrico, ácido nítrico, nitritos, nitratos e peroxinitritos são espécies reativas do nitrogênio (BARREIROS & DAVID, 2006; FREEDMAN, 2008; VIOLI & PIGNATELLI, 2012).

O excesso de radicais livres produzidos pelo organismo pode ser combatido pelos antioxidantes endógenos ou absorvidos da dieta. Os antioxidantes endógenos podem agir enzimaticamente, como por exemplo, a glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase ou, não enzimaticamente como o ácido úrico, glutathione, peptídeos de histidina e proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina). Além destes, o organismo utiliza antioxidantes provenientes da dieta como o *α*-tocoferol (vitamina- E), β -caroteno (pró-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina- C), e compostos fenólicos dos quais se destacam os flavonóides e poliflavonóides (BARREIROS & DAVID, 2006; DOTAN et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2007).

O estresse oxidativo é resultante do desequilíbrio entre a concentração de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio e a capacidade antioxidante do organismo. O aumento da produção de ROS e espécies reativas do nitrogênio e a ausência de um

aumento equivalente de uma resposta antioxidante define um estado de estresse oxidativo (DOTAN et al., 2004).

A produção de ROS em excesso, apresenta efeitos prejudiciais ao organismo, tais como a peroxidação dos lipídeos de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e ao DNA (BARREIROS & DAVID, 2006).

A peroxidação lipídica é o processo através do qual as ROS atacam os ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídeos de membrana das células, desintegrando-as e permitindo assim a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Na peroxidação lipídica (**Figura 5**), ácidos graxos são convertidos a radicais lipídicos ($L\cdot$) que podem reagir com oxigênio molecular, gerando um radical peróxido lipídico insaturado ($LOO\cdot$). Esse radical pode receber um próton de um doador e assim gerar um hidroperóxido do ácido graxo insaturado como produto primário ($LOOH$). Ao mesmo tempo, o doador de hidrogênio se torna um radical que pode por sua vez ativar outro substrato. O hidroperóxido do ácido graxo pode se decompor e originar alcanos e aldeídos como o malondialdeído (MDA) (DOTAN et al., 2004; HERMES-LIMA et al., 1995).

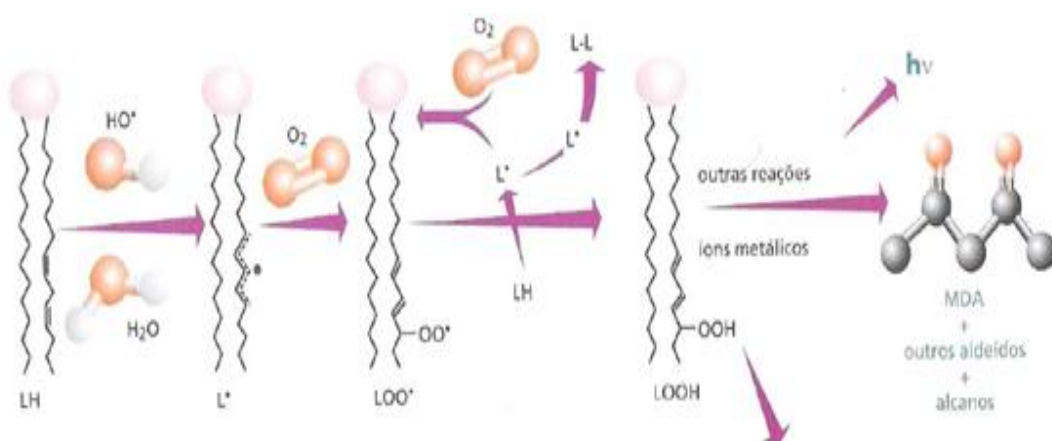


Figura 5 – Peroxidação lipídica e produtos secundários formados (AUGUSTO, 2006).

O NO pode reagir com o radical peróxido lipídico gerado na peroxidação lipídica, formando o peroxinitrito, o que resulta na diminuição da biodisponibilidade do NO e

contribui para a ativação plaquetária. Além disso, o peroxinitrito, um potente agente oxidante, contribui para aumentar o estresse oxidativo (ALEXANDRU et al., 2010; FREEDMAN, 2008).

O peróxido de hidrogênio e o radical peróxido estão envolvidos no aumento da mobilização do cálcio observado nas plaquetas de indivíduos com DM2, levando à hiperativação e hiperagregação plaquetária (REDONDO, 2005). As plaquetas ativadas produzem ROS, que são pró-trombóticas e contribuem para a propagação da ativação plaquetária, através do aumento da ativação da GPIIb/IIIa (FREEDMAN, 2008; VIOLI & PIGNATELLI, 2012). Além disso, as plaquetas de indivíduos com diabetes possuem menores níveis de antioxidantes (HAOUARI & ROSADO, 2008).

O estresse oxidativo se relaciona com o desenvolvimento e a progressão do diabetes. No DM2 a hiperglicemia, o aumento da produção de ROS e da peroxidação lipídica, contribui para a ativação plaquetária, aumento da formação de MP e consequente risco de desenvolvimento de eventos trombóticos (HAOUARI & ROSADO, 2008; MEDINA et al., 2007; VAZZANA et al., 2012).

2.7 Diabetes e o uso do ácido acetilsalicílico

O AAS inibe a adesão e agregação plaquetária, através do bloqueio da produção do TXA_2 (**Figura 6**). Esse medicamento promove a acetilação da enzima COX-1 na serina, posição 529, impedindo assim a ligação do AA ao sítio ativo da enzima plaquetária, bloqueando a produção de TXA_2 . A inibição da COX -1 pelo AAS é irreversível e saturável em baixas doses (HAMBERG et al., 1975; ROCCA & PETRUCCI, 2012; ROTH & MAJERUS, 1975; SMITH & WILLIS, 1971; VANE, 1971).

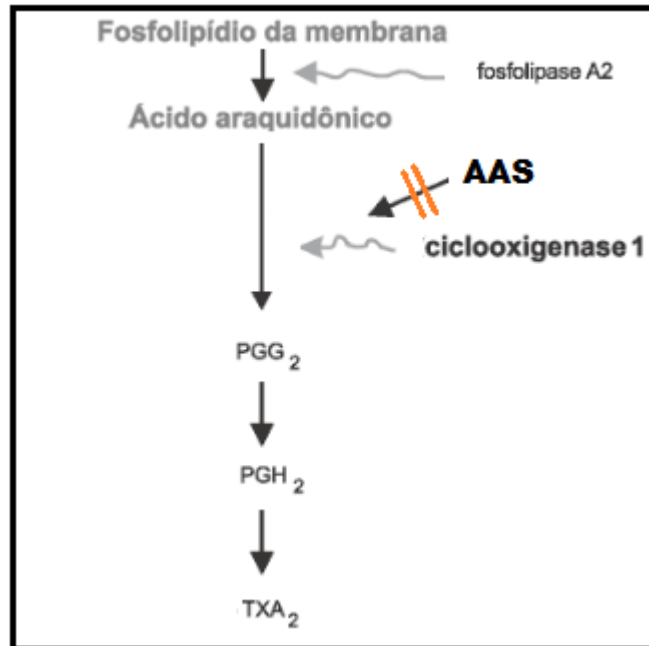


Figura 6 – Inibição da formação do tromboxano A₂ (TXA₂) pelo AAS.

As enzimas COX-1 e ciclooxigenase-2 (COX-2) estão presentes em diferentes tecidos. A COX-1 é expressa no retículo endoplasmático da maioria das células e produz prostaglandinas que são responsáveis pela hemostasia vascular, proteção da mucosa gástrica e pela manutenção do fluxo sanguíneo renal. A expressão da COX-2 é induzida nas células endoteliais, nos macrófagos e monócitos pela inflamação e fatores de crescimento e está envolvida em processos patológicos. Esta também está presente nas plaquetas e pode contribuir para síntese de TXA₂ (TANTRY et al., 2009).

A presença de polimorfismos na COX-1 pode modificar a atividade da enzima e conseqüentemente a resposta ao AAS. O polimorfismo mais estudado é o C50T que consiste em uma substituição não sinônima de uma prolina por uma leucina, na posição 17 (HALUSHKA et al, 2003; MARÍN et al., 2009).

O AAS é absorvido no estômago e intestino delgado e exerce o seu efeito (acetilação da COX-1) na circulação portal. Possui uma meia-vida plasmática de 20 minutos e é biotransformado na forma inativa (ácido salicílico) por esterases do plasma, intestino e fígado. A biodisponibilidade do AAS é de aproximadamente 50% da dose administrada. O efeito do AAS permanece cerca de 10 dias, tempo de

retirada das plaquetas da circulação (PIGNONE & WILLIAMS, 2010; ROCCA & PETRUCCI, 2012).

A eficácia da baixa dose de AAS (75-162 mg) como um agente antiplaquetário é resultante de duas características principais da droga, inibição irreversível da COX-1 nas plaquetas e efeito pré-sistêmico. Como o volume de sangue portal é baixo, as plaquetas são expostas a uma concentração de AAS relativamente elevada, mesmo em baixas doses (PIGNONE & WILLIAMS, 2010).

O tratamento de diabéticos com AAS (100-325 mg/dia) é recomendado para prevenção primária em pacientes que têm grande risco de desenvolver doença cardiovascular. Isso inclui a maioria dos homens com idade superior a cinquenta anos e mulheres acima de sessenta que possuem pelo menos um dos seguintes fatores de risco: histórico familiar de doença cardiovascular, hipertensão, tabagismo, dislipidemia ou albuminúria (ADA, 2011b).

A inibição da produção de TXA₂ pelo AAS pode ser determinada pela medida das concentrações do TXB₂ ou de seus metabólitos, 2,3-dinor-TXB₂ e o 11-dhTXB₂ no plasma ou na urina (FITZGERALD & PIRMOHAMED, 2011; LAWSON, et al. 1986).

2.8 Resistência ao ácido acetilsalicílico

Nem todos os pacientes são beneficiados com o uso do AAS. Estima-se que 25 a 40% dos pacientes possam ser resistentes ao seu efeito. Este fato tem sido relacionado com uma inadequada proteção contra a ocorrência de eventos tromboembólicos em pacientes com DM2 (AJJAN et al., 2008; EIKELBOOM et al., 2008; FITZGERALD & PIRMOHAMED, 2011; TRAN et al., 2007).

Segundo Pulcinelli et al. (2009), para que seja alcançada uma inibição plaquetária relevante, a produção de TXB₂ deve ser reduzida em pelo menos 95%.

Pacientes que apesar do tratamento com AAS continuam a ter eventos recorrentes podem ser considerados como resistentes ao AAS, assim como aqueles que não

demonstraram supressão na ativação plaquetária em testes *in vitro* (HANKEY & EIKELBOOM, 2006; SZCZEKLIK et al., 2005).

Existem vários testes *in vitro* utilizados para detectar a resistência ao AAS. Alguns testes como a dosagem plasmática ou urinária do 2,3-dinor-TXB₂, do 11-dhTXB₂ e do TXB₂ avaliam a inibição da produção de TXA₂. Outros como o teste de agregação plaquetária e o PFA-100 avaliam a função plaquetária e não são específicos para detectar a inibição da COX-1. A reprodutibilidade e a correlação entre esses testes são baixas (FITZGERALD & PIRMOHAMED, 2011), no entanto, a maioria dos testes utilizados associa a ausência da supressão da ativação plaquetária a um risco aumentado de eventos cardiovasculares ou mortalidade (KRASOPOULOS et al., 2008; SNOEP et al., 2007).

Estudos recentes demonstraram que diabéticos são menos propensos a se beneficiarem do uso do AAS para prevenção primária de doenças cardiovasculares. Alguns estudos randomizados avaliaram a eficácia de baixas doses de AAS na prevenção primária em pacientes com DM2 e concluíram que esse medicamento não reduz o risco de ocorrência de eventos cardiovasculares (DE BERARDIS et al., 2009; OGAWA et al., 2008).

O estudo intitulado “*Japanese Primary Prevention of Atherosclerosis With Aspirin for Diabetes*” (JPAD) (OGAWA et al., 2008) é multicêntrico, prospectivo e randomizado. Neste, os pacientes foram distribuídos em dois grupos, sendo que um recebeu entre 81-100 mg de AAS e o outro não recebeu o medicamento. Dos 154 eventos ateroscleróticos ocorridos, 68 ocorreram no grupo com AAS e 86 em pacientes do grupo sem AAS. Nesse estudo foi comprovado que a administração de baixas doses de AAS não reduz o risco de ocorrência de eventos cardiovasculares.

Já o estudo “*Aspirin for primary prevention of cardiovascular events in people with diabetes: meta-analysis of randomized controlled trials*” (DE BERARDIS et al., 2009) consiste em uma meta-análise de estudos randomizados controlados. Foram incluídos nesse estudo ensaios clínicos com pacientes diabéticos sem doença cardiovascular pré-existente. Esses pacientes foram distribuídos em dois grupos, um que utilizava AAS e o outro que recebeu placebo. Quando comparado estes grupos,

não foi observada a redução significativa do risco de ocorrência de eventos cardiovasculares (cinco estudos, 9.584 participantes; risco relativo 0,90; intervalo de confiança 0,81-1,00), de mortalidade devido a evento cardiovascular (quatro estudos, n = 8.557; RR 0,94; IC 0,72-1,23) e de mortalidade devido a outras causas (quatro estudos, n = 8,557; RR 0,93; IC 0,82-1,05). Foi encontrada heterogeneidade significativa nas análises para infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. O AAS reduziu significativamente o risco de infarto do miocárdio nos homens (0,57; 0,34-0,94), mas não em mulher (1,08; 0,71-1,65; p para interação = 0,056). Concluiu-se que não foi comprovado benefício do uso de AAS na prevenção primária de eventos cardiovasculares em pacientes com diabetes e que o sexo pode ter influência no efeito obtido.

Algumas causas de falha no tratamento com AAS são: (1) administração de uma dose inadequada do medicamento; (2) falta de adesão ao tratamento; (3) presença de polimorfismos no gene que codifica a GPIIIa e a enzima COX-1; (4) elevado *turnover* plaquetário que introduz na circulação sanguínea plaquetas recém-formadas que não sofreram ação do AAS; (5) ocorrência de competição entre o AAS e os anti-inflamatórios não esteroidais pelo sítio de ligação da COX-1; (6) formação plaquetária de TXA₂ a partir da PGH₂ liberada por outras células sanguíneas; (7) produção de TXA₂, pela COX -2 presente em macrófagos e monócitos e (8) presença de vias alternativas de ativação plaquetária. Além disso, a dislipidemia, inflamação e o estado de hipercoagulabilidade presentes no diabetes contribuem para o aumento na ativação plaquetária (AJJAN et al., 2008; CATTANEO, 2004; TRAN et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do uso de ácido acetilsalicílico sobre a ativação plaquetária e perfil oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 2.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o efeito do ácido acetilsalicílico sobre os níveis plasmáticos de 2,3-dinor tromboxano B₂;
- Determinar o efeito do ácido acetilsalicílico sobre o perfil de micropartículas de plaquetas (marcadores de ativação plaquetária);
- Padronizar os protocolos de quantificação do MTT e do TBARS;
- Determinar o efeito do ácido acetilsalicílico sobre os níveis séricos de MTT e TBARS;
- Correlacionar os níveis plasmáticos de 2,3-dinor tromboxano B₂ e urinários de 11-dihidro tromboxano B₂ com os níveis de micropartículas de plaquetas, TBARS e MTT;
- Relacionar os níveis plasmáticos de 2,3-dinor tromboxano B₂, de micropartículas de plaquetas, do MTT e do TBARS com dados clínicos dos pacientes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do Estudo

Para realização deste estudo foram utilizadas amostras de sangue de 81 pacientes com diagnóstico de DM2, de ambos os sexos e idade variada. Cada participante foi avaliado em dois momentos: o primeiro, imediatamente antes do uso do AAS e, o segundo, com o mínimo de quinze dias de uso diário de AAS na dosagem de 100mg, após o almoço. Foram comparados os resultados dos dois momentos.

As amostras utilizadas nesse projeto foram obtidas pela Dr^a Lillian Harboe Gonçalves para o desenvolvimento de sua tese de doutorado, no período compreendido entre junho de 2008 e março de 2010. Os pacientes foram selecionados pela Dra. Adriana Aparecida Bosco, médica endocrinologista do Centro de Especialidades Médicas da Santa Casa de Belo Horizonte, segundo critérios estabelecidos para diagnóstico deste distúrbio metabólico.

4.2 Critérios de inclusão

- Diagnóstico clínico de diabetes mellitus, segundo os critérios da Associação Americana de Diabetes vigentes em 2008, que preconizava: glicemia após jejum de oito horas igual ou superior a 126mg/dL, glicemia casual (feita a qualquer hora) igual ou superior a 200mg/dL na presença de sintomas clínicos e/ou curva de tolerância à glicose após sobrecarga com 75g de glicose com valor superior a 200mg/dL no ponto referente a 120 minutos (ADA, 2006).

- Não estar em uso de AAS nos quinze dias que antecederam o momento da primeira coleta de sangue.

- Indicação de uso diário e constante de 100mg de AAS para prevenção primária de eventos aterotrombóticos, com início após o almoço do dia da primeira coleta.

4.3 Critérios de exclusão

- Uso de antiagregante plaquetário, anticoagulação oral, heparina fracionada ou não, antiinflamatórios não esteroidais, corticóides, antibióticos e antiácidos (inibidores da bomba de prótons).
- Ocorrência prévia de evento aterotrombótico.
- Evidências ou suspeita de doença renal crônica (relato de acompanhamento por nefrologista, hemodiálise, valores elevados de creatinina sérica, depuração de creatinina alterada), insuficiência hepática (relato de acompanhamento por hepatologista, função hepática alterada do ponto de vista laboratorial), doença infecciosa aguda, inflamatória, autoimune, mieloproliferativa ou neoplasias.
- Ter sido submetido à cirurgia nos seis meses anteriores ao início de estudo.
- Gravidez, puerpério e lactação.

