



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Wanda Vianna Mury

Efeitos da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) na função plaquetária de indivíduos saudáveis

Rio de Janeiro

2018

Wanda Vianna Mury

Efeitos da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) na função plaquetária de indivíduos saudáveis

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cristiane Matsuura

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M984 Mury, Wanda Vianna.

Efeitos da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) na função plaquetária de indivíduos saudáveis / Wanda Vianna Mury – 2018.

81 f.

Orientadora: Cristiane Matsuura.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Plaquetas (Sangue) – Teses. 2. Agregação Plaquetária. 3. Euterpe - Teses. 4. Açaí – Uso Terapêutico - Teses. 5. Óxido nítrico - Teses. 6. Estresse oxidativo – Teses. I. Matsuura, Cristiane. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.89-008.454

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Wanda Vianna Mury

Efeitos da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) na função plaquetária de indivíduos saudáveis

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 2 de Agosto de 2018.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Cristiane Matsuura (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Cristiane Aguiar da Costa
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Marcela Anjos Martins
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Fernanda Carla Ferreira de Brito
Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Monique Bandeira Moss Perszel
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Harlindis e Fernando pelo amor, apoio, dedicação e incentivos dispensados a mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela certeza que estavas comigo durante todo esse caminho e me segurando no colo quando preciso.

Aos meus pais, Harlindis e Fernando, e ao meu irmão Rafael, por todo carinho e apoio dispensados em todos os momentos que precisei, pelas oportunidades de estudos e por sempre apoiarem minhas decisões.

À minha orientadora Prof.^a Dra. Cristiane Matsuura pela “paciência de Japa” comigo e com todos do departamento, não é mesmo? Rsrs. Obrigada por mesmo sem tempo, nas minhas crises de estresse me responder “Tá! vamos ver isso agora! Traz o seu pendrive! As pessoas têm que entender que você é a prioridade no momento!”. Obrigada por tudo que pude aprender com você, não só em relação aos experimentos e saberes que foram muitos, mas também por toda sua ajuda na parte técnica, ao dominar a informática e ao final sempre rir quando eu falava “Cris, você é uma gênial!”.

À minha coorientadora Prof.^a Dra. Mariana Siqueira, por ser meu exemplo de profissional. Obrigada por não me deixar desistir em momento algum. Obrigada por me responder “Nada a agradecer” a cada momento que eu agradei pelo trabalho que eu te dei, como se fosse pouco tudo o que você fez por mim... Obrigada pelo “Calma, Wanda! Uma coisa de cada vez! Agora você vai fazer...” e resolver tudo de maneira muito simples na minha agenda. Muito obrigada por todo seu carinho, atenção, conselhos, incentivos e ensinamentos.

À MELHOR dupla de orientadoras que alguém poderia ter. Que sorte a minha! Acho que vocês já suspeitavam que formavam um dupla e tanto né? Mas só para vocês terem a certeza disso... ;)

Aos professores Antônio Claudio e Tatiana Brunini por terem, lá no início, aberto as portas do Laboratório Transporte de Membrana para mim, sempre me tratando com muito carinho e permitindo que hoje eu esteja tão perto de completar um sonho.

Aos alunos e ex-alunos do Laboratório Transporte de Membrana, em especial a:

- minha Carinho, Claudinha, por ser essa pessoa amorosa 24 horas por dia e me apoiar a cada segundo, não me deixando chorar sozinha.

- minha docinho, lara, por ser minha companheira de bancada e das melhores viagens!
- Camila, por ser a doidinha mais companheira que eu conheço.
- Marcela, por ser meu exemplo de determinação, dedicação e garra. Obrigada por aceitar ser da minha banca.
- Daniel Medeiros, que apesar de toda implicância diária, sei que sempre está ao meu lado.
- Renata por toda sua técnica para cortar as membranas do WB, rsrs. Obrigada por toda a ajuda! Chegou há pouco tempo no laboratório, mas já fez toda a diferença!
- Filipi, por apesar da correria da sua faculdade, sempre aparecer lá no laboratório perguntando se eu precisava de alguma ajuda.
- Nathalia Brigido, por toda ajuda nos experimentos e doçura.
- Paulinha muito obrigada por ser minha amiga mais animada e topa tudo de todas, pela ajuda e pelos ensinamentos não só no laboratório, mas na vida.
- Natália Pereira, por tornar o ambiente de trabalho mais agradável, tranquilo e com altas histórias e acontecimentos; obrigada também por todos seus ensinamentos.
- Monique Moss, por toda sua sabedoria e ajuda, desde quando conheci doutoranda até quando professora da UERJ e UNIRIO. É um exemplo de profissional! Além disso, obrigada por ter aceitado ser da minha banca.

Às alunas, ex-alunas e professores do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais, em particular a: Grazielle de Bem, por me aturar tirando todas as minhas dúvidas sobre os meus WB que não davam certo; Cristiane da Costa e Dayane Ognibene, pelos ensinamentos, desde quando eu era IC até hoje, e por terem aceitado ser da minha banca. Aos professores Roberto Soares de Moura e Ângela Resende por toda colaboração ao longo desses anos e por compartilhar conosco a peça principal desse trabalho, o ASE.

Aos alunos do laboratório LMMC, em especial, a Aline Penna e André Vianna, pela paciência e auxílio durante a realização dos experimentos.

Aos meus amigos e à minha grande família, pelo carinho e pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva. Desculpem pela minha ausência em diversos momentos importantes na vida de vocês. Meu muito

obrigada especial a: Gabriela, Mariana, Brunna, Lorena, Amanda, Babi, Luiza, Paulinha, Rafa, Iuri, Fernandinha e Igor. Amo vocês!

Ao meu filho, Choppinho, que, mesmo eu ficando ausente por tanto tempo, sempre me recebe com uma felicidade contagiante, renovando minhas energias. Meu maior companheiro da tese, sempre dormindo no meu pé.

Às Prof^{as} Dr^{as} Fernanda Brito e Manuella por terem aceitado prontamente a participar da minha banca.

Aos voluntários do estudo, por tornarem este trabalho possível.

E a todos aqueles que colaboraram de forma direta e indireta na elaboração desta tese, meu muito obrigada!

Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir
entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque
descobri, no caminho incerto da vida, que o mais
importante é o decidir.