4.4 Casuística

Os participantes do estudo foram selecionados entre os pacientes atendidos no Ambulatório de Diabetes Mellitus tipo 2 do Centro de Especialidades Médicas da Santa Casa de Belo Horizonte com diagnóstico prévio de DM2.

Os pacientes que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão e que, após esclarecimento sobre a pesquisa, concordaram em participar do estudo, responderam a um questionário destinado a fornecer informações para o preenchimento da ficha clínica (Apêndice A) e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com a Resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde (Apêndice B). Informações adicionais foram obtidas no prontuário do paciente.

Após consulta médica no ambulatório, o paciente que ainda não fazia uso de AAS, mas tinha indicação clínica, recebeu a receita, pelo médico assistente de AAS na dosagem de 100mg.

A primeira coleta de sangue foi realizada antes do início da administração de AAS. O paciente foi orientado a iniciar o uso de AAS após o almoço do dia desta coleta e manter a medicação pelos próximos quinze dias, quando seria feita a próxima coleta.

O paciente foi esclarecido quanto ao jejum necessário para a primeira coleta (doze horas) e, segunda coleta (oito horas). Todas as informações foram fornecidas verbalmente e por escrito. Foi feito pelo menos um contato telefônico com o paciente no intervalo entre as duas coletas para reforçar a necessidade do uso do medicamento e lembrá-lo do dia da segunda coleta.

Aqueles pacientes que já faziam uso de AAS na dosagem de 100mg diários foram avaliados pelo médico assistente quanto à possibilidade de suspender o medicamento por quinze dias. Aqueles pacientes autorizados a fazê-lo tiveram sua primeira coleta de sangue agendada para quinze dias depois e foram acompanhados neste intervalo de tempo por contato telefônico. A partir da primeira coleta de sangue, o procedimento foi o mesmo para todos os pacientes.

4.5 Variáveis descritivas

Dados referentes a sexo, idade, peso, altura, tabagismo, uso de insulina e outros hipoglicemiantes, além de estatina e outros medicamentos, bem como diagnóstico de hipertensão e diabetes mellitus e tempo de doença foram obtidos por meio de entrevista e de consulta em prontuário médico.

O paciente foi classificado quanto ao tabagismo (sem considerar consumo diário) como fumante, ex-fumante e não fumante de qualquer cigarro, charuto ou similar. Considerou-se fumante o indivíduo que tinha o hábito no momento da inclusão no estudo ou que houvesse abandonado o hábito até um ano antes. Classificou-se como ex-fumante quem houvesse abandonado o hábito há mais de um ano. Na categoria de não-fumantes foram incluídos aqueles que nunca fumaram (ALMENOFF et al., 1995).

Considerou-se hipertenso o indivíduo que estivesse em uso de medicação anti-hipertensiva na época da entrevista. A ocorrência de intercorrências clínicas no período de quinze dias entre as duas coletas foi acompanhada por contato telefônico.

4.6 Variáveis analíticas

No presente estudo foram incluídas as análises descritas abaixo:

- 2,3-dinor tromboxano B₂ (marcador da produção de tromboxano A₂);
- Micropartículas de plaquetas (marcador de ativação plaquetária);
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT), marcador da capacidade antioxidante do soro;
- Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), marcador de peroxidação lipídica.

Os resultados encontrados para essas variáveis foram comparados com os seguintes dados obtidos durante o desenvolvimento experimental da tese da Dr^a Lillian Harboe Gonçalves: contagem de plaquetas, hemoglobina glicada, colesterol LDL, polimorfismo C50T no gene da COX-1, alelo P1^{A2} do polimorfismo no gene da glicoproteína plaquetária IIIa, 11-dihidro TXB₂ urinário e dímero D (GONÇALVES, 2010).

4.7 Amostras biológicas

Para realização do presente estudo, foram utilizadas amostras de soro e plasma coletadas no período compreendido entre junho de 2008 a março de 2010.

As amostras foram coletadas em tubos da marca SARSTED[®] com citrato de sódio e em tubos sem anticoagulante e foram centrifugadas a 1100 xg por 15 minutos. O

plasma e o soro foram aliquotados em tubos do tipo *ependorf* devidamente identificados e estocados a -80°C até o momento da análise.

4.8 Métodos

4.8.1 Marcador da produção de tromboxano A_2 (2,3-dinor tromboxano B_2)

As amostras de plasma citratado de 65 participantes do estudo foram utilizadas para a dosagem plasmática do 2,3-dinor-TXB₂, a qual foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando-se o kit 2,3-dinor-TXB₂ EIA (Cayman Chemical Company®, Ann Arbor, MI, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Esse método baseia-se na competição entre o 2,3-dinor-TXB₂ e o conjugado 2,3-dinor-TXB₂-acetilcolinesterase (AChE) por um número limitado de sítios de ligação ao anti-soro de coelho específico para 2,3-dinor-TXB₂. Como a concentração de conjugado é constante e a de 2,3-dinor-TXB₂ é variável, a quantidade de conjugado capaz de se ligar ao anti-soro de coelho é inversamente proporcional à concentração de 2,3-dinor-TXB₂ presente no poço da placa. O complexo anti-soro de coelho-2,3-dinor-TXB₂ (livre ou conjugado) se liga ao anticorpo monoclonal de camundongo IgG anticoelho que reveste os poços da placa. A placa é lavada para remover qualquer reagente que não esteja ligado e o reagente de Ellman's (que contém o substrato da AChE) é adicionado ao poço. O produto dessa reação enzimática possui uma cor amarela que absorve luz em 412 nm. A intensidade da cor é determinada espectrofotometricamente e é proporcional à quantidade de conjugado ligado ao poço, que é inversamente proporcional à quantidade de 2,3-dinor-TXB₂ livre presente no poço durante a incubação.

4.8.2 Isolamento das micropartículas de plaquetas e análise por citometria de fluxo

As MP de 81 amostras de plasma foram analisadas em citômetro de fluxo. A análise por citometria de fluxo é o método mais utilizado para caracterizar as micropartículas devido à sua capacidade de quantificar e identificar a origem celular da população em estudo (HORSTMAN & AHN, 1999).

Antígenos presentes na membrana das MP podem ser detectados utilizando anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos. Essa técnica permite a identificação e a quantificação das MP pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência (NAKAGE et al., 2005).

As amostras de plasma citratado foram centrifugadas por 3 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente para obter no sobrenadante as micropartículas. Cuidadosamente, 100 µL do sobrenadante foram aspirados e colocados em outro tubo contendo 300 µL de solução de PBS com heparina e citrato (diluição 1:3). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 90 minutos a 15°C. Depois da centrifugação o sobrenadante foi removido e o precipitado de MP ressuspenso em 100 µL do tampão de anexina V (BD Biosciences, Califórnia, EUA).

Em seguida, 200 µL da amostra foram transferidos para a placa de ELISA e foram adicionados 5 µL do anticorpo monoclonal CD41a marcado com PERCP e 2,5µL de FITC Annexin V. No poço correspondente ao controle de isotipo foram adicionados 2,5 µL do anticorpo IgG de camundongo conjugado FITC. A mistura foi incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, foram adicionados 300 µL do tampão de anexina V e foi realizada a leitura das amostras. As MP foram adquiridas no citômetro de fluxo (FACScalibur- BD, EUA) e os dados analisados pelo *software FlowJo*. Mais de 100.000 eventos foram adquiridos em cada amostra, para alcançar pelo menos 2.000 eventos.

Para análise dos dados, inicialmente empregaram-se gráficos de tamanho (FSC) versus Granulosidade (SSC) e estabeleceu-se o *gate* para seleção da população de MP. Posteriormente, foram construídos gráficos de Anexina V – FITC versus CD41-PERCP e posicionados quadrantes para determinação da porcentagem de micropartículas de plaquetas (**Figura 7**).

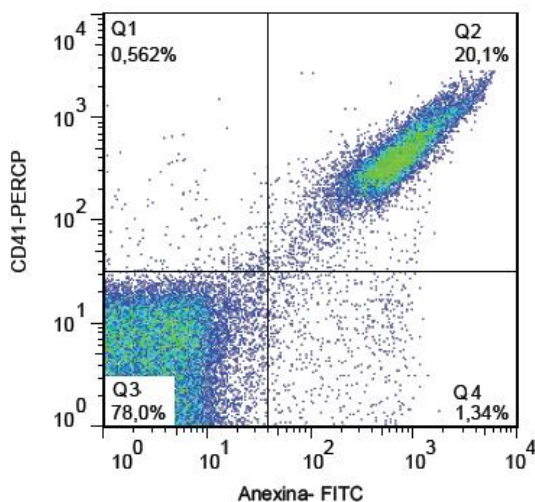


Figura 7 – Quantificação percentual das micropartículas de plaquetas no quadrante superior direito (Q2).

4.8.3 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)

Os marcadores usados para monitorar a peroxidação lipídica pertencem à classe das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A peroxidação lipídica origina produtos secundários como alcanos, aldeídos e isoprostanos que podem ser utilizados para avaliar o status oxidativo de materiais biológicos. Entre os biomarcadores mais avaliados para a peroxidação lipídica estão o malondialdeído (MDA) e o F2-isoprostano (DOTAN et al., 2004).

O ensaio para quantificação do TBARS baseia-se na reação do MDA com duas moléculas do ácido tiobarbitúrico (TBA) (**Figura 8**), em meio ácido, e em alta temperatura, formando um produto colorido que pode ser medido fluorometricamente ou espectrofotometricamente a 532nm (VASCONCELOS et al., 2007).

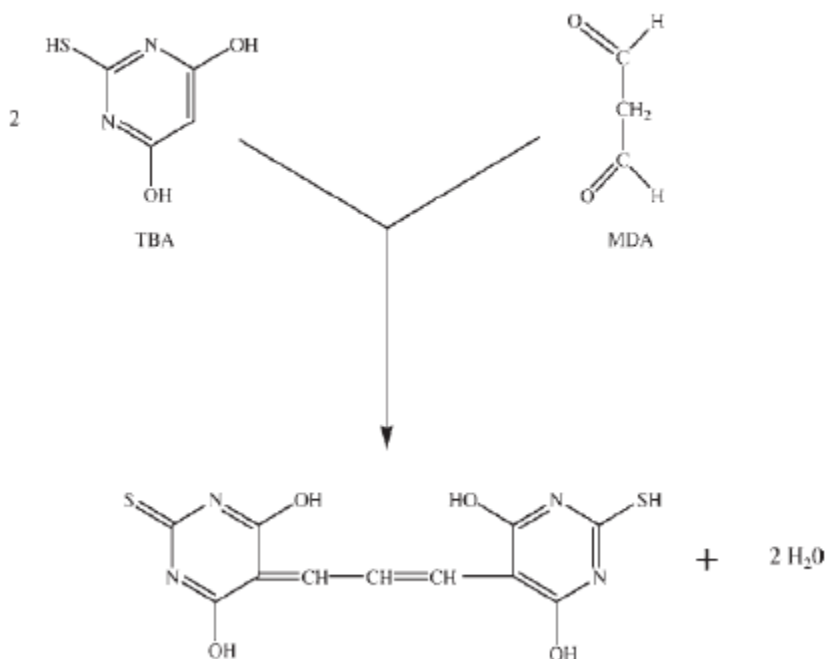


Figura 8 – Representação da reação da molécula de ácido tiobarbitúrico (TBA) com o malondialdeído (MDA). (WILLIANSON; HENSLEY; FLOYD 2003).

Esse método possui a vantagem de poder ser empregado em diferentes tipos de amostras, como tecido, soro ou plasma (Griesmacher et al., 1995; Hermes-Lima; Willmore; Storey, 1995; Aoki et al., 2008).

A desvantagem desse método é que este não é específico para o MDA. O complexo produzido pela ligação do MDA ao TBA não pode ser distinguido dos complexos produzidos a partir da ligação de outros aldeídos ao TBA (VASCONCELOS et al., 2007).

O protocolo a seguir, cuja padronização encontra-se descrita no apêndice C, foi utilizado para a determinação dos níveis de TBARS de 77 amostras de soro: 100 µL de soro foram adicionadas à 100 µL de uma solução gelada de TBA (TBA 1%, NaOH 0,05 M e BHT 0,1 mM) e 100 µL de ácido fosfórico (H₃PO₄) concentrado. As amostras foram incubadas no banho-seco por 25 minutos a 98°C e, em seguida, acondicionados no freezer por 10 minutos. Posteriormente, 375 µL de butanol foram adicionados aos tubos que foram agitados no vórtex, por 10 segundos e em seguida, centrifugados por 5 minutos a 2000 rpm. A absorvância do sobrenadante foi medida

a 532 nm e 600 nm. A concentração do TBARS foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 156/ (mM x cm) (Hermes-Lima; Willmore; Storey ,1995).

4.8.4 Determinação da capacidade antioxidante do soro

O MTT é um sal tetrazólico que pode ser reduzido por antioxidantes como o ascorbato, urato, α -tocoferol, albumina e o grupo das sulfidril proteínas, formando cristais de formazana que possuem cor púrpura e são solúveis em isopropanol. (MEDINA et al., 2007).

Para determinação da capacidade antioxidante do soro, foi realizada a quantificação do MTT de 78 amostras de soro de acordo com o protocolo abaixo, cuja padronização encontra-se descrita no apêndice D.

Foram incubados, ao abrigo de luz, a 37°C por 60 minutos, 100 μ L de soro, 50 μ L de PBS e 12,5 μ L de solução de MTT (0,5 g de MTT em 100 mL de PBS). Em seguida, foram adicionados aos tubos 750 μ L da solução de isopropanol: HCL (0,04 M) e estes foram agitados no vórtex por 30 segundos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos e a absorvância do sobrenadante foi medida a 570 nm (MEDINA et al., 2007).

4.9. Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à distribuição normal pelo teste Shapiro Wilk. Os resultados foram apresentados como média e desvio-padrão quando apresentaram distribuição normal e como mediana e intervalo interquartil, quando a sua distribuição não seguiu a normalidade. Os testes t de Student e Mann-Whitney foram utilizados para comparação de dois grupos, quando os dados se mostrarem normais ou não normais, respectivamente. Para analisar a correlação entre os dados, foi empregado o teste de Spearman. Além disso, foi utilizado o teste de Wilcoxon para avaliar se havia diferença entres os níveis dos marcadores antes e durante o tratamento com AAS. Foi adotada a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey (dados normais) ou Kruskal-Wallis (dados não normais) para comparação de mais de dois grupos. Para se investigar a possível associação entre a ativação

plaquetária durante o uso do AAS e alguma variável clínica ou laboratorial foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson assintótico e exato. Foi utilizado o *software* SPSS 13.0. Valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Características dos participantes do estudo

Participaram do estudo 81 pacientes com DM2, com idade média de $57,2 \pm 9,85$ anos, sendo que havia uma predominância de mulheres (71,6%). Além disso, 85,2% desses pacientes eram hipertensos e apenas 11% dos pacientes se declararam tabagistas, sendo 22% ex-tabagistas. Os participantes deste estudo possuíam um controle de peso insatisfatório, uma vez que 56,3% dos participantes apresentavam índice de massa corporal (IMC) entre 26 e 30 Kg/m^2 e 3,7% IMC superior a 40 Kg/m^2 . Somente 21% dos participantes apresentaram IMC igual ou inferior a 25 Kg/m^2 .

Os medicamentos mais utilizados pelos participantes foram o hipoglicemiante oral e a insulina (**Tabela 1**). 7% dos participantes não utilizavam qualquer medicamento, entretanto, apresentavam o IMC e a $\text{HbA}_{1\text{C}}$ superior a 30 Kg/m^2 e 7%, respectivamente. Além disso, 55,6% faziam uso de estatina e 59% dos participantes hipertensos usavam inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA). Já o restante dos participantes hipertensos usavam outros medicamentos hipotensores. Nenhum participante deste estudo usava o hipoglicemiante oral glicazida.

Tabela 1 – Perfil de uso de medicamentos pelos participantes do estudo (n=81).

Medicação	Participantes (n,%)
Sem medicação para DM2	6 (7,0)
Uso de apenas hipoglicemiante oral	25 (31,0)
Uso de hipoglicemiante oral	66 (81,5)
Uso apenas de insulina	8 (10,0)
Uso de insulina	50 (61,7)
Uso de insulina e hipoglicemiante oral	42 (52,0)
Uso de estatina	45 (55,6)
Uso de IECA	48 (59,0)

DM2: Diabetes mellitus tipo 2; IECA: Inibidor da enzima conversora de angiotensina.

Neste estudo, não foram realizados testes estatísticos para avaliar a relação entre o uso destes medicamentos e os níveis de 2,3-dinor-TXB₂, TBARS, MTT e MPs, uma vez que o princípio ativo, dose e posologia dos medicamentos variaram entre os participantes deste estudo.

5.2 Marcador da produção de tromboxano A₂ (2,3-dinor tromboxano B₂)

Foram medidos os níveis plasmáticos de 2,3-dinor-TXB₂ de 65 participantes. Os valores de 2,3-dinor-TXB₂ não apresentaram distribuição normal e seus resultados foram apresentados como mediana e intervalo interquartil (II) (**Figura 9**). Foi observada diferença significativa ($p < 0,001$) entre os níveis de 2,3-dinor-TXB₂ antes (1508,15; II=1654 pg/mL) quando comparado aos níveis deste metabólito aos 15 dias de uso diário do AAS (450,24; II=332,91 pg/mL).