Cora Coralina

RESUMO

MURY, Wanda Vianna. **Efeitos da *Euterpe oleracea* Mart. (açai) na função plaquetária de indivíduos saudáveis.** 2018. 83f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A *Euterpe oleracea* Mart. (açazeiro) é uma planta típica do Brasil, rica em polifenóis, que apresenta propriedades vasodilatadoras, previne a disfunção endotelial e melhora o perfil metabólico. Porém, não se tem conhecimento sobre seu papel na função plaquetária. As plaquetas são essenciais para a manutenção da hemostasia vascular, mas participam da formação de trombos quando hiperativadas, contribuindo para a patogênese de doenças isquêmicas. Assim, o objetivo do estudo foi investigar os efeitos do extrato hidroalcoólico do caroço do açai (ASE) na agregação plaquetária e os mecanismos moleculares envolvidos. Para tal, o sangue de 15 homens jovens e saudáveis foi coletado, centrifugado e as plaquetas isoladas incubadas com 10, 50 ou 100 µg/mL do ASE (de acordo com cada experimento). A agregação plaquetária foi medida em plasma rico em plaquetas (PRP) e sangue total. Para verificar as ações do ASE sobre o inibidor plaquetário óxido nítrico (NO), foram avaliados a atividade e a expressão da enzima óxido nítrico sintase (NOS), os níveis de GMPc e a agregação na presença do L-NMMA, inibidor da síntese do NO. Adicionalmente, foram quantificados os níveis de AMPc, segundo mensageiro da prostaciclina, também inibidora plaquetária. O efeito do ASE na fosforilação de enzimas envolvidas na ativação plaquetária – Akt; e proteínas quinases ativadas por mitógenos JNK e ERK – foi medido por Western blotting. Foi mensurado o efeito do ASE sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). O ASE inibiu a agregação em PRP induzida por colágeno (basal, $82,7 \pm 5,6$; ASE50, $54,0 \pm 7,2$; ASE100, $31,4 \pm 4,1$; $p < 0,0001$), ADP (basal, $46,1 \pm 7,5$; ASE50, $32,1 \pm 4,1$; ASE100, $17,6 \pm 2,6$; $p < 0,0001$) e trombina (basal, $103,4 \pm 4,5$; ASE50, $77,2 \pm 8,9$; ASE100, $53,4 \pm 7,1$; $p = 0,0002$), bem como em sangue total sob estímulo com colágeno (basal, $28,0 \pm 4,0$; ASE50, $19,6 \pm 4,4$; ASE100, $14,8 \pm 2,5$; $p = 0,008$). O L-NMMA inibiu a ação do ASE50 na agregação em PRP induzida por ADP e trombina. Apesar de não ter modificado a atividade da NOS, nem a expressão da eNOS (total e fosforilada), o ASE aumentou os níveis de GMPc (basal, $0,67 \pm 0,19$; ASE50, $1,50 \pm 0,39$; ASE100, $1,64 \pm 0,49$ pmol/ 10^8 céls; $p = 0,020$). Similarmente, houve aumento nos níveis de AMPc (basal, $9,8 \pm 1,8$; ASE50, $13,9 \pm 2,3$; ASE100, $15,3 \pm 2,6$ pmol/ 10^8 céls; $p = 0,009$). A fosforilação das enzimas Akt, JNK e ERK não foi alterada. A atividade das enzimas antioxidantes SOD (basal, $0,042 \pm 0,004$; ASE100, $0,033 \pm 0,003$ U/mg ptn, $p = 0,009$) e CAT (basal, $0,08 \pm 0,03$; ASE100, $0,05 \pm 0,02$ U/mg ptn, $p = 0,049$), mas não da GPx (basal, $1,5 \pm 0,6$; ASE100, $1,4 \pm 0,6$ U/mg ptn; $p = 0,312$), mostrou-se diminuída. Diante desses resultados, é possível que o ASE apresente potencial para ser utilizado na profilaxia e no tratamento de doenças associadas à hiperagregabilidade plaquetária, apesar dos mecanismos subjacentes a esse processo precisarem ser completamente esclarecidos.

Palavras-chave: *Euterpe*. Agregação plaquetária. Óxido nítrico. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