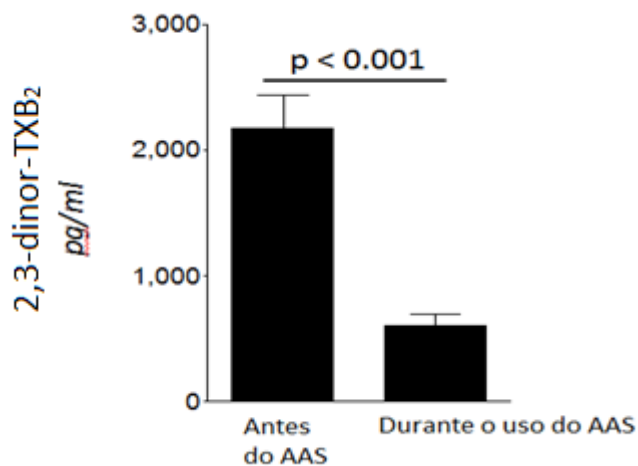


Figura 9 – Valores de 2,3 dinor TXB₂ antes aos 15 dias de AAS (n = 65). Teste Wilcoxon.

Também foi encontrada diferença significativa ($p = 0,00$) entre os valores das medianas do 11 -dhTXB₂ urinário antes (179,00; II=172 pg/mg creatinina) e aos 15 dias de AAS (51,0; II=46 pg/mg creatinina) (**Figura 10**).

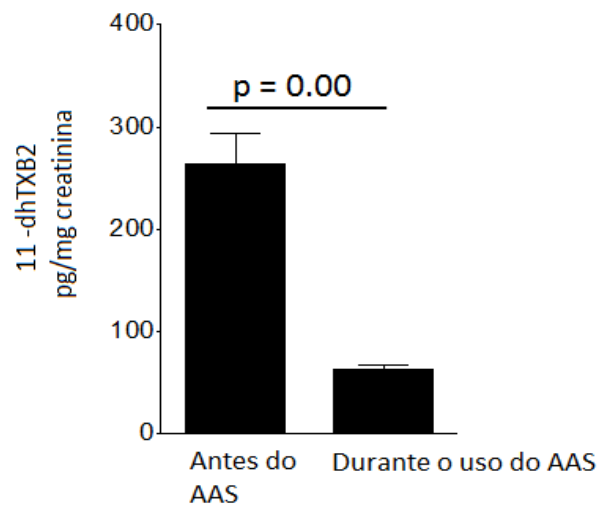


Figura 10 – Valores de 11 –dhTXB₂ antes aos 15 dias de AAS (n = 81). Teste Wilcoxon.

Como somente 3 participantes (4,6%) apresentaram redução superior a 95% dos níveis plasmáticos de 2,3-dinor-TXB₂, optou-se por avaliar a associação entre a redução igual ou superior a 75% dos níveis deste metabólito com as características clínicas dos participantes (**Tabela 2**). 29 participantes (44,6%) apresentaram redução dos níveis de 2,3-dinor-TXB₂ superior ou igual a 75%.

Foi observado que o alelo PI^{A2} do polimorfismo da GPIIIa esteve presente em maior frequência nos participantes que apresentaram a redução deste metabólito igual ou superior a 75% ($p = 0,032$). Não foi encontrada diferença significativa para as demais variáveis.

O alelo PI^{A2} do polimorfismo da GPIIIa foi encontrado em 25,9% dos 81 participantes deste estudo (23,5% em heterozigose e 2,5% em homozigose).

Tabela 2 – Relação entre a redução $\geq 75\%$ 2,3-dinor-TXB₂ e as características clínicas dos participantes (n = 65).

Variáveis	Redução $\geq 75\%$ 2,3-dinor-TXB ₂		Valor p
	Sim (n %)	Não (n%)	
Sexo			
Feminino (n %)	19 (40,4)	28 (59,6)	0,272 (1)
Masculino (n %)	10 (55,6)	8 (44,4)	
Tabagista			
Não	21 (47,7)	23 (52,3)	0,594 (2)
Sim	6 (42,9)	8 (57,1)	
Ex	2 (28,6)	5 (71,4)	
Hipertensão			
Sim (n%)	23 (41,8)	32 (58,2)	0,321 (2)
Não (n %)	6 (60,0)	4 (40,0)	
IMC			
Até 25 Kg/m ²	4 (23,5)	13 (76,5)	0,089 (1)
26 a 30 Kg/m ²	8 (44,4)	10 (55,6)	
> 30 Kg/m ²	16 (57,1)	12 (42,9)	
HbA _{1c}			
< 7,0 % (n %)	8 (53,3)	7 (46,7)	0,605 (1)
$\geq 7,0$ % (n %)	21 (45,7)	25 (54,3)	
Plaquetas			
Média/mm ³ (\pm DP)	236,62 (\pm 65,95)	236,81 (\pm 55,21)	0,990 (3)
Colesterol LDL			
>130 mg/dl (n %)	7 (38,9)	11 (61,1)	0,565 (1)
≤ 130 mg/dl (n%)	22 (46,8)	25 (53,2)	
Dímero D			
≤ 500 ng/ml	19 (40,4)	28 (59,6)	0,272 (1)
> 500 ng/ml	10 (55,6)	8 (44,4)	
Idade			
Média (\pm DP)	59,10 (\pm 10,82)	55,75 (\pm 9,35)	0,185 (3)
Polimorfismo COX			
Presente	4 (50,0)	4 (50,0)	1,000 (2)
Ausente	25 (43,9)	32 (56,1)	
Polimorfismo GPIIb/IIIa			
Ao menos 1 alelo P1 ^{A2}	12 (66,7)	6 (33,3)	0,032 (1)*
Ausente	17 (37,0)	29 (63,0)	

1 – Teste Qui-quadrado Pearson assintótico; 2 – Teste Qui-quadrado Pearson exato; 3 – Teste t. DP= desvio padrão; HbA_{1c} = Hemoglobina glicada; IMC = Índice de massa corporal. * diferença significativa.

5.3 Análise das micropartículas de plaquetas

Os valores de % de MP não apresentaram distribuição normal e foram expressos em mediana e intervalo interquartil (II). Não foi encontrada diferença significativa ($p = 0,403$) entre a % de MP antes (11,90; II = 25,33) e aos 15 dias de uso diário do AAS (12,20; II = 19,00).

Foi avaliada a correlação dos valores de % de MP com os níveis de 2,3-dinor-TXB₂, 11-dhTXB₂ e dímero D antes e durante o uso de AAS (**Tabela 3**). Foi encontrada uma correlação significativa entre a % de MP e os níveis de dímero D antes do tratamento com AAS, mas aos 15 dias de uso deste medicamento não foi encontrada a correlação entre estes dois parâmetros.

Tabela 3 – Correlação da % de MP com os níveis de 2,3-dinor-TXB₂, 11-dh-TXB₂ e dímero D.

Variáveis	Antes do uso do AAS		Aos 15 dias de uso do AAS	
	Correlação	Valor p	Correlação	Valor p
% de MP X 2,3-dinor-TXB ₂	0,080	0,531	-0,045	0,720
% de MP X 11-dhTXB ₂	-0,006	0,961	0,037	0,746
% de MP X Dímero D	0,240	0,031*	0,153	0,173

Correlação de Spearman. * p significativo.

Foi avaliada também, a correlação entre a % de MP antes do tratamento com AAS e as variáveis número de plaquetas, idade, IMC, HBA_{1C} e LDL (**Tabela 4**), mas não foi encontrada correlação entre estas.

Tabela 4 – Correlação da % de MP antes do tratamento com AAS com as características clínicas dos participantes.

Variáveis	Correlação % de MP antes do uso do AAS	Valor p
Plaquetas	-0,074	0,509
Idade	-0,051	0,651
IMC	-0,025	0,829
Hb A _{1c}	0,191	0,106
LDL	-0,058	0,606

Correlação de Spearman. HbA_{1c} = Hemoglobina glicada; IMC = Índice de massa corporal.

Ademais, não foi encontrada diferença significativa (**Tabela 5**) entre as características clínicas dos participantes e a mediana da % de MP antes do uso de 100 mg de AAS.

Tabela 5 – Valores de mediana da % de MP antes do tratamento com AAS de acordo com as características clínicas dos participantes.

Variáveis	% de MP antes do uso do AAS Mediana (Intervalo Interquartil)	Valor p
Sexo		
Masculino	12,90 (26,94)	0,630*
Feminino	11,80 (24,05)	
Tabagista		
Sim	9,65 (21,56)	0,709**
Ex	9,28 (22,70)	
Não	14,05 (25,88)	
Hipertensão		
Sim	9,22 (22,10)	0,071*
Não	26,28 (20,70)	
Polimorfismo GPIIIa		
Ausente	9,67 (23,56)	0,447*
Ao menos 1 alelo PI ^{A2}	21,70 (27,32)	
Polimorfismo COX		
Ausente	13,70 (24,59)	0,132*
Presente	5,95 (18,23)	

* Teste Mann Whitney **Teste Kruskal Wallis. IMC: índice de massa corporal; HbA_{1c}: hemoglobina glicada; GPIIIa: glicoproteína IIIa; COX-1: ciclooxigenase 1.

5.4 Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS)

Os níveis séricos de TBARS, dos 81 participantes do estudo, foram medidos antes e aos 15 dias de uso diário do AAS. Estes níveis apresentaram distribuição não-normal, portanto os valores foram expressos como mediana e intervalo interquartil (II). Não foi encontrada diferença significativa entre as concentrações de TBARS antes (8,13 uM; II=2,36) e aos 15 dias de uso diário do AAS (8,09; II=2,69) (p = 0,099).

Foi avaliada a correlação dos níveis de TBARS com os níveis de 2,3-dinor-TXB₂, 11-dhTXB₂ e a % de MP antes e aos 15 dias de uso diário de AAS (**Tabela 6**). Foi encontrada uma fraca correlação entre os níveis de TBARS e 2,3-dinor-TXB₂ antes do início do tratamento com AAS ($p = 0,037$).

Tabela 6 – Correlação do TBARS com os níveis de 2,3-dinor-TXB₂, 11-dhTXB₂ e % de MP antes e aos 15 dias de uso diário do AAS.

Variáveis	Antes do uso do AAS		Aos 15 dias de uso do AAS	
	Correlação	Valor p	Correlação	Valor p
2,3-dinor-TXB ₂ X TBARS	0,265	0,037*	0,020	0,878
11-dhTXB ₂ X TBARS	-0,036	0,754	0,004	0,971
% de MP X TBARS	0,075	0,504	-0,068	0,551

Correlação de Spearman. * p significativo.

A análise das correlações entre os níveis de TBARS antes do tratamento com AAS com a idade, número de plaquetas, IMC, HbA_{1c} e LDL (**Tabela 7**), apresentaram valor $p > 0,05$, indicando a ausência de correlação.

Tabela 7 – Correlação dos níveis de TBARS antes do uso do AAS com as características clínicas dos participantes.

Variáveis	Correlação TBARS antes do uso do AAS	Valor p
Plaquetas	0,133	0,244
Idade	0,127	0,265
IMC	-0,048	0,678
Hb A _{1c}	0,028	0,814
LDL	0,112	0,326

Correlação de Spearman. HbA_{1c}: Hemoglobina glicada; IMC: Índice de massa corporal.

Também foi avaliada a correlação da idade dos participantes, distribuídas em três faixas etárias, com os níveis de TBARS (**Tabela 8**). Também não foi encontrada correlação entre estas variáveis ($p = 0,116$).

Tabela 8 – Correlação do TBARS com a idade dos participantes.

Idade (anos)	Correlação TBARS antes do uso do AAS X Idade	Valor p
30 – 45	0,178	0,116
46 – 61		
62 - 75		

Correlação de Spearman

Foi avaliada também a diferença entre os valores da mediana de TBARS e as características clínicas dos participantes (**Tabela 9**), mas não foi observada diferença significativa nestas análises.

Tabela 9 – Valores de mediana de TBARS de acordo com as características clínicas dos participantes.

Variáveis	TBARS antes do uso do AAS Mediana uM (Intervalo Interquartil)	Valor p
Sexo		
Masculino	7,93 (2,67)	0,917*
Feminino	8,21 (2,30)	
Tabagista		
Sim	8,41 (3,27)	0,521**
Ex-	8,45 (1,86)	
Não	8,05 (2,52)	
Hipertensão		
Sim	8,21 (2,52)	0,123*
Não	7,29 (2,31)	

*Teste Mann Whitney. **Teste Kruskal Wallis. IMC: índice de massa corporal; HbA_{1c}: hemoglobina glicada.

5.5 Avaliação da capacidade antioxidante do soro (MTT)

Os valores de absorvância do MTT não apresentaram distribuição normal, portanto os resultados foram expressos como mediana e intervalo interquartil. Não foi encontrada diferença significativa entre os valores de MTT antes (0,295; II=0,15) e aos 15 dias de uso diário do AAS (0,283; II=0,15) ($p= 0,063$).

A análise da correlação entre os valores das MTT e TBARS encontrados para as amostras colhidas antes do uso de AAS (**Figura 11**), pelo teste de correlação de Spearman apresentou valor de $r = 0,606$ com $p < 0,001$, mostrando que há uma forte correlação positiva entre estes marcadores. A mesma análise realizada com os valores destes dois parâmetros medidos nas amostras colhidas aos 15 dias de uso diário de AAS (**Figura 12**) mostrou correlação de $r = 0,612$ com $p < 0,001$, indicando também a presença de forte correlação positiva entre o MTT e o TBARS.

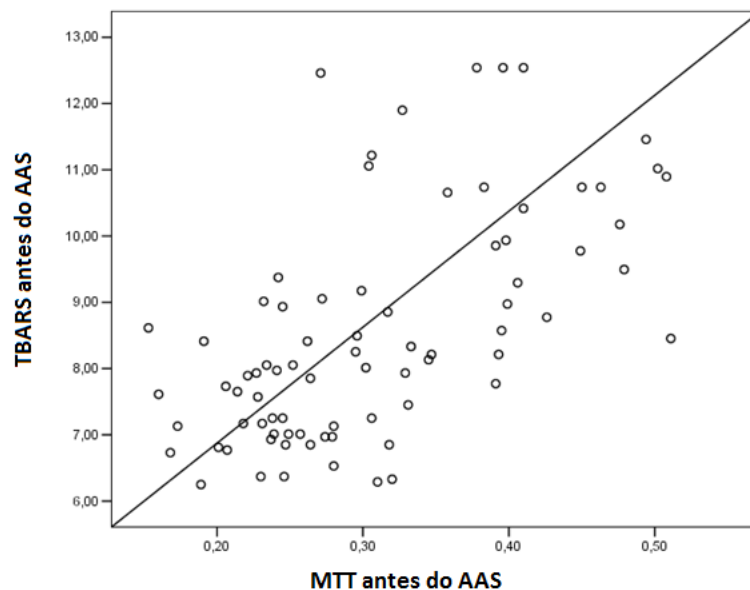


Figura 11 – Correlação entre os níveis de TBARS e MTT antes do uso de 100 mg de AAS ($r = 0,606$, $p < 0,001$). Correlação de Spearman.

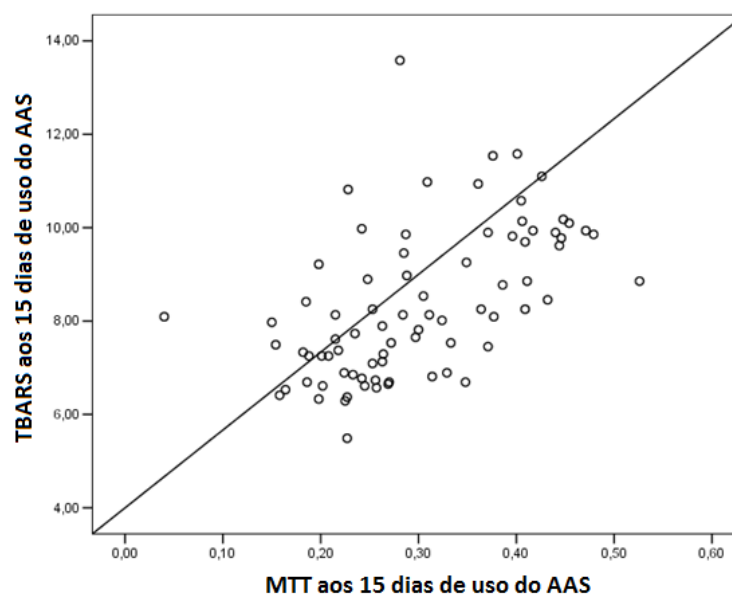


Figura 12 – Correlação entre os níveis de TBARS e MTT aos 15 dias de uso diário de 100 mg de AAS ($r = 0,612$, $p < 0,001$). Correlação de Spearman.

Foi realizada uma análise de correlação dos valores de MTT antes e durante o uso de AAS com os níveis de 2,3-dinor-TXB₂, 11-dhTXB₂ e de % de MPs (**Tabela 10**). Entretanto, não foi encontrada correlação entre estas variáveis.

Tabela 10 – Correlação entre os valores de MTT antes e durante o uso de AAS e os níveis dos metabólitos do TXB₂ e % de MPs.

Variáveis	Antes do uso do AAS		Aos 15 dias de uso do AAS	
	Correlação	Valor p	Correlação	Valor p
2,3-dinor-TXB ₂ X MTT	0,063	0,625	0,029	0,817
11-dhTXB ₂ X MTT	-0,092	0,419	-0,029	0,799
% de MPs X MTT	-0,025	0,828	-0,184	0,102

Correlação de Spearman

Também foi avaliada a correlação entre os valores de MTT antes do uso de AAS e as características clínicas dos participantes (**Tabela 11**). Foi encontrada correlação positiva entre a idade dos participantes e os valores de MTT ($p = 0,033$).