MURY, Wanda Vianna. **Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) on platelet function from healthy individuals.** 2018. 83f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Euterpe oleracea Mart. (açazeiro) is a plant typical from Brazil, rich in polyphenols, which has vasodilator properties, prevents endothelial dysfunction and improves metabolic profile. However, its role on platelet function is not known. Platelets are essential for the maintenance of vascular hemostasis, but that may also participate in thrombus formation when hyperactivated, contributing to the pathogenesis of ischemic diseases. Thus, the objective of this study was to investigate the effects of açai stone hydroalcoholic extract (ASE) on platelet aggregation and the molecular mechanisms involved. To accomplish this, blood from 15 healthy young men was collected, centrifuged and the isolated platelets incubated with 10, 50 or 100 µg / mL ASE (according to each experiment). Platelet aggregation was measured in platelet-rich plasma (PRP) and whole blood. In order to assess the effects of ASE on the platelet inhibitor nitric oxide (NO), we measured the activity and expression of the enzyme nitric oxide synthase (NOS), cGMP levels and aggregation in the presence of L-NMMA, a NOS inhibitor. Additionally, cAMP levels were quantified, the second messenger of platelet inhibitor prostacyclin. The effect of ASE on the phosphorylation of enzymes involved in platelet activation - Akt; and mitogen-activated protein kinases JNK and ERK - was measured by Western blotting. The effect of ASE on the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) was measured. ASE inhibited collagen-induced PRP aggregation (baseline, 82.7 ± 5.6 , ASE50, 54.0 ± 7.2 , ASE100, $31.4 \pm 4.1\%$, $p < 0.0001$), ADP (baseline, 46.1 ± 7.5 , ASE50, 32.1 ± 4.1 , ASE100, $17.6 \pm 2.6\%$, $p < 0.0001$) and thrombin (baseline, 103.4 ± 4.5 , ASE 50, 77.2 ± 8.9 , ASE100, $53.4 \pm 7.1\%$, $p = 0.0002$), as well as in whole blood under stimulation with collagen (baseline, 28.0 ± 4.0 , ASE50, 19.6 ± 4.4 , ASE100, $14.8 \pm 2.5 \Omega$, $p = 0.008$). L-NMMA inhibited the action of ASE50 on PRP aggregation induced by ADP and thrombin. ASE did not affect the activity of NOS, nor the expression of eNOS (total and phosphorylated), but it did increase cGMP levels (baseline, 0.67 ± 0.19 , ASE50, 1.50 ± 0.39 , ASE100, 1.64 ± 0.49 pmol / 10^8 cells, $p = 0.020$). Similarly, there was an increase in cAMP levels (baseline, 9.8 ± 1.8 , ASE50, 13.9 ± 2.3 , ASE100, 15.3 ± 2.6 pmol / 10^8 cells, $p = 0.009$). Phosphorylation of Akt, JNK and ERK enzymes was not altered. The activity of the antioxidant enzymes SOD (baseline, 0.042 ± 0.004 , ASE100, 0.033 ± 0.003 U / mg ptn, $p = 0.009$) and CAT (baseline, 0.08 ± 0.03 , ASE100, 0.05 ± 0.02 U / mg ptn, $p = 0.049$) but not GPx (baseline, 1.5 ± 0.6 , ASE100, 1.4 ± 0.6 U / mg ptn, $p = 0.312$) was shown to be decreased. In view of these results, it is possible that ASE has the potential to be used in the prophylaxis and treatment of diseases associated with platelet hyperaggregability, although the mechanisms underlying this process need to be fully clarified.

Keywords: *Euterpe*. Platelet aggregation. Nitric oxide. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura plaquetária	21
Figura 2 –	Adesão, ativação e agregação plaquetária.....	23
Figura 3 –	Vias de sinalização envolvidas na ativação plaquetária.....	26
Figura 4 –	Estrutura básica dos flavonoides	29
Figura 5 –	Modulação da função plaquetária pelos flavonoides.....	31
Figura 6 –	Redução tetravalente do O ₂ com formação das espécies reativas de ânion superóxido (O ₂ ^{•-}), peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e radical hidroxila (OH [•])	32
Figura 7 –	Foto da palmeira <i>Euterpe oleracea</i> Mart. (açazeiro)	34