Tabela 11 – Correlação entre os valores de MTT e as características clínicas dos participantes.

Variáveis	Correlação MTT antes do uso de AAS	Valor p
Plaquetas	-0,034	0,768
Idade	0,240	0,033*
IMC	-0,189	0,099
Hb A _{1c}	0,007	0,953
LDL	0,060	0,597

Correlação de Spearman. * p significativo. HbA_{1c}: Hemoglobina glicada; IMC: Índice de massa corporal.

A (**Tabela 12**) mostra a correlação dos três subgrupos formados em relação à idade dos participantes com os níveis de MTT. Novamente foi encontrada correlação entre estas variáveis (p = 0,049).

Tabela 12 – Correlação do MTT com a idade dos participantes.

Idade (anos)	Correlação MTT antes do uso do AAS X Idade	Valor p
30 – 45	0,222	0,049*
46 – 61		
62 - 75		

Correlação de Spearman. * p significativo.

Para complementar as análises, foi avaliada a diferença entre os valores de mediana do MTT antes do uso do AAS com as características clínicas dos participantes (**tabela 13**). No entanto, nenhuma diferença foi observada nesta análise.

Tabela 13 – Valores de MTT antes do uso do AAS de acordo com as características clínicas dos participantes.

Variáveis	MTT antes do uso do AAS Mediana (Intervalo Interquartil)	Valor p
Sexo Masculino Feminino	0,30 (0,15) 0,26 (0,16)	0,562*
Tabagista Sim Ex Não	0,27 (0,21) 0,33 (0,17) 0,28 (0,14)	0,526**
Hipertensão Sim Não	0,30 (0,15) 0,26 (0,09)	0,342*

*Teste Mann Whitney. **Teste Kruskal Wallis. IMC: índice de massa corporal; HbA_{1c}: hemoglobina glicada.

6 DISCUSSÃO

6.1 Marcador da produção de tromboxano A₂

A resposta ao tratamento com o AAS pode ser avaliada pelos níveis de 2,3-dinor-TXB₂ e 11-dhTXB₂.

Apesar de somente 3 participantes apresentarem uma redução superior ou igual a 95% dos níveis de 2,3-dinor-TXB₂, houve uma redução significativa dos valores da mediana do 2,3-dinor-TXB₂ aos 15 dias de uso diário do AAS.

O 2,3-dinor-TXB₂ e o 11-dhTXB₂ são os principais metabólitos do TXB₂ e assim como ocorreu com o 2,3-dinor-TXB₂, o valor de mediana do 11-dhTXB₂ urinário das amostras colhidas após o uso de AAS foi significativamente menor que o das amostras colhidas antes do uso deste medicamento.

Apesar da dosagem do metabólito no plasma possuir maior relação com a geração do TXB₂ na circulação humana, as plaquetas estão sujeitas à ativação *ex vivo* no plasma durante a coleta do sangue, o que pode contribuir para o aumento dos níveis de 2,3-dinor-TXB₂. Entretanto, isto não ocorre com o 11-dhTXB₂, uma vez que a enzima responsável pela metabolização do TXB₂ em 11-dhTXB₂ não é detectada no sangue (LAWSON, et al. 1986).

Possivelmente, a dosagem do 11-dhTXB₂ fornece uma medida mais precisa do efeito do AAS, sendo que não foram encontrados artigos científicos que avaliassem a falha do tratamento com o AAS através da medida simultânea dos dois metabólitos.

Bode-Boger et al. (1998) avaliaram o efeito de 100 mg de AAS em 36 indivíduos saudáveis através do teste de agregação plaquetária, das medidas dos níveis sorológicos de TXB₂ e urinários de 2,3-dinor-TXB₂, encontrando redução da agregação plaquetária e dos níveis de TXB₂ e 2,3-dinor-TXB₂. Após o uso do AAS, foi observada uma redução de 80,3% na excreção urinária do 2,3-dinor-TXB₂.

No estudo realizado por Ames et al. (2012) com 75 pacientes com DM2 e 86 controles, após o uso do AAS foi observada uma redução de 75, 1% e 71,5% dos níveis urinários de 11-dhTXB₂ dos controles e dos pacientes com DM2 respectivamente.

Neste estudo, comparando-se os valores de mediana antes e aos 15 dias de AAS, foi encontrada uma redução de 70% nos níveis plasmáticos de 2,3-dinor-TXB₂ e 71,5% dos níveis urinários de 11-dhTXB₂.

Albert et al. (2005) avaliaram o efeito do AAS em 10 adultos saudáveis e 10 diabéticos com controle glicêmico inadequado (HbA_{1c} = 11,9 ± 2,2%), após 7 dias de uso diário de 81 mg deste medicamento, sendo que o 2,3-dinor-TXB₂ foi dosado na urina dos participantes dos grupos controle e com diabetes. Nos dois grupos, após o uso do AAS foi observada uma redução dos níveis de 2,3-dinor-TXB₂ e da agregação plaquetária induzida pelo AA e pelo colágeno. Entretanto, não foi encontrada diferença significativa entre os níveis urinários deste metabólito no grupo controle (348 ± 93 pg/mg creatinina) e com diabetes (350 ± 149 pg/mg creatinina).

Quando se avaliou a relação entre as variáveis clínicas dos participantes e a redução igual ou superior a 75% dos níveis de 2,3-dinor-TXB₂, apenas a presença do alelo PI^{A2} do polimorfismo da GPIIIa se mostrou associada à redução significativa deste metabólito (p = 0,032). Estes resultados sugerem que a presença do alelo PI^{A2} pode estar associada, em pacientes com DM2, a uma melhor resposta ao tratamento com AAS. Entretanto, é importante ressaltar que este estudo foi realizado com um número pequeno de participantes (n = 65).

Michelson et al. (2000) incubaram plaquetas de 56 indivíduos saudáveis com AAS e abciximab e investigaram a influência do polimorfismo PI^{A2} na agregação das plaquetas induzida por ADP. Foi observado que a presença do genótipo PI^{A1A2} estava relacionada a uma maior sensibilidade ao AAS.

Entretanto, no estudo realizado por Cooke et al. (2006), a presença do genótipo PI^{A1A2} foi associada a uma resposta reduzida ao AAS e, dos 60 participantes do estudo, metade possuía o genótipo PI^{A1A1} e a outra metade o genótipo PI^{A1A2}. Esses

indivíduos foram distribuídos aleatoriamente para receber 325 mg/ dia de AAS e/ou 75 mg/dia de clopidogrel. Após 10 dias de uso destes medicamentos, foi realizado o teste de agregação plaquetária com ADP, colágeno e epinefrina para avaliar a função plaquetária, observando-se que os portadores do genótipo PI^{A1A2} eram mais resistentes ao efeito do AAS ($p = 0,005$). Não foi encontrada diferença significativa entre os genótipos com relação à inibição plaquetária induzida por clopidogrel.

No estudo realizado por PAPP et al. (2005), a presença do alelo PI^{A2} em homozigose foi associada a uma resposta inadequada ao AAS. Esse estudo foi realizado com 158 pacientes com síndrome coronariana aguda e em 199 voluntários saudáveis. Foi observado que o alelo PI^{A2} estava presente em maior frequência nos participantes não responsivos ao AAS do que naqueles com uma resposta adequada ao medicamento (frequência alélica: 0,21 e 0,14 respectivamente; $p < 0,005$).

Contrariamente, no estudo realizado por Pamukcu et al. (2005), não foi encontrada relação entre a presença do polimorfismo PI^{A2} e a resistência ao AAS em pacientes com implante de *stent* intracoronariano. Para analisar a função plaquetária foi realizada a medida da agregação plaquetária pelo PFA-100. Os genótipos PI^{A1A1} e PI^{A1A2} estavam presentes, respectivamente, em 83,7% e 16,2% dos participantes não responsivos ao AAS. No grupo de pacientes sensíveis ao AAS, 72,5% possuíam os alelos PI^{A1A1} e 27,5% o alelo PI^{A1A2} respectivamente ($p = 0,195$). O genótipo PI^{A2A2} não foi encontrado em nenhum paciente.

A análise dos níveis de 2,3-dinor- TXB_2 revela que com exceção do polimorfismo da $GPIIIa$, descrito anteriormente, não foi encontrada associação entre as variáveis clínicas dos participantes e a redução igual ou superior a 75% dos níveis deste metabólito.

Neste estudo também não foi encontrada relação entre a redução dos níveis de 2,3-dinor- TXB_2 e o polimorfismo C50T da COX-1. No estudo realizado por Clappers et al. (2008), a presença deste polimorfismo foi associada a uma menor sensibilidade ao AAS. Entretanto, Pettinella et al. (2009) e Takahashi et al. (2008) não

encontraram essa associação entre o polimorfismo C50T e a diminuição da resposta ao AAS.

Assim, vários estudos avaliaram a relação entre o efeito do AAS e os polimorfismos na COX-1 e na GPIIIa, no entanto, seus resultados são contraditórios, tornando difícil estabelecer qual o papel destes polimorfismos na resistência ao AAS (CLAPPERS et al., 2008; COOKE et al., 2006; MICHELSON et al., 2000; PAMUKCU et al., 2005; PAPP et al., 2005; PETTINELLA et al., 2009).

Como a maioria dos participantes deste estudo era hipertensa (85,2%), a ausência de associação entre a redução dos níveis de 2,3-dinor-TXB₂ entre hipertensos e não hipertensos pode ter ocorrido porque todos os participantes classificados como hipertensos faziam uso de um medicamento hipotensor, passando a ter níveis pressóricos semelhantes aos dos indivíduos não hipertensos.

No estudo *Hypertension Optimal Treatment (HOT)* realizado por Hansson et al. (1998), foi investigado o impacto do tratamento com AAS em 18.790 hipertensos, com idade média de 61,5 anos, sendo que 1501 participantes deste estudo eram, além de hipertensos, diabéticos. Todos os participantes foram distribuídos aleatoriamente para receber 75 mg de AAS/dia ou placebo. A menor incidência de eventos cardiovasculares foi encontrada nos participantes com uma pressão diastólica média de 82,6 mm Hg e, além disso, foi observada uma incidência menor de infarto agudo do miocárdio em pacientes tratados com AAS, quando comparado com os pacientes que receberam o placebo ($p = 0,002$).

Neste estudo não foi encontrada associação significativa entre as variáveis sexo, tabagismo, IMC, HbA_{1c} e LDL e os níveis de 2,3-dinor-TXB₂.

De acordo com Ertugrul et al. (2010), o mau controle glicêmico está associado à resistência ao AAS no diabetes e para avaliar a resposta destes pacientes ao AAS foi realizado o teste de agregação plaquetária (*Multiplate Analyzer*) em 108 indivíduos com DM2 e 67 não-diabéticos. Foram considerados resistentes ao AAS os participantes que apresentaram valores de área sobre a curva (AUC) acima de 300 neste teste. Nos pacientes diabéticos, foi encontrada uma correlação positiva

entre os valores de AUC e os níveis da HbA_{1c} ($r = 0,404$, $p < 0,001$) e do IMC ($r = 0,244$ $p < 0,01$). Entretanto não foi encontrada associação da resistência ao AAS com a hipertensão e o tabagismo.

Cohen et al (2008) também encontraram associação significativa da resistência ao AAS com valores de HbA_{1c} $\geq 8\%$ e IMC ≥ 30 Kg/m². Participaram do estudo 48 diabéticos que usavam AAS nas dosagens de 80 mg ou 325 mg por dia, sendo que a resistência ao AAS foi avaliada pela agregação plaquetária determinada pelo PFA-100. Foram classificados como resistentes ao AAS, 23% dos pacientes deste estudo. Ademais, não foi encontrada associação entre a resistência a este medicamento e a idade, sexo, pressão arterial e tabagismo.

Fateh-Moghadam et al. (2005) avaliaram o efeito do AAS em um estudo com 172 pacientes com DM2. Não foi encontrada correlação entre resistência ao AAS e a HbA_{1c}, hipertensão, IMC, tabagismo e hipercolesterolemia. Entretanto, foi encontrada uma correlação negativa ($r = -0,074$, $p = 0,019$) entre a idade e a resistência ao AAS.

Lemkes et al. (2012) realizaram um estudo com 94 pacientes com DM2 que usavam AAS e avaliaram a ativação plaquetária destes pacientes através da medida dos níveis urinários de 11-dhTXB₂ e da agregação plaquetária, sendo que o efeito de diferentes doses de AAS (30 mg, 100 mg e 300 mg) também foi avaliado. Foi observado que os pacientes que usavam 30 mg AAS por dia e que possuíam um controle glicêmico inadequado (HbA_{1c} > 53 mmol/mol) eram menos responsivos ao AAS, uma vez que eles apresentaram menor redução nos níveis de 11-dhTXB₂ ($p < 0,001$) e maior agregação plaquetária. O uso de 100 mg deste medicamento promoveu a inibição plaquetária independente do controle glicêmico dos pacientes, mas o uso de 300 mg de AAS não promoveu maior inibição das plaquetas do que o uso de 100 mg deste medicamento.

De acordo com Watala et al. (2005) e Cohen et al (2008), o aumento da glicemia e a consequente glicação das proteínas reduz a acetilação da COX pelo AAS, contribuindo assim para um resposta inadequada a este medicamento.

Neste estudo, a maioria dos participantes usavam medicamentos para diminuir os níveis glicêmicos, entretanto, 48 participantes apresentaram níveis de HbA_{1c} igual ou superior a 7, apesar de usarem hipoglicemiante oral e/ou insulina.

O tabagismo é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e o efeito pró-trombótico do tabagismo está relacionado ao aumento da agregação plaquetária (PAMUKCU et al., 2011). Entretanto, os resultados encontrados em artigos científicos que avaliaram o efeito do AAS em tabagistas foram divergentes. Apesar de Cohen et al. (2008), Ertugrul et al. (2010) e Fateh-Moghadam et al. (2005) não terem encontrado associação entre tabagismo e falha no tratamento com AAS, Ikonmidis et al. (2005) observaram que tabagistas com doença arterial coronariana apresentaram uma menor redução dos níveis de 11-dhTXB₂ com o uso do AAS do que os não tabagista. Hung et al. (1995) observaram também que este medicamento não inibe a agregação plaquetária em tabagistas o que pode contribuir para ocorrência de doença coronariana aguda.

Além disso, neste estudo não foi encontrada associação entre os níveis de dímero D e a redução do 2,3-dinor-TXB₂, mostrando que o tratamento com o AAS parece não ter impactado nos níveis deste marcador de hipercoagulabilidade. Todavia, os níveis de dímero D são dependentes não apenas da ativação da cascata da coagulação como também da eficiência do sistema fibrinolítico no sentido de quebrar o excesso de fibrina. Assim, níveis elevados de PAI – 1 poderiam diminuir a competência do sistema fibrinolítico e, conseqüentemente levar a uma menor quebra da fibrina em dímero D. Como o sistema fibrinolítico não foi avaliado no presente estudo, não se pode afirmar com certeza se o uso do AAS realmente não diminuiu o nível de ativação da cascata da coagulação, gerando menos fibrina.

Pettersen et al. (2012) realizaram um estudo com 1001 pacientes com doença arterial coronariana estável que usavam AAS e avaliaram o efeito deste medicamento através do teste de agregação plaquetária determinada pelo PFA-100. Também não foi encontrada associação significativa entre a resposta ao AAS e os níveis de dímero D.

Não foram encontrados estudos que avaliassem a relação dos níveis de 2,3-dinor-TXB₂, marcador da falha ao tratamento com AAS, com pelo menos uma das seguintes variáveis: IMC, sexo, idade, tabagismo, hipertensão, níveis de LDL e dímero D.

6.2 Micropartículas de plaquetas

Pacientes com DM2 possuem níveis elevados de MP, que são pró-coagulantes e contribuem para progressão da aterosclerose no diabetes (BALASUBRAMANIAM, et al.2012; TAN, et al. 2005).

Após a análise das MP nos participantes deste estudo, não foi encontrada diferença significativa entre os valores de mediana antes e aos 15 dias de uso diário do AAS, indicando que esse medicamento não foi capaz de alterar seus níveis. Este fato talvez possa ser atribuído aos elevados níveis de MP em diabéticos.

Lubsczyk, et al. (2010) realizaram um estudo prospectivo e randomizado, com 13 voluntários saudáveis que foram aleatoriamente distribuídos para receber 100 mg de AAS ou placebo, durante 7 dias. As MP e as micropartículas de endotélio marcadas, respectivamente com os anticorpos anti-CD41a e anti-CD34 foram quantificadas e não foi encontrada diferença significativa entre os níveis de MP ($p = 0,78$) e micropartículas de endotélio ($p = 0,68$) entre os participantes que receberam placebo ou AAS.

Já Bulut et al. (2011) investigaram o efeito do tratamento com AAS através de um estudo realizado com 15 homens com doença arterial coronariana, os quais receberam 100 mg de AAS, durante oito semanas. Após o tratamento com AAS foi encontrada uma diminuição de 62,7 % ($p < 0,005$) do número de MP. Uma possível justificativa para a diferença entre estes resultados e aqueles obtidos no nosso trabalho seria o tempo de administração do AAS (8 semanas X 15 dias).

Neste estudo não foi encontrada correlação entre os níveis de 2,3-dinor-TXB₂ e 11 – dhTXB₂ e a % de MP antes do tratamento com o AAS. Isso pode ser ocorrido porque os metabólitos do TXA₂ são marcadores da ativação plaquetária e as MP, além de

serem formadas a partir de plaquetas ativadas também podem ser formadas a partir do envelhecimento e apoptose das mesmas.

Aos 15 dias de tratamento com AAS também não foi encontrada correlação entre estes marcadores e isto pode ter ocorrido porque com o uso do AAS ocorreu diminuição dos níveis de 2,3-dinor-TXB₂ e 11 -dhTXB₂, mas não foi observada diminuição da % de MP.

Ademais, foi encontrada uma correlação positiva entre a % de MP e os níveis de dímero D antes do tratamento com AAS. As MP são capazes de ativar a cascata da coagulação levando à formação de quantidades crescentes de trombina que catalisa a conversão da molécula de fibrinogênio em fibrina. Como o dímero D é um indicativo do depósito de fibrina nos vasos, quanto maior a quantidade de fibrina formada, maiores os níveis de dímero D, se o sistema fibrinolítico estiver competente. Além disso, esta trombina formada é um agonista das plaquetas e irá amplificar o processo de ativação plaquetária e contribuir para o aumento da formação das MPs.

Após o uso do AAS, não foi encontrada correlação entre a % de MP e os níveis de dímero D. Isso pode ter ocorrido devido à diferença entre as meias-vidas de eliminação das MP e do dímero D. A meia-vida de eliminação do dímero D é de 48h e a das MP é em torno de 5,8h (IBEBUOGU, et al. 2008; RANK, et al. 2011).

Foi avaliada também a correlação da % de MP antes do tratamento com AAS com o número de plaquetas, idade, IMC e HbA_{1c}, mas não foi encontrada relação significativa entre estas variáveis. Além disso, também não foi encontrada associação significativa entre a % de MP antes do tratamento com AAS com o sexo, tabagismo, hipertensão, polimorfismo da COX-1 e da GPIIIa.

Não foram encontrados na literatura artigos científicos que relacionassem os níveis de MP com os polimorfismo da COX-1 e da GPIIIa.

Preston et al. (2003) avaliaram a relação entre a hipertensão e os níveis de MPs através da medida da concentração de MP nos três grupos que participaram do

estudo: o primeiro grupo era constituído de 24 pacientes com hipertensão grave (pressão diastólica ≥ 120 mm Hg) não tratada, o segundo de 19 pacientes não tratados e levemente hipertensos (100 mm Hg \geq pressão diastólica ≥ 95 mm Hg) e o terceiro (controle) composto de 16 indivíduos normotensos (pressão diastólica < 90 mm Hg). Foi encontrada correlação entre os níveis de MP com a pressão sistólica ($r = 0,36$, $p = 0,005$) e diastólica ($r = 0,40$, $p = 0,002$) e, além disso, foi observado que o grupo com hipertensão grave possuía níveis mais elevados de MP ($p < 0,001$). Entretanto, não foi encontrada correlação entre os níveis de MP com a idade ($p = 0,47$), o IMC ($p = 0,67$) e o tabagismo ($p = 0,85$).

Nomura et al. (1995) investigaram a relação entre os níveis de LDL e a ativação plaquetária em 18 pacientes hipertensos, 18 diabéticos e 18 controles e observaram que os diabéticos possuíam níveis mais elevados de MP que os controles ($p < 0,001$). Além disso, foram encontrados níveis maiores de MP nos diabéticos com níveis de LDL superiores a 521 mg/dL ($p < 0,05$). Não foi encontrada diferença significativa entre os níveis de MP e LDL nos pacientes hipertensos.

Neste estudo, não foi encontrada correlação entre os níveis de MP e os de LDL antes do tratamento com AAS. É importante ressaltar que para identificação das MP, foram utilizados anticorpos anti - GPIIb/IIIa, já Nomura et al. (1995) utilizaram anticorpos anti - GPIb.

Helal et al. (2011) realizaram um estudo com 88 indivíduos com síndrome metabólica e 27 controles e não encontraram correlação entre os níveis de MP com a glicemia de jejum, hipertensão e IMC. Eles também avaliaram a relação entre os níveis de MP e de isoprostano urinário, marcador da peroxidação lipídica e encontraram uma correlação positiva entre estes marcadores ($r = 0,375$, $p = 0,01$).

O isoprostano é formado a partir a peroxidação do AA, então a sua medida está diretamente relacionada com a ação das ERO nas membranas plaquetárias. Já o aumento dos níveis de TBARS, assim como a elevação do MTT é resultante de mecanismos diversos. No entanto, no presente estudo não foi encontrada correlação entre a % de MP e os níveis de TBARS e MTT antes e aos 15 dias de uso diário do AAS.

6.3 Peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante do soro

A quantificação dos níveis de TBARS no soro é uma medida indireta da produção de radicais livres. Estudos relatam que indivíduos com DM possuem um aumento na produção de ROS e estas estão relacionadas com o desenvolvimento de complicações no diabetes. As plaquetas possuem um papel importante no desenvolvimento de doenças aterotrombóticas, uma vez que liberam moléculas inflamatórias, pró-trombóticas e ROS (DAVI, et al. 2005; GIACCO & BROWNLEE, 2010; LIANI, et al. 2012; VIOLI & PIGNATELLI, 2012).

Neste estudo não foi encontrada diferença significativa entre os níveis de TBARS antes e aos 15 dias de uso diário do AAS.

Ristimãe et al. (1999) realizaram um estudo com 25 homens saudáveis com idade média de $51,2 \pm 6,9$ anos e também não encontraram diferença significativa entre os níveis séricos dos produtos de peroxidação lipídica antes e após 2 semanas de uso diário de baixas doses de AAS. Entretanto foi observado um aumento significativo da capacidade antioxidante do soro após o tratamento com AAS.

Foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis de 2,3-dinor-TXB₂ e os de TBARS antes do tratamento com AAS. Entretanto, durante o uso diário de AAS não foi encontrada correlação entre os níveis destes marcadores possivelmente porque os níveis de 2,3-dinor-TXB₂ diminuíram com o tratamento e os de TBARS não.

A produção de TBARS é resultante do aumento dos níveis de ROS, que por sua vez resulta de diversos mecanismos com a hiperglicemia, a hipercolesterolemia e ativação plaquetária. Já os fatores que levam a diminuição dos níveis de TXA₂ são essencialmente ligados à ação do AAS sobre as plaquetas.

Medina et al. (2007) realizaram o ensaio do MTT em amostras de plasma de indivíduos saudáveis e com DM2 e observaram que estes últimos possuíam menor capacidade antioxidante ($p < 0,005$). No entanto, não foi encontrada diferença significativa entre os valores de absorvância obtidos nos ensaios realizados com o

plasma pobre em plaquetas e com plasma rico em plaquetas indicando que as plaquetas não estavam envolvidas na redução do MTT no plasma. De fato, neste estudo também não foi encontrada diferença significativa entre os níveis de MTT, marcador da capacidade antioxidante do soro, antes e durante o tratamento com AAS.

É importante ressaltar que não foram encontrados artigos, em revistas científicas, que avaliassem o efeito do AAS na capacidade antioxidante do soro através da medida deste marcador.

É descrito na literatura a relação do estresse oxidativo com a idade, tabagismo, hiperglicemia, obesidade, hipertensão e níveis de LDL. A hiperglicemia crônica promove o aumento das ROS e consequente peroxidação lipídica (GIACCO & BROWNLEE, 2010; WHITING et al., 2008). Já o hábito de fumar induz o estresse oxidativo e favorece a oxidação do LDL, contribuindo para o desenvolvimento do processo aterogênico (MILLER et al., 1997; YAMAGUCHI et al., 2005). Além disso, os obesos possuem maior estresse oxidativo e risco aumentado de desenvolver hipertensão e DM2 (CHEUNG & LI, 2012; D'ARCHIVIO et al., 2012).

Neste estudo foi avaliada a relação entre os dados clínicos dos participantes e os níveis de TBARS e MTT antes do uso deste medicamento, mas não foi encontrada correlação entre os níveis de TBARS e MTT antes do tratamento com AAS e o número de plaquetas, IMC e HbA_{1c} e LDL. Também não foi encontrada relação significativa entre os níveis destes marcadores e as variáveis, sexo, tabagismo e hipertensão.

Saraswathi et al. (2011) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o estresse oxidativo nos pacientes hipertensos e encontraram níveis aumentados de TBARS e níveis diminuídos de antioxidantes ($p < 0,005$).

Monnier et al. (2006) relataram a existência de uma relação entre a variação aguda dos níveis de glicose e o estresse oxidativo. Foram medidos os níveis de HbA_{1c}, glicemia pós-prandial e isoprostano em pacientes com DM2 e foi encontrada uma correlação positiva ($r = 0,547$, $p < 0,05$) entre os valores de hiperglicemia pós-

prandial e a peroxidação lipídica, determinada pelos níveis de isoprostano. Entretanto eles não encontraram correlação dos níveis deste marcador com os de HbA_{1C} ($r = 0,061$, $p > 0,05$).

Lodovici et al. (2008) avaliaram a capacidade antioxidante do plasma pela medida dos níveis do FRAP "*Ferric-Reducing Ability of Plasma*" de 39 indivíduos diabéticos, com idade entre 35 e 70 anos e de 18 controles e encontraram, nos pacientes diabéticos com controle glicêmico insatisfatório (HbA_{1C} > 7%), correlação positiva entre a capacidade antioxidante do plasma e os níveis de HbA_{1C}.

No estudo realizado por Junqueira et al. (2004) com 503 adultos saudáveis com a faixa etária de 20 a 70 anos foi avaliada a relação entre o envelhecimento e o estresse oxidativo através da medida dos níveis de TBARS e das enzimas antioxidante glutathiona peroxidase e catalase. Foi encontrada uma correlação positiva entre a idade e os níveis de TBARS ($r = 0,972$, $p < 0,001$) e de glutathiona peroxidase ($r = 0,986$, $p < 0,001$), mas não foi encontrada correlação entre os níveis da catalase e a idade. Ademais, também foi encontrada correlação positiva entre os níveis de TBARS e da glutathiona peroxidase ($r = 0,957$, $p < 0,001$). Junqueira et al. (2004) justificaram o aumento dos níveis desta enzima antioxidante como um efeito compensatório ao aumento da peroxidação lipídica e dos danos oxidativo que ocorrem com o envelhecimento.

Neste estudo, foi encontrada correlação positiva entre os níveis de TBARS e MTT antes e aos 15 dias de uso diário do AAS. Possivelmente, o aumento da capacidade antioxidante do soro pode ser uma resposta adaptativa a produção aumentada de radicais livres que ocorre no diabetes.

Já Andriollo-Sanchez et al. (2005) avaliaram os níveis de TBARS e a capacidade antioxidante do plasma, determinada pelos níveis de FRAP "*Ferric-Reducing Ability of Plasma*", de 387 indivíduos, que foram divididos em 2 grupos, um com 188 adultos com idades entre 50 e 70 anos e outro constituído de 199 idosos com idade superior a 70 anos e inferior a 85 anos. Eles encontraram correlação negativa entre a idade e os níveis de TBARS ($r = -0,2$, $p < 0,001$) e, além disso, correlação negativa entre a capacidade antioxidante do plasma e a idade ($r = -0,7$, $p < 0,001$).

Entretanto, no presente estudo foi encontrada correlação positiva entre os níveis de MTT e a idade, mas não foi encontrada correlação dos níveis de TBARS com a idade.

Foram encontrados resultados divergentes sobre a relação entre o estresse oxidativo e a idade. Entretanto, é importante salientar que os estudos conduzidos por Andriollo-Sanchez et al. (2005), e Junqueira et al. (2004) foram realizados com um número elevado de participantes, com adultos não-diabéticos e, além disso, para determinação da capacidade antioxidante não foi utilizado o teste do MTT.

Além disso, não foi possível avaliar a influência da dieta, do estilo de vida e o efeito do tratamento com insulina, hipoglicemiantes orais e estatina sobre os níveis de TBARS e MTT.

6.4 Considerações finais

Os resultados obtidos neste estudo atestam a dificuldade no que se refere ao desenvolvimento de estudos envolvendo doenças multifatoriais. Ao mesmo tempo, a frequência e a gravidade do DM com suas múltiplas complicações, justificam os esforços para uma melhor compreensão de seus diversos aspectos patológicos.

Conforme descrito ao longo do presente estudo, os relatos da literatura e os nossos achados nem sempre foram concordantes. A própria literatura apresenta numerosas controvérsias sobre o tema aqui abordado. A ausência de diferença significativa de vários parâmetros estudados antes e aos 15 dias de uso do AAS pode ser atribuída a diversos fatores. Alguns destes podem ser citados, tais como a dose insuficiente do AAS, diferentes hábitos de vida (tabagismo, alimentação), nível de acetilação da COX-1 e uso de medicamentos potencialmente modificadores da resposta hemostática e/ou inflamatória. Enfim, o estudo nos remete mais a questionamentos do que a respostas conclusivas, refletindo a complexidade do tema em função de um número de variáveis clínicas, epidemiológicas e genéticas, algumas destas ainda obscuras.

Além do mais, as diferentes metodologias e variáveis analíticas, além de fatores étnicos e culturais, vêm dificultar o encontro de dados consistentes na literatura, principalmente quando o tema estudado enfoca doenças multifatoriais.

Cumprе ressaltar que não há estudos na literatura avaliando a relação entre o 2,3-dinor-TXB₂ e o 11-dhTXB₂ e as variáveis clínicas abordadas neste estudo. Ao mesmo tempo em que tal evidência limita comparações e interpretações de dados, fortalece a necessidade de outros estudos com um número maior de participantes, tendo em vista a ampla prescrição de antiagregantes pela Clínica Médica visando reduzir a ocorrência de eventos trombóticos arteriais.

Os principais parâmetros avaliados neste estudo como a resposta ao AAS, por meio dos níveis de 2,3-dinor-TXB₂, das MP e do estresse oxidativo, sofrem influência de fatores e a resposta final não pode ser homogênea para todos os parâmetros avaliados, pois parece ser resultante de múltiplas interações.

À luz do conhecimento de que a avaliação dos níveis dos metabólitos do AAS pode refletir a ação deste sobre a ativação plaquetária, apesar de muitos fatores envolvidos neste aspecto, acredita-se que este estudo se justifica pela importância do tema e pela escassez de estudos sobre este o que, de certa forma, confere ineditismo ao presente estudo.

Cumprе também ressaltar que a padronização dos protocolos de quantificação do MTT e do TBARS, constituiu um importante objetivo deste estudo. Tal esforço reverteu em aperfeiçoamento de técnicas pré-existentes, no quesito que se refere principalmente à diminuição dos coeficientes de variação intra e interensaio, em consonância com as boas práticas de qualidade em laboratório clínico.

7 CONCLUSÃO

A análise dos dados obtidos neste estudo nos permite as seguintes conclusões:

- Os resultados encontrados neste estudo corroboram com os da literatura em que o tratamento com 100 mg de AAS não é igualmente eficaz na supressão da produção de TXA₂ ou seja, os indivíduos respondem de forma variável ao uso deste medicamento;
- O perfil de MP não diferiu entre os pacientes diabéticos antes e aos 15 dias de AAS;
- O uso do AAS não afetou o perfil oxidativo em pacientes diabéticos, avaliado por meio do TBARS e da capacidade antioxidante do soro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJJAN, R.; STOREY, R. F.; GRANT, P. J. Aspirin resistance and diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 51, n. 3, p. 385-390, mar. 2008.

ALBERT, S. G. et al. Aspirin sensitivity of platelet aggregation in diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 70, p. 195-199, 2005.

ALEXANDRU, N.; POPOV, D.; GEORGESCU, A. Intraplatelet Oxidative /Nitritive Stress: Inductors, Consequences and Control. **Trends Cardiovasc Med**, v. 20, n. 7, p. 232-238, 2010.

ALMENOFF, P. L.; SPUNGEN, A. M.; LESSER, M.; BAUMAN, W. A. Pulmonary function survey in spinal cord injury: influences of smoking and level and completeness of injury. **Lung**, v. 173, n. 5, p. 297-306, 1995.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 29, supl. 1, p. S43 - S48, 2006.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 34, supl.1, p. S62-S69, jan. 2011a.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes–2011. **Diabetes care**, v. 34, supl. 1, p. S11-S61, jan. 2011b.

AMES, P. R.; BATUCA, J. R.; MUNCY, I. J. et al. Aspirin insensitive thromboxane generation is associated with oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Thrombosis Research**, v. 130, n. 3, p. 350-354, set. 2012.

ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Platelet physiology and thrombosis. **Thrombosis Research**, v. 114, n. 5, p. 447-453, 2004.

ANDRIOLLO-SANCHEZ, M. et al. Age-related oxidative stress and antioxidant parameters in middle-aged and older European subjects: the ZENITH study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, p. 58-62, 2005.

AOKI, M.; OSHITA, T.; SAKAGUCHI, M. The comparison of the Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) concentrations in plasma and sérum from dairy cattle. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 70, n. 1, p. 107-111, 2008.

ASO, Y.; MATSUMOTO, S.; FUJIWARA, Y. et al. Impaired fibrinolytic compensation for hypercoagulability in obese patients with type 2 diabetes: association with increased plasminogen activator inhibitor-1. **Metabolism**, v. 51, n. 4, p. 471-476, abr 2002.

AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficinas de Textos; 2006. 120p.

AYERS, L.; KOHLER, M.; HARRISON, P. et al. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: Sources of variability within the assay. **Thrombosis Research**, p. 1-8, 2010.

BALASUBRAMANIAM, K.; VISWANATHAN, G. N. et al. Increased atherothrombotic burden in patients with diabetes mellitus and acute coronary syndrome: a review of antiplatelet therapy. **Cardiology Research and Practice**, jan. 2012.