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Agonistas plaquetários: receptores e efeitos bioquímicos.....	24
Tabela 1 –	Dados clínicos e laboratoriais dos voluntários do estudo	46
Gráfico 1 –	Agregação plaquetária, em plasma rico em plaqueta, induzida por colágeno (n=10). (A) diferentes concentrações do ASE, (B) efeito do L-NMMA sobre a agregação com 50 µg/mL de ASE (C) efeito do L-NMMA sobre a agregação com 100 µg/mL de ASE	47
Gráfico 2 –	Agregação plaquetária em plasma rico em plaqueta induzida por ADP (n=10). (A) diferentes concentrações do ASE, (B) efeito do L-NMMA sobre a agregação com 50 µg/mL de ASE (C) efeito do L-NMMA sobre a agregação com 100 µg/mL de ASE	48
Gráfico 3 –	Agregação plaquetária em plasma rico em plaqueta induzida por trombina (n=8). (A) diferentes concentrações do ASE, (B) efeito do L-NMMA sobre a agregação com 50 µg/mL de ASE (C) efeito do L-NMMA sobre a agregação com 100 µg/mL de ASE	49
Gráfico 4 –	Agregação plaquetária em sangue total induzida por colágeno (n=8). (A) diferentes concentrações do ASE, (B) efeito do L-NMMA sobre a agregação com 50 µg/mL de ASE (C) efeito do L-NMMA sobre a agregação com 100 µg/mL de ASE	50
Gráfico 5 –	Atividade da enzima óxido nítrico sintase em plaquetas (n=10)	51
Gráfico 6 –	Níveis intraplaquetários de GMPc (n=12)	52
Gráfico 7 –	Níveis intraplaquetários de AMPc (n=12)	52
Gráfico 8 –	Expressão plaquetária da enzima (A) eNOS total, (B) p-eNOS ^{Ser1177} , (C) p-eNOS ^{Ser1177} /eNOS total, (D) Imagens ilustrativas das expressões enzimáticas por western blotting e gel Stain Free TM (n=6)	54
Gráfico 9 –	Expressão plaquetária da enzima (A) ERK total, (B) p-ERK ^{Thr 202/Tyr 204} , (C) p-ERK ^{Thr 202/Tyr 204} /ERK total, (D) Imagens ilustrativas das expressões enzimáticas por western blotting e gel Stain Free TM (n=6)	55

Gráfico 10 – Expressão plaquetária da enzima (A) Akt total, (B) p-Akt ^{Ser473} , (C) p-Akt ^{Ser1177} /Akt total, (D) Imagens ilustrativas das expressões enzimáticas por western blotting e gel Stain Free TM (n=6).....	56
Gráfico 11 – Expressão plaquetária da enzima (A) p-JNK ^{Thr183/Tyr185} (B) Imagens ilustrativas das expressões enzimáticas por western blotting e gel Stain Free TM (n=6)	56
Gráfico 12 – Atividade da enzima SOD em plaquetas (n=12)	57
Gráfico 13 – Atividade da enzima catalase em plaquetas (n=12)	58
Gráfico 14 – Atividade da enzima GPx em plaquetas (n=12)	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
ADP	Adenosina difosfato
Akt	Proteína quinase B
AMP _c	Monofosfato cíclico de adenosina
ASE	Extrato hidroalcoólico do caroço do açaí
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
COX-1	Ciclooxigenase 1
DAG	Diacilglicerol
DCV	Doença cardiovascular
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FvW	Fator de von Willebrand
GCs	Guanilatociclase solúvel
GMP _c	Monofosfato cíclico de guanosina
GPIb	Complexo glicoproteico Ib
GPx	Glutationaperoxidase
GPIIb/IIIa	Complexo glicoproteico IIb/IIIa
GPVI	Glicoproteína VI
GTP	Guanosina trifosfato
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP3	Fosfatidilinositol trifosfato
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
L-NMMA	N ^G -monometil arginina

MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
p-Akt	Proteína quinase B fosforilada
PDE	Fosfodiesterases
p-eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial fosforilada
p-ERK	Quinase regulada por sinal extracelular fosforilada
PGI ₂	Prostaciclina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato
p-JNK	Quinase c-Jun N-terminal fosforilada
PKA	Proteína quinase A
PKB	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase G
PLC	Fosfolipase C
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
SOD	Superóxido dismutase
TxA ₂	Tromboxano A ₂
VASP	Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	REVISÃO DA LITERATURA	20
1.1	Plaquetas: Estruturas e função	20
1.1.1	<u>Estrutura plaquetária</u>	20
1.1.2	<u>Função plaquetária</u>	22
1.2	Modulação da função plaquetária pelos flavonoides	28
1.3	Papel dos flavonoides presentes do ASE na DCV	34
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo geral	37
2.2	Objetivos específicos	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Seleção dos indivíduos	38
3.2	Coleta de sangue e avaliação laboratorial	38
3.3	Preparo do ASE	39
3.4	Agregação plaquetária	39
3.4.1	<u>Agregação plaquetária em plasma rico em plaqueta</u>	39
3.4.2	<u>Agregação plaquetária em sangue total</u>	40
3.5	Isolamento e preparo da suspensão de plaquetas	41
3.6	Mensuração da atividade da óxido nítrico sintase plaquetária	41
3.7	Mensuração da GMPc e AMPc intracelular	42
3.8	Extração de proteínas e western blotting	42
3.9	Ensaio antioxidantes	43
3.9.1	<u>Mensuração da atividade da superóxido dismutase</u>	44
3.9.2	<u>Mensuração da atividade da enzima catalase</u>	44
3.9.3	<u>Mensuração da atividade da enzima glutathionperoxidase</u>	45
3.10	Análise estatística	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Avaliação laboratorial	46
4.2	Agregação plaquetária em plasma rico em plaqueta	47
4.3	Agregação plaquetária em sangue total	49

4.4	Mensuração da atividade da óxido nítrico sintase plaquetária.....	51
4.5	Mensuração da GMPc.....	51
4.6	Mensuração da AMPc.....	52
4.7	Expressão plaquetária das enzimas eNOS, p-eNOS, ERK, p-ERK, p-JNK. Akt, p-Akt.....	53
4.8	Ensaio antioxidantes.....	57
4.8.1	<u>Mensuração da atividade da superóxido dismutase.....</u>	57
4.8.2	<u>Mensuração da atividade da enzima catalase.....</u>	57
4.8.3	<u>Mensuração da atividade da enzima glutatona peroxidase.....</u>	58
5	DISCUSSÃO.....	59
	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65
	APÊNDICE –Ficha para coleta de dados e anamnese.....	75
	ANEXO A –Termo de consentimento livre e esclarecido.....	76
	ANEXO B –Aprovação do Comitê de Ética	79

INTRODUÇÃO

Os flavonoides, encontrados em frutas, vegetais e cereais integrais, são um grupo de compostos polifenólicos conhecidos por possuírem efeitos protetores contra diversas doenças, especialmente as cardiovasculares (STOCLET *et al.*, 2004). Revisões sistemáticas demonstraram que o seu consumo está associado à redução da mortalidade global e por doença cardiovascular (DCV) (GROSSO *et al.*, 2017; KIM; JE, 2017; LIU *et al.*, 2017). Vários mecanismos estão envolvidos na cardioproteção promovida pelos flavonoides, tais como melhoras no perfil lipídico e nas funções vascular e endotelial, modulação do processo inflamatório e inibição da função plaquetária (FRANKEL *et al.*, 1993; STOCLET *et al.*, 2004).

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos derivados dos megacariócitos, com papel essencial para a manutenção da hemostasia vascular, mas que também podem contribuir para a formação de trombos quando hiperativadas (MICHELSON, 2003). A sua hiperativação é normalmente decorrente de uma quebra no equilíbrio delicado entre a síntese e liberação de moléculas pró- e antiagregantes (RAJENDRAN; CHIRKOV, 2008). Essas moléculas podem ser sintetizadas pela própria plaqueta ou por células adjacentes, como as células endoteliais e outros elementos figurados do sangue. Dentre as moléculas com ação antiagregante, duas são essenciais a esse processo: o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI₂) (RADOMSKI *et al.*, 1987). Em indivíduos com DCV, como hipertensão arterial sistêmica, ou com fatores de risco para DCV, p.ex. obesidade, as plaquetas se encontram em um estado