BARREIROS, A. L. B.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BODE-BOGER, S. M. et al. Effects of very low dose and enteric-coated acetylsalicylic acid on prostacyclin and thromboxane formation and on bleeding time in healthy subjects. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 54, 1998.

BULUT, D.; BECKER, V.; MUGGE, A. Acetylsalicylate reduces endothelial and platelet-derived microparticles in patients with coronary artery disease. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 89, n.4, p. 239-244, 2011.

CARR, M. E. Diabetes mellitus a hypercoagulable state. **Journal of diabetes and its complications**, v. 15, p. 44-54, 2001.

CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 5, p. 321-332, 2006.

CATTANEO, M. Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety and the issue of drug resistance. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.24, p. 1980-1987, 2004.

CHEUNG, B. M.; Li, C. Diabetes and hypertension: is there a common metabolic pathway? **Curr. Atheroscler. Rep.**, v. 14, n. 2, abr. 2012.

CLAPPERS, N.; VAN OIJEN, M. G.; SUNDARESAN, S. et al. The C50T polymorphism of the cyclooxygenase-1 gene and the risk of thrombotic events during low-dose therapy with acetylsalicylic acid. **Thromb. Haemost.**, v. 100, n. 1, p. 70-75, 2008.

COHEN, H. W.; CRANDALL, J. P. et al. Aspirin resistance associated with resistance associated with HbA_{1C} and obesity in diabetes patients. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 22, n. 3, p. 224-228, 2008.

COOKE, G. E.; LIU-STRATTON, Y.; FERKETICH, A. K. et al. Effect of platelet antigen polymorphism on platelet inhibition by Aspirin, Clopidogrel, or their combination. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, n. 3, 2006.

D'ARCHIVIO, M.; ANNUZZI, G.; VARÍ, R. et al. Predominant role of obesity /insulin resistance in oxidative stress development. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 42, p. 70-78, jan. 2012.

DE BERARDIS, G.; SACCO, M.; STRIPPOLI, G. F., PELLEGRINI, F.; GRAZIANO, G. TOGNONI, G.; NICOLUCCI, A. Aspirin for primary prevention of cardiovascular events in people with diabetes: meta-analysis of randomized controlled trials. **BMJ**, nov. 2009.

DAVI, G.; FERRONI, P. Microparticles in type 2 diabetes mellitus. **J. Thromb. Haemost.**, v. 3, n. 6, jun. 2005.

DAVIE, E. W., RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, p. 1310-1312, 1964.

DAVIE, E. W. A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. **The journal of biological chemistry**, v. 278, n. 51, p. 50819-50832, dez. 2003.

DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 200-227, 2004.

EIKELBOOM, J. W. et al. Incomplete inhibition of thromboxane biosynthesis by acetylsalicylic acid: determinants and effect on cardiovascular risk. **Circulation**, v. 118, n. 17, p. 1705-1712, out. 2008.

ERTUGRUL, D. T.; TUTAL, R.; YILDIZ, M. et al. Aspirin resistance is associated with glycemic control, the dose of aspirin and obesity in type 2 diabetes mellitus. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 95, p. 2897-2901, 2010.

FATEH-MOGHADAM, S.; PLOCKINGER, U.; CABEZA, N. et al. Prevalence of aspirin resistance in patients with type 2 diabetes. **Acta Diabetol.**, v. 42, p. 99-103, 2005.

FERREIRA, C. N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.

FITZGERALD, R., PIRMOHAMED, M. Aspirin resistance: effect of clinical, biochemical and genetic factors. **Pharmacology & therapeutics**, v. 130, p. 213-225, 2011.

FREEDMAN, J. E. Oxidative stress and platelet. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, p. 11-16, 2008.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ. Res.**, v. 107, p. 1058-1070, 2010.

GONÇALVES, H. L. Diabetes Mellitus tipo 2 e uso do ácido acetilsalicílico: relação dos níveis de 11 -dihidro tromboxano urinário e variáveis clínicas, genéticas, hemostáticas e bioquímicas [tese]. Belo Horizonte, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

GRANT, P. J. Diabetes mellitus a prothrombotic condition. **Journal of internal medicine**, v. 262, p. 157-172, 2007.

GRIESMACHER, A.; KINDHAUSER, M.; ANDERT, S. E. et al. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. **The American Journal of Medicine**, v. 98, n. 5, p. 469-475, 1995.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 2^o ed. Oxford, University Press. 543p., 1989.

HALUSHKA, M. K.; WALKER, L. P.; HALUSHKA, P. V. Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 73, n. 1, p. 122-130, jan. 2003.

HAMBERG, J. S. & SAMUELSSON, B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 8, p. 2994-2998, 1975.

HANKEY, G. J.; EIKELBOOM, J. W. Aspirin resistance. **Lancet**, v. 367, n. 9510, p. 606-617, fev. 2006.

HANSSON, L.; ZANCHETTI, A.; CARRUTHERS, S. G.; DAHLOF, B.; ELMFELDT, D.; JULIUS, S.; MÉNARD, J.; RAHN, K. H.; WEDEL, H.; WESTERLING, S. Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomized trial. HOT study group. **Lancet**, 1998.

HAOUARI, M.; ROSADO, J. A. Platelet signalling abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus: a review. **Blood cells, molecules and diseases**, v. 41, p. 119-123, 2008.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, n. 3, p. 271-280, 1995.

HELAL, O.; DEFOORT, C.; ROBERT, S. et al. Increased levels of microparticles originating from endothelial cells, platelets and erythrocytes in subjects with metabolic syndrome: relationship with oxidative stress. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular disease**, v. 21, p. 665-671, 2011.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **J. Thromb. Thrombolysis.**, v. 16, n. 1-2, p. 17-20, ago. 2003.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. Coagulation 2006: A modern view of hemostasis. **Hematology/Oncology clinics of North America**, v. 21, p. 1-11, 2007.

HORSTMAN, L. L.; AHN, Y. S. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. **Critical review in oncology/hematology**, v. 30, p. 111-142, 1999.

HORSTMAN, L. L.; JY, W. et al. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. **Keio J. Med.**, v. 53, n. 4, p. 210-230, 2004.

HUNG, J. et al. Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. **Circulation**, v. 92, n. 9, p. 2432-2436, nov. 1995.

IBEBUOGU, U. N. et al. The D-dimer assay: A possible tool in the evaluation of atrial thrombosis. **Can. J. Cardiol.**, v. 24, n.6, jun. 2008.

IKONOMIDIS, I.; LEKAKIS, J.; VAMVAKOU, G. et al. Cigarette smoking is associated with increase circulation proinflammatory and procoagulant markers in patients with chronic coronary artery disease: effects of aspirin treatment. **American Heart Journal**, v. 149, n. 2, p. 832-839, 2005.

ITALIANO, J. E.; MAIRUHU, A. T. A.; FLAUMENHAFT, R. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. **Curr. Opin. Hematol**, v. 17, n. 6, p. 578-584, nov. 2010.

JUNQUEIRA, V. B. C.; BARROS, S. B.; CHAN, S. S. et al. Aging and oxidative stress. **Molecular aspects of medicine**, v. 24, p. 5-16, 2004.

KAKOUROS, N.; RADE, J. J. et al. Platelet function in patients with diabetes mellitus: from a theoretical to a practical perspective. **International Journal of Endocrinology**, ago. 2011.

KRASOPOULOS, G.; BRISTER, S. J. et al. Aspirin Resistance and risk of cardiovascular morbidity: Systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 336, p. 195-198, 2008.

LAWSON, J. A.; PATRONO, C. et al. Long-lived enzymatic metabolites of thromboxane B2 in the human circulation. **Analytical Biochemistry**, v. 155, p. 198-205, 1986.

LEMKES, B. A.;BAHLER, L.; KAMPHUISEN, P. W. et al. The influence of aspirin dose and glycemic control on platelet inhibition in patients with type 2 diabetes mellitus. **J. Thromb. Haemost.**, v. 10, n. 4, p. 639-646, abr. 2012.

LEVI, E. I.; PATEL, R. T.; GUTHIKONDA, S. et al. Genetic polymorphism of the platelet receptors P2Y₁₂, P2Y₁ and GPIIb/IIIa response to aspirin and clopidogrel. **Thrombosis Research**, v. 119, p. 355-360, 2007.

LIANI, R.; HALVORSEN, B.; SESTILI, S. et al. Plasma levels of soluble CD36, platelet activation, inflammation and oxidative stress are increased in type 2 diabetic patients. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 52, n. 8, p. 1318-1324, 2012.

LODOVICI, M.; GIOVANNELLI, L.; PITOZZI, V. et al. Oxidative DNA damage and plasma antioxidant capacity in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. **Mutation Research**, v. 638, p. 98-102, 2008.

LUBSCZYK, B.; KOLLARS, M.; HRON, G. et al. Low dose acetylsalicylic acid and shedding of microparticles in vivo in humans. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 40, n. 6, p. 477-482, 2010.

MALARA, A.; BALDUINI, A. Blood platelet production and morphology. **Thrombosis Research**, v. 129, p. 241-244, 2012.

MCBANE, R. D. et al. Comparison of plasminogen activator inhibitor-1, tissue type plasminogen activator antigen, fibrinogen, and D-dimer levels in various age decades in patients with type 2 diabetes mellitus and stable coronary artery disease (from the BARI 2D trial). **Am. J. Cardiol.**, v. 105, p. 17-24, 2010.

MACFARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. **Nature**, v. 202, p., 498-499, 1964.

MEDINA, L. O.; VELOSO, C. A.; de ABREU BORGES, E. et al. Determination of the antioxidant status of plasma from type 2 diabetic patients. **Diabetes Research and clinical practice**, v. 77, p. 193-197, 2007.

MANSOUR, K.; TAHER, A. T. et al. Aspirin resistance. **Advances in Hematology**, v. 2009, fev. 2009.

MARÍN, F.; GONZÁLEZ -CONEJERO, R.; CAPRANZANO, P. et al. Pharmacogenetics in Cardiovascular Antithrombotic Therapy. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 54, p. 1041-1057, 2009.

MICHELSON, A. D. et al. Platelet GP IIIa PI(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. **Circulation**, v. 101, n. 9, p. 1013-1018, mar., 2000.

MILLER, E., R.; APPEL, L. J. et al. Association between cigarette smoking and lipid peroxidation in a controlled feeding study. **Circulation**, v. 96, n. 4, p. 1097-1101, 1997.

MONNIER, L.; MAS, E.; GINET, C. et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. **JAMA**, v. 295, n. 14, p. 1681-1687, abr. 2006.

MOREL, O.; MOREL, N. et al. Platelet microparticles and vascular cells interactions: A checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. **Platelets**, v. 19, n. 1, p. 9-23, fev. 2008.

NAKAGE, A. P. M. et al., Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 966-973, 2005.

NEWMAN, P. J. et al. The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. **J. Clin. Invest**, v. 83, n. 5, p. 1778-1781, maio 1989.

NOMURA, S.; OMOTO, S.; YOKOI, T. et al. Platelet – derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. **Atherosclerosis**, v. 116, n. 2, p. 235-240, 1995.

NOMURA, S.; OZAKI, Y.; IKEDA, Y. Function and role of microparticles in various clinical settings. **Thrombosis Research**, v. 123, p. 8-23, 2008.

NWOSE, E. U.; RICHARDS, R. S. et al., D-dimer identifies stages in the progression of diabetes mellitus from family history of diabetes to cardiovascular complications. **Pathology**, v. 39, n. 2, p. 252-257, abr. 2007.

OGAWA, H.; NAKAYAMA, M.; MORIMOTO, T. et al. Low-dose aspirin for primary prevention of atherosclerotic events in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 300, n. 18, p. 2134-2141, nov., 2008.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

PAMUKCU, B.; OFLAZ, H.; NISANCY, Y. The role of platelet glycoprotein IIIa polymorphism in the high prevalence of in vitro aspirin resistance in patients with intracoronary stent restenosis. **Am. Heart J.**, v. 149, n. 4, p. 675-680, abr. 2005.

PAMUKCU, B.; OFLAZ, H.; ONUR, I. et al. Effect of cigarette smoking on platelet aggregation. **Clin. Appl. Thromb. Hemost.**, v. 17, n. 6, p. 175-180, 2011.

PAPP, E.; HAVASI, V.; BENE, J. et al. Glycoprotein IIIa gene (PIA2) polymorphism and aspirin resistance: is there any correlation? **Ann. Pharmacother.**, v. 39, n. 6, p. 1013-1018, 2005.

PATRONO C. Biosynthesis and pharmacological modulation of thromboxane in humans. **Circulation**, v. 81, supl. 1, jan 1990.

PETTERSEN, A. A. Markers of endothelial and platelet activation are associated with high on-aspirin platelet reactivity in patients with stable coronary artery disease. **Thromb. Res.**, v. 130, n. 3, p. 424-428, set. 2012.

PETTINELLA, C.; ROMANO, M.; STUPPIA, L. et al. Cyclooxygenase-1 haplotype C50T/A-842G does not affect platelet response to aspirin. **Thromb. Haemost.**, v. 101, n. 4, p. 687-690, abr. 2009.

PFISTER, S. L. Role of platelet microparticles in the production of thromboxane by rabbit pulmonary artery. **Hypertension**, v. 43, p. 428-433, 2004.

PIGNONE M.; WILLIAMS, C. D. Aspirin for primary prevention of cardiovascular disease in diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol**, v. 6, p. 619-628, nov. 2010.

PRESTON, R. A.; JY, W.; JIMENEZ, J. J. et al. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. **Hypertension**, v. 41, p. 211-217, 2003.

PULCINELLI, F. M.; BIASUCCI, L. M.; RIONDINO, S. et al. COX-1 sensitivity and thromboxane A₂ production in type 1 and type 2 diabetic patients under chronic aspirin treatment. **European Heart Journal**, v. 30, p. 1279-1286, 2009.

RANK, A.; NIEUWLAND, R.; CRISPIN, A. et al. Clearance of platelet microparticles in vivo. **Platelet**, v. 22, n. 2, p. 111-116, 2011.

RAO, G. H. R.; FAREED, J. Aspirin prophylaxis for the prevention of thrombosis: expectations and limitations. **Thrombosis**, 2012.

REDONDO, P. C. Hydrogen peroxide and peroxynitrite enhance Ca^{2+} mobilization and aggregation in platelets from type 2 diabetes mellitus patients. **Biochem. Biophys. Res Commun**, v. 333, p. 794-802, 2005.

RISTIMAE, T.; ZILMER, M.; ZILMER, K. et al. Effect of low-dose aspirin on the markers of oxidative stress. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, v. 13, n. 6, 1999.

ROCCA, B.; PETRUCCI, G. Variability in the responsiveness to low-dose aspirin: pharmacological and disease-related mechanisms. **Thrombosis**, jan. 2012.

ROTH, G. J.; MAJERUS, P. W. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. Acetylation of a particulate fraction protein. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 56, n. 3, p. 624-632, 1975.

SAIGO, M.; HSUE, P. Y.; WATERS, D. D.; Role of thrombotic and fibrinolytic factors in acute coronary syndromes. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, v. 46, n. 6, p. 524-38, 2004.

SARASWATHI, R.; SANKAR, D.; ALI, A. et al. A pilot assessment of oxidative stress byproducts and antioxidant activities among Indian patients with various stages of hypertension. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 33, n. 7, p. 437-443, 2011.

SCHNEIDER, D. J. Factors contributing to increased platelet reactivity in people with diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. 4, abr. 2009.

SHAW, J. E., SICREE, R. A., ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87, n. 1, p. 4-14, 2010.

SILJANDER P. R. M. Platelet-derived microparticles - an update perspective. **Thrombosis research**, v. 127, supl.2, p. S30-S33, 2011.

SMITH, J. B.; WILLIS, A. L. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. **Nature**, v. 231, n. 25, p. 235-237, 1971.

SNOEP, J. D.; HOVENS, M. M.; EIKENBOOM, J. C. et al. Association of laboratory – defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: A systematic review and meta-analysis. **Arch Intern Med**, v. 167, p. 1593-1599, 2007.

SOBEL, B. E.; SCHNEIDER, D. J. Platelet function, coagulopathy and impaired fibrinolysis in diabetes. **Cardiology clinics**, v. 22, p. 511-526, 2004.

SZCZEKLIK, A.; UNDAS, A.; SANAK, M. et al. Relationship between bleeding time, aspirin and the PIA1/A2 polymorfism of platelet glycoprotein IIIa. **British Journal of Haematology**, v. 110, n. 4, p. 965-967, 2000.

SZCZEKLIK, A.; MUSIAL, J. et al. Aspirin resistance. **J. Thromb. Haemost.**, v. 3, n. 8, p. 1655-1662, 2005.

TAKAHASHI, S. et al. Platelet responsiveness to in vitro aspirin is independent of COX-1 and COX-2 protein levels and polymorphisms. **Thromb. Res.**, v. 121, n. 4, p. 509-517, 2008.

TAN, K. T.; TAYEBJEE, M. H. et al. Clinically apparent atherosclerotic disease in diabetes is associated with an increase in platelet microparticles levels. **Diabetic Medicine**, v. 22, n. 12, p. 1657-1662, 2005.

TANTRY, U. S.; MAHLA E.; GURBEL P. A. Aspirin resistance. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 52, p. 141-152, 2009.

TRAN, H. A. et al. Aspirin resistance. **Thrombosis research**, v. 120, p. 337-346, 2007.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature**, v. 231, n. 25, p. 232-235, 1971.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VAZZANA, N.; RANALLI, P. et al. Diabetes mellitus and thrombosis. **Thrombosis research**, v. 129, p. 371-377, 2012.

VIOLI, F.; PIGNATELLI, P. Platelet oxidative stress and thrombosis. **Thrombosis research**, v. 129, p. 378-381, 2012.

WATALA, C.; PLUTA, J.; GOLANSKI, J. et al. Increased protein glycation in diabetes mellitus is associated with aspirin decreased aspirin-mediated protein acetylation and

reduced sensitivity of blood platelet to aspirin. **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, n. 2, p. 148-158, 2005.

WHITING, P., H.; KALANSOORIYA, A.; HOLBROOK, I. et al. The relationship between chronic glycaemic control glycaemic control and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 65, n. 2, p. 71-74, 2008.

WILLIANSO, KS; HENSLEY, K; FLOYD, R. Fluorometric an Colorimetric Assessment of Thiobarbituric Acid-Reactive Lipid Aldehydes in Biological Matrices. **Methods in Pharmacology and Toxicology: Methods in Biological Oxidative Stress**, Totowa: Humana Press, 2003.

WOLF, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. **British Journal of haematology**, v. 13, n. 3, p. 269-288, 1967.

YAMAGUCHI, Y.; HAGINAKA, J.; MORIMOTO, S. et al. Facilitated nitration and oxidation of LDL in cigarette smokers. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, p. 186-193, 2005.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. Hematologia: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu; 2005. 735p.

ZHANG, P.; ZHANG, X.; BROWN, J. et al. Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87, p. 293-301, 2010.


ANEXO 1 - Parecer COEP-UFMG

	Universidade Federal de Minas Gerais Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP
--	--

Parecer nº. ETIC 434 /07**Interessado(a): Profa. Maria das Graças Carvalho
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia/UFMG****DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 26 de setembro de 2007, o projeto de pesquisa intitulado "Estudo da ação anti-agregante do ácido acetilsalicílico em pacientes em uso deste medicamento" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO 2 - Parecer CEP Santa Casa**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****PARECER CONSUBSTANCIADO**

Registro CEP: 022/2006 (Este número deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto).

Título: "Estudo da Ação Anti-Agregante do Ácido Acetil Salicílico em Pacientes em uso deste Medicamento".

Pesquisadora Responsável: Dra. Ana Paula Sales Moura Fernandes

Colaboradores: Lillian Harboe Gonçalves, Maria das Graças Carvalho, Francisco das Chagas Lima e Silva, Maria Elisabeth Rennó de Castro Santos e Michelle Aparecida Borges.

Instituições: Faculdade de Farmácia/UFMG - Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte

Objetivo:

O presente projeto tem como objetivo geral determinar a frequência de resistência ao uso de AAS em pacientes que utilizam esta medicação bem como investigar os fatores em potencial que contribuem para esta resistência.

Desenho e metodologia:

Será realizado um estudo observacional, analítico de uma amostra intencional de pacientes de ambos os sexos e de idade variada, numa amostra da ordem de 300 a 400 indivíduos.

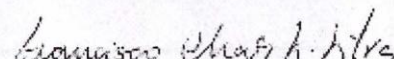
Comentários:

O projeto está bem fundamentado do ponto de vista teórico. A metodologia está adequada. Os critérios de inclusão e exclusão estão bem definidos. O planejamento está coerente com os objetivos propostos. A avaliação de riscos e benefícios justifica a execução do projeto e o torna relevante do ponto de vista médico e científico. Do ponto de vista ético, o projeto atende as determinações da CONEP.

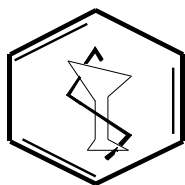
Parecer

Diante do exposto, o CEP da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte **aprovou** o referido estudo, bem como o Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

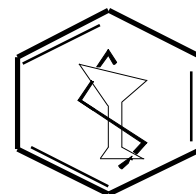
Belo Horizonte, 23 de maio de 2006.


Dr. Francisco das Chagas Lima e Silva
Coordenador do CEP

APÊNDICE A - Ficha clínica



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



FICHA CLÍNICA

Projeto de pesquisa: "ESTUDO DA AÇÃO ANTI-AGREGANTE DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EM PACIENTES EM

USO DESTE MEDICAMENTO"

1 – Identificação:

Nome:

Data de nascimento: ____/____/____ Naturalidade:

Endereço:

Rua (Av.) _____ Nº _____

Compl. _____

Bairro: _____ Cidade _____ Estado:

CEP: _____ - _____ Telefone:

2 - Dados:

Sexo: M F

Fumante?: Sim Não . Se a resposta for não, já fumou antes? Sim Não

Hipertenso(a)?: Sim Não

Diabético (a)?: Sim Não

3 – Exame clínico:

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____ Pressão arterial: _____

Medida da cintura: _____ Medida do quadril: _____

Já apresentou:

Síndrome Coronariana aguda? Não: Sim Quando? _____

Crise de angina? Não Sim Quando? _____

Acidente Vascular Cerebral? Não Sim Quando? _____

Doença Vascular Periférica? Não: Sim Quando? _____

Doença autoimune? Não: Sim Quando? _____

Doença inflamatória? Não Sim Quando? _____

Doença renal? Não: Sim Quando? _____

Doença hepática? Não: Sim Quando? _____

Neoplasia? Não: Sim Quando? _____

Foi submetido (a) a cirurgia nos últimos seis meses? Não: Sim Quando? -

Se for do sexo feminino, existe a possibilidade de estar grávida? Não Sim

Medicamentos em uso:

Antiinflamatório: Não Sim

Antiácido: Não Sim

Hipoglicemiante oral: Não Sim

Insulina: Não Sim

Anticoagulante oral: Não Sim

Heparina: Não Sim

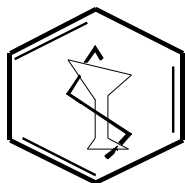
Anti-agregante plaquetário: Não Sim

Estatina: Não Sim

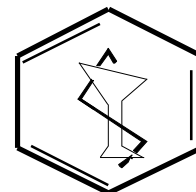
Outros medicamentos: _____

Já fez uso de AAS anteriormente de forma constante? Não Sim

Data ___/___/_____

APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

PROJETO DE PESQUISA: “ESTUDO DA AÇÃO ANTI-AGREGANTE DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EM PACIENTES EM USO DESTE MEDICAMENTO”

Prezado Sr.(a),

O objetivo deste projeto é investigar as mudanças no seu processo de coagulação sanguínea que podem ocorrer em resposta ao uso de ácido acetilsalicílico, também conhecido como aspirina, para verificar se este medicamento está sendo realmente eficaz na prevenção de derrames e infartos cardíacos. Este conhecimento permitirá que o tratamento para prevenir estas doenças seja mais eficiente.

A coleta de amostras de sangue venoso inclui um pequeno risco de acidente de punção, representado, principalmente por extravasamento sanguíneo subcutâneo de pequena gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por um profissional farmacêutico, com capacidade técnica e experiência que estará atento para fazer a compressão imediata do local da punção, visando estancar o sangramento. Será utilizado material descartável de boa qualidade (agulhas e tubos a vácuo), visando o êxito da coleta.

Você está sendo convidado (a) para participar desta pesquisa como voluntário (a), sem custo algum pelos exames realizados. Se você quiser participar, poderá fazê-lo doando 20 mL de seu sangue e 10 mL de urina, em 2 momentos, para uso nesta pesquisa, sendo este material armazenado em condições adequadas para pesquisas relacionadas ao uso de AAS.

Além disso, parte do material será armazenada em um banco de amostras biológicas para estudos futuros de variados polimorfismos genéticos. Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo. Se você não quiser participar, não tem problema, não irá atrapalhar o seu tratamento e a assistência recebida pelo seu médico. Para esclarecer qualquer dúvida sobre esta pesquisa, você deverá contatar por telefone as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo relacionados.

Prof^a. Dra. Maria das Graças Carvalho

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Telefone: (31) 3409-6881

Farmacêutica - Bioquímica Lillian Harboe Gonçalves

Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Telefone: (31) 9406-3916

NOME:

Documento de Identificação:

Assinatura: _____

DATA: ____/____/____

Agradecemos sua valiosa participação!

Comitê de Ética em Pesquisa –COEP - UFMG

Av. Presidente Antônio Carlos 6627 – Prédio da Reitoria 7º andar, sala 7018 . CEP 31270-901 Tel. (31) 3409 4592.

APÊNDICE C –Padronização do protocolo de determinação da peroxidação lipídica

Com o objetivo de padronizar a determinação da peroxidação lipídica pela detecção do TBARS em amostras de soro humano, empregou-se o protocolo abaixo utilizado para amostras de tecido animal no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) a partir do qual foram feitas as adaptações necessárias para obtenção de resultados com reprodutibilidade satisfatória haja vista a utilização de um tipo diferente de amostra.

Em tubos eppendorfs, a 100 µL de homogenato gelado foram adicionados 100 µL de solução gelada de TBA (TBA 1%, NaOH 0,05 M e BHT 0,1 mM) e 50 µL de solução de H₃PO₄ 14%. As amostras foram incubadas no banho-seco por 15 minutos a 98°C e, em seguida, acondicionadas no freezer por 10 minutos. Posteriormente, 375 µL de butanol foram adicionados aos tubos que foram agitados no vórtex (velocidade 3), por 10 segundos e em seguida, centrifugados por 5 minutos a 2000 rpm. A absorvância do sobrenadante foi medida a 532 nm e 600 nm. O TBARS foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar de 156/ (mM x cm) (Hermes-Lima; Willmore; Storey ,1995).

Para realização de todas as etapas da padronização foram utilizados os soros de jovens saudáveis. O sangue foi coletado em tubo sem anticoagulante e posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O soro foi aliquoteado em tubos eppendorfs e estocados a - 80 °C até o momento da análise.

Também foi utilizado na padronização soros de idosos com Diabetes mellitus tipo 2 e/ou Doença de Alzheimer que foram obtidos no período compreendido entre junho de 2008 a março de 2012 e estavam acondicionados no freezer a - 80 °C.

Avaliação da reprodutibilidade do protocolo original

Para testar a reprodutibilidade da aplicação do protocolo utilizado no ICB-UFMG para amostras de soro humano foi coletado amostra de sangue de indivíduo jovem saudável e obtido o soro (controle) a partir da sua centrifugação a 3000 rpm por 10

minutos. Foram feitas dez replicatas do soro obtido, às quais foi aplicado o protocolo citado acima. A partir dos valores de absorvância medidos para cada replicata, calculou-se a média dos mesmos, bem como o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação intra-ensaio (CV). A absorvância foi medida no comprimento de onda de 532nm e de 600nm, subtraindo-se o segundo valor do primeiro para que fosse descontada a contribuição de interferentes.

Foi obtido um CV intra-ensaio menor que 10% (**Tabela 14**), indicando que a técnica poderia ser reproduzida satisfatoriamente.

Tabela 14- Valores de absorvância média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) de 10 replicatas de soro controle.

Replicatas soro controle fresco	Absorvância	Média	DP	CV
1	0,038	0,0368	0,002781	7,60%
2	0,037			
3	0,038			
4	0,039			
5	0,038			
6	0,04			
7	0,035			
8	0,036			
9	0,03			
10	0,037			

Teste da concentração de TBA

Como descrito anteriormente, o teste do TBARS baseia-se na reação do MDA, produto da peroxidação lipídica, com o TBA. Para testar se a utilização de TBA mais concentrado no ensaio poderia resultar em aumento da absorvância e por sua vez diminuição do CV intra-ensaio, o experimento foi realizado de acordo com o protocolo de Hermes-Lima; Willmore; Storey, (1995) modificando-se a concentração do TBA para 2%. Foram realizadas cinco replicatas do soro controle.

O valor da absorvância média, obtido após a realização do experimento com TBA a 2% foi 0,029, permaneceu baixo, não justificando o aumento na concentração de TBA como ferramenta para obtenção de maiores valores de absorvância.

Influência do pH na absorvância medida

O pH da reação é o principal fator que afeta a reatividade dos produtos originados da peroxidação dos ácidos graxos com o TBA (OHKAWA, et al., 1979). Para verificar se variações no pH da solução H_3PO_4 poderiam resultar no aumento dos valores de absorvância, foram realizados testes com diferentes volumes de soluções de H_3PO_4 com diversas concentrações e, posteriormente, testes com o H_3PO_4 concentrado.

Teste do volume de H_3PO_4 14% e 28%

Foi realizada a dosagem de TBARS, em duplicata, utilizando-se diferentes volumes (50 μ L, 100 μ L e 200 μ L) de H_3PO_4 14% e 28%.

Foi observado um aumento nos valores de absorvância das amostras às quais foi adicionado H_3PO_4 28% comparado aos valores observados para aquelas às quais se adicionou H_3PO_4 14% (**Tabela 15**). Além disso, os valores mais altos de absorvância corresponderam à leitura das amostras em que foi adicionado maior volume de ácido.

Tabela 15 – Comparação entre valores de absorvância média utilizando-se ácido fosfórico 14% e 28%.

Volume de H_3PO_4	Absorvância média	
	H_3PO_4 14%	H_3PO_4 28%
50 μ L	0,06	0,08
100 μ L	0,08	0,10
200 μ L	0,10	0,13

Teste da influência do pH das soluções de H_3PO_4 nos valores de absorvância

Foram preparadas soluções de H_3PO_4 com diferentes pHs (**Tabela 16**), cujos valores foram obtidos por meio do cálculo da concentração de íons H_3O^+ . Em

seguida, foi realizada a dosagem do TBARS, em duplicata, utilizando-se 50 μ L de solução de H₃PO₄ com pH específico.

Tabela 16 – Volumes de H₃PO₄ e água miliQ utilizados para o preparo de soluções de H₃PO₄ em diferentes pHs.

pH	Volume de H ₃ PO ₄ (mL)	Volume de água miliQ (mL)
0,53	66,95	100
0,68	33,6	100
0,84	16,48	100
0,99	8,24	100
1,13	4,22	100
1,28	2,12	100

Após a realização deste experimento, foi observado que o pH da solução de H₃PO₄ influenciou nos valores de absorvância. A diminuição do pH da solução de H₃PO₄ utilizada no ensaio é inversamente proporcional ao valor da absorvância (**Figura 13**). O maior valor de absorvância foi encontrado a partir da solução de H₃PO₄ pH de 0,08.

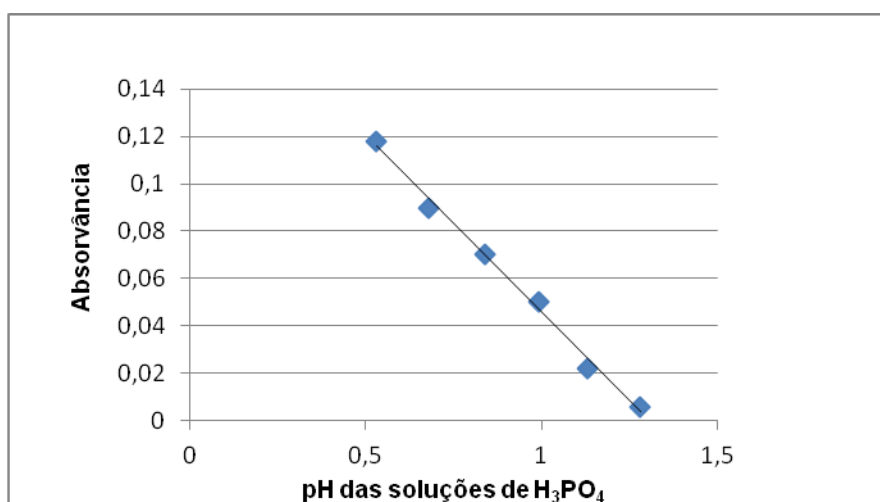


Figura 13 – Relação entre o pH da solução de H₃PO₄ e a absorvância ($R^2 = 0,9946$).

Posteriormente, foi realizado um novo experimento utilizando-se 50 μ L de soluções de H₃PO₄ mais ácidas (**Tabela 17**) em relação às soluções utilizadas no teste anterior buscando-se determinar o pH que proporcionaria a maior absorvância.

Tabela 17 – Volumes de H_3PO_4 e água miliQ utilizados para o preparo de soluções de H_3PO_4 com pH igual ou inferior a 0,53.

pH	Volume de H_3PO_4 (mL)	Volume de água miliQ (mL)
0,53	66,95	100
0,38	133,6	100
0,23	266,5	100
0,08	531,8	100

Ademais, foi realizada a dosagem do TBARS utilizando-se H_3PO_4 concentrado. O maior valor de absorvância foi observado para o experimento realizado com o H_3PO_4 concentrado (**Figura 14**).

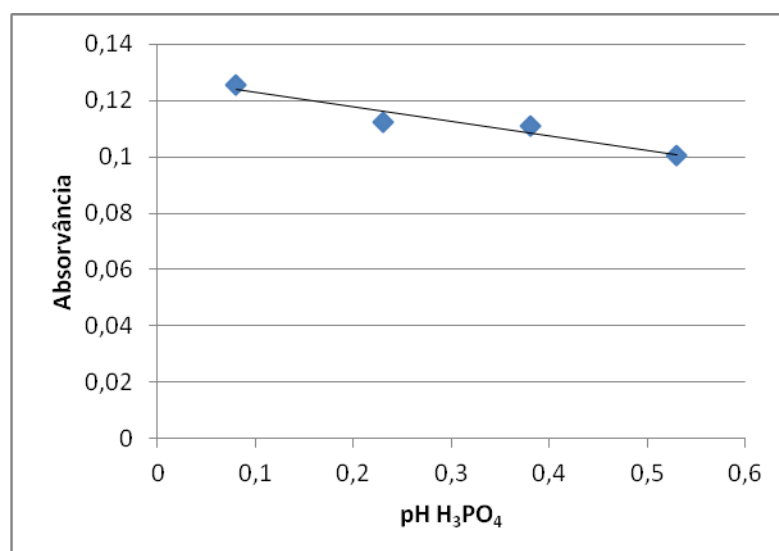


Figura 14 – Relação entre a diminuição do pH da solução de H_3PO_4 e a absorvância ($R^2 = 0,9284$).

Teste do pH da reação

Após a realização de teste com diferentes pHs de H_3PO_4 , foram realizados testes para medir e avaliar a influência do pH na reação.

Foram preparadas soluções a 3,4%, 13,8% e 446% de H_3PO_4 (**Tabela 18**) e os pHs da mistura de 10 mL de solução gelada de TBA (TBA 1%, NaOH 0,05 M e BHT 0,1 mM) com 5 mL de solução de H_3PO_4 nas três diferentes concentrações (3,4%, 13,8% e 446%) e de H_3PO_4 concentrado, foram medidos no PHmetro.

Tabela 18 – Volumes de H₃PO₄ e água miliQ utilizados para o preparo de soluções de H₃PO₄ 3,4%, 13,8% e 446%.

Concentração de H ₃ PO ₄ (%)	Volume de H ₃ PO ₄ (mL)	Volume de água miliQ (mL)
3,4	0,105	5
13,8	0,410	5
446	5,3	2

Além disso, foi medido o pH da mistura de 100 µL de soro com 100 µL de solução gelada de TBA (TBA 1%, NaOH 0,05 M e BHT 0,1 mM) e 50 µL de H₃PO₄ concentrado gelado ou solução de H₃PO₄ nas três diferentes concentrações (3,4%, 13,8% e 446%).

Novamente foi observado que a diminuição do pH da reação é inversamente proporcional ao valor da absorvância medida (**Tabela 19**).

Tabela 19 – Variação do pH em função da concentração de H₃PO₄.

	pH* Solução de TBA + H ₃ PO ₄	Concentração de H ₃ O ⁺ Solução de TBA + H ₃ PO ₄	pH** Solução de TBA+ H ₃ PO ₄ + Soro	Absorvância
H ₃ PO ₄ 3,4%	1,73	0,0186	2 a 3	0,018
H ₃ PO ₄ 13,8%	1,27	0,0537	0 a 1	0,062
H ₃ PO ₄ 446%	0,08	0,8318	0	0,192
H ₃ PO ₄ concentrado	- 0,09	1,2303	0	0,21

* pH medido com o pHmêtro; ** pH medido com a fita indicadora de pH.

Quando comparado os valores de absorvância entre os experimentos realizados com 50 µl e 100 µl de H₃PO₄ concentrado, foi observada uma absorvância maior para os ensaios realizados com 50 µl de H₃PO₄ do que os ensaios com 100 µl de H₃PO₄ (0,10 e 0,16 respectivamente).

Influência do tempo de incubação no banho seco a 98 °C

Para avaliar se o aumento do período de incubação também poderia resultar em um aumento nos valores de absorvância, foi testado dois períodos de incubação no

banho seco a 98°C. As amostras foram incubadas por 15 minutos, como é preconizado na técnica de Hermes-Lima; Willmore; Storey (1995) e por 25 minutos.

Foram encontrados valores maiores de absorvância e uma maior discriminação entre os controles e idosos com Diabetes mellitus tipo e/ou Doença de Alzheimer para as amostras incubadas por 25 minutos no banho-seco (**Figura 15**). Portanto, optamos por utilizar 100 µl de H₃PO₄ concentrado e incubar as amostras no banho seco por 25 minutos.

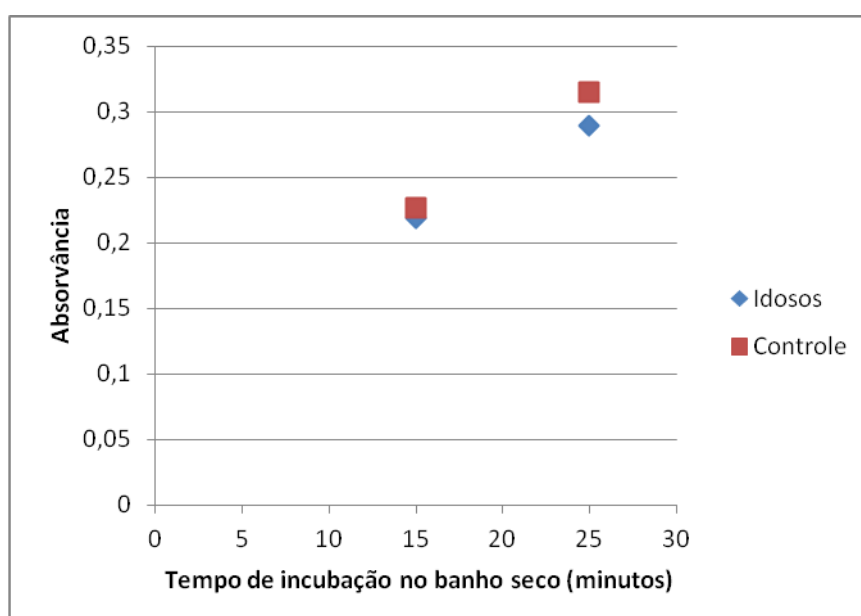


Figura 15 – Comparação entre os valores de absorvância e o período de incubação no banho seco.

Comparação entre diferentes volumes de soro

Para definir qual o volume de soro que deveria ser utilizado, as amostras de soro controle e de idosos com Diabetes mellitus tipo e/ou Doença de Alzheimer foram dosados em duplicata e foram testados seis volumes de soro diferentes (75 µL, 100 µL, 125 µL, 150 µL, 175 µL e 200 µL).

Foi observado que o aumento dos valores de absorvância é diretamente proporcional ao volume de soro. Entretanto, quando analisou-se a discriminação entre controle e idoso (**Figura 16**), observou-se que a partir de 100 µL há uma

melhor discriminação entre idosos e controle à medida que aumentamos o volume de soro. Entretanto, isso não se mantém com 200 μL , o que nos leva a inferir que podemos ter excesso de amostra biológica para os outros componentes da reação.

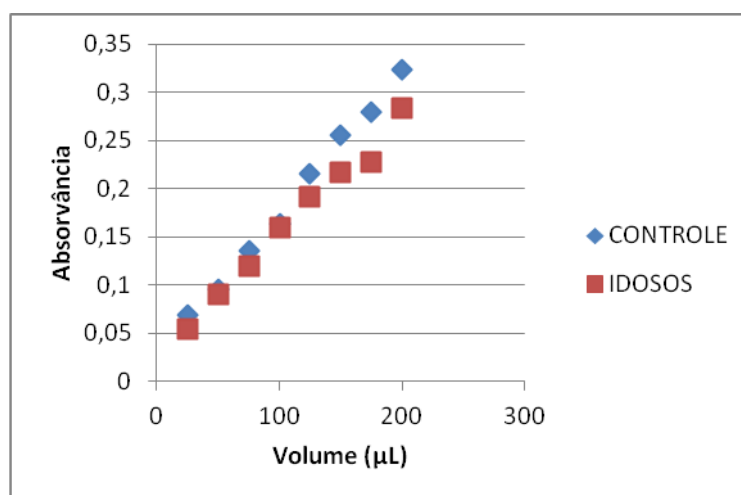


Figura 16 – Valores de absorvância para diferentes volumes de amostras de soro.

Comparação entre as absorvâncias medidas do soro e plasma

Para comparação entre as absorvâncias do soro e plasma, foi coletado o sangue de três jovens saudáveis em tubo sem anticoagulante e nos tubos de EDTA e heparina. O soro e o plasma de cada controle foram dosados em triplicata.

Comparando-se os valores de absorvância encontrados para os testes realizados com soro e com os plasmas em EDTA e heparina (**Tabela 20**) observamos que não houve diferença significativa entre eles ($p = 0,978$)

Tabela 20 – Valores de absorvância dos soros e plasmas.

	Mediana (Intervalo Interquartil)	Valor p
Soro	0,1558 (0,0191)	0,978
EDTA	0,1546 (0,0172)	
Heparina	0,1564 (0,0207)	

ANOVA

Avaliação da linearidade

Para avaliar a linearidade, foi realizada a dosagem do TBARS em duplicata do soro controle e de idosos com Diabetes mellitus tipo 2 e/ou Doença de Alzheimer diluídos 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16 e observou-se que a reação foi linear com soro puro e diluído até 1/16. Portanto, optou-se por utilizar soro sem diluir.

Avaliação da influência do tempo de congelamento do soro

Para avaliar se o tempo congelamento poderia promover uma diminuição nos valores de absorvância (**Tabela 21**), o sangue de dois jovens saudáveis foi coletado em tubo sem anticoagulante e TBARS do *pool* de soro foi dosado no dia da coleta e após um mês de acondicionamento no freezer a - 80 °C. Foi encontrada uma diferença significativa entre os valores de absorvâncias do soro fresco e congelado ($p = 0,003$).

Tabela 21 – Comparação entre os valores de absorvância das amostras de soro fresco e congelado.

	Absorvância Mediana (Intervalo interquartil)	Valor p
Soro fresco	0,1745 (0,013)	0,003*
Soro congelado	0,2130 (0,023)	

Mann-Whitney. * p significativo

Avaliação da reprodutibilidade e repetitividade

O TBARS do soro controle foi dosado simultaneamente por dois operadores (A e B) durante três dias consecutivos. A absorvância média, o DP e o CV intra-ensaio e inter-ensaio foram calculados.

Quando avaliou-se a reprodutibilidade do ensaio, foram observados valores de CV intra-ensaio bastante satisfatórios: 3,7%, 0,3% e 6,5% para operador A; e 4,3%,

0,6% e 12% para operador B, tendo sido realizadas dez replicatas em cada experimento. O CV inter-ensaio obtido a partir das dosagens feitas para as amostras nos três dias foi de 4,6 % para os experimentos realizados pelo operador A e de 7,2 % para os experimentos realizados pelo operador B. Esses resultados comprovam um bom desempenho do protocolo padronizado. Além disso, não foi encontrada diferença significativa ($p = 0,567$) entre os valores de absorvância observados nos experimentos realizados pelos dois operadores (**Tabela 22**).

Tabela 22 – Comparação entre os valores de absorvância encontrados pelos operadores A e B.

	Absorvância Mediana (Intervalo Interquartil)	Valor p
Operador A	0,1664 (0,0096)	0,567
Operador B	0,1647 (0,0161)	

Teste t de Student

Comparação entre as fórmulas utilizadas para expressar a concentração de TBARS

As concentrações das dez replicatas do soro controle e de idosos com Diabetes mellitus tipo e/ou Doença de Alzheimer foram calculadas através da curva do padrão externo 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP) e do coeficiente de extinção molar do TBARS (156/mM x cm). O CV intra-ensaio foi calculado para ambas as fórmulas.

Para o cálculo da concentração de TBARS, pelo coeficiente de extinção molar, foi utilizada a fórmula abaixo:

$$\text{TBARS} = \frac{(A_{532} - A_{600}) \times 10^3 \times 625}{156 \times 100}$$

Onde:

A532 – Absorvância no comprimento de onda de 532 nm;

A600 – Absorvância no comprimento de onda de 600 nm;

Para transformar os resultados de mM para μM a absorvância foi multiplicada por 10^3 ;

625 μL se referem ao volume final em cada *ependorf*;

100 μL correspondem ao volume de soro pipetado;

156 / mM x cm é o coeficiente de extinção molar do TBARS.

Quando as concentrações médias calculadas através do coeficiente de extinção molar do TBARS e da curva padrão de TMP foram comparadas (**Tabela 23**), observou-se que, em relação à discriminação entre controle e idosos com Diabetes mellitus tipo e/ou Doença de Alzheimer, não houve diferença significativa entre concentrações observadas por ambas as fórmulas. Os CV intra-ensaio obtidos a partir de dez replicatas do soro controle foram 5,7 e 6,2 para as concentrações calculadas pelo coeficiente de extinção molar do TBARS e pela curva padrão de TMP, respectivamente.

Como o menor CV intra-ensaio foi encontrado para as concentrações calculadas através do coeficiente de extinção molar do TBARS, optou-se por utilizá-lo para o cálculo das concentrações das amostras. Além disso, também foi considerado o fato do TMP ser um padrão externo.

Tabela 23 – Concentrações do TBARS calculadas utilizando a curva padrão de TMP e o coeficiente de extinção molar (ϵ) do TBARS.

Soro	Coeficiente de extinção molar TBARS (μM) Mediana (Intervalo Interquartil)	Curva padrão de TMP TBARS (μM) Mediana (Intervalo Interquartil)
Controle	6,99 (0,52)	9,27 (0,73)
Idosos (DM2 e/ou Alzheimer)	6,57 (0,65)	8,69 (0,93)
Valor p	0,151	0,139

Teste de Mann-Whitney.

APÊNDICE D – Padronização do protocolo para determinação da capacidade antioxidante do soro

Com o objetivo de padronizar o método de determinação da capacidade antioxidante do soro, o presente estudo foi dividido em cinco fases. Na primeira, foi avaliada a repetitividade do protocolo original. Na segunda, foi realizado um teste para comparação das absorvâncias entre as amostras de soro e plasma em EDTA com o plasma heparinizado, que é a amostra preconizada para realização deste teste. Na terceira, foi avaliada a influência do congelamento do soro e plasma sob os valores de absorvância. Na quarta fase foi avaliada a reprodutibilidade do teste e na última fase foi realizado um experimento para avaliação da linearidade.

Para realização dos testes, o sangue de dez jovens saudáveis foi coletado em tubo com EDTA, heparina e sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos. O plasma e o soro foram aliquotados em tubos *ependorf* devidamente identificados e estocados a - 80°C até o momento da análise.

As amostras de soro de idosos com Diabetes mellitus tipo e/ou Doença de Alzheimer utilizadas nesta padronização foram coletadas no período compreendido entre junho de 2008 a março de 2012 e estavam acondicionadas no freezer a - 80°C em tubos *ependorf* devidamente identificados.

Avaliação da repetitividade

Para avaliação da repetitividade, foi realizada a quantificação do MTT da amostra de soro controle (**Tabela 24**). Foram feitas oito replicatas e o CV intra-ensaio foi calculado.

Tabela 24 – Valores de absorvância para as amostras do soro controle. DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Replicatas	Absorvância	Média	DP	CV
1	0,351	0,343875	0,018503	5,38%
2	0,355			
3	0,316			
4	0,314			
5	0,336			
6	0,366			
7	0,353			
8	0,36			

Foi encontrado um CV intra-ensaio inferior a 10% o que indica que a técnica pode ser reproduzida satisfatoriamente.

Comparação entre absorvâncias do soro e plasma

Para avaliar se havia diferença entre os valores de absorvância de amostras de soro, e de plasma heparinizado, utilizadas na técnica descrita por Medina et al. (2007), e plasma em EDTA (**Tabela 25**), foi realizada a quantificação do MTT das amostras de soro e plasma controle. Não foi encontrada diferença significativa entre os valores de absorvância ($p = 0,358$).

Tabela 25 – Comparação entre as absorvâncias das amostras de soro e plasma (EDTA e heparina).

Amostra	Absorvância Mediana	Valor p
Soro	0,4030	0,358
Heparina	0,3720	
EDTA	0,2960	

Teste de *Kruskal-Wallis*

Avaliação da influência do tempo de congelamento sob os valores de absorvância das amostras de soro e plasma

Foi realizada a quantificação das amostras de soro e plasma dos controles após acondicionamento no freezer a -80°C por um mês.

Quando avaliou-se a influência do tempo de congelamento das amostras (**Tabela 26**), não se observou diferença significativa ($p = 0,589$) entre os valores de absorvância encontrados para as amostras de soro e plasma frescos ou e congelados.

Tabela 26 – Comparação entre os valores de absorvância média das amostras de soro e plasma recém-coletados e após um mês de congelamento.

Amostra	Amostra recém-coletada Absorvância Mediana (Intervalo Interquartil)	Amostra congelada Absorvância Mediana (Intervalo Interquartil)	Valor p
Soro	0,3465 (0,131)	0,2820 (0,079)	0,589
EDTA	0,2740 (0,042)	0,2250 (0,045)	
Heparina	0,3195 (0,154)	0,2960 (0,206)	

Teste *Kruskal-Wallis*.

Comparação entre os valores de absorvância observados em experimentos realizados por diferentes operadores e avaliação da reprodutibilidade

Dois operadores (A e B) realizaram o teste do MTT, em paralelo, por três dias consecutivos e foram comparados os valores de absorvância obtidos nos experimentos realizados por estes operadores. Para avaliação da reprodutibilidade, foi calculado o CV inter-ensaio dos experimentos realizados por eles.

Não foi encontrada diferença significativa ($p = 0,786$) entre os valores de absorvância obtidos nos experimentos realizados pelos diferentes operadores (**Tabela 27**).

Tabela 27 – Comparação entre os valores de absorvância observados por diferentes operadores.

Operadores	Absorvância Média (\pm Desvio Padrão)	Valor p
A	0,3595 (\pm 0,016)	0,786
B	0,3565 (\pm 0,0208)	

Teste t de Student

Além disso, foram observados CV inter-ensaios de 5,4% e 6,1% para os experimentos realizados pelos operadores A e B, respectivamente, comprovando um bom desempenho do teste.

Avaliação da linearidade

Para avaliação da linearidade da dosagem do MTT, amostra do soro controle foi diluída 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16, tendo sido cada diluição dosada em duplicata. Observou-se que a reação foi linear com soro diluído até 1/16. Portanto, foi escolhido utilizar o soro sem diluir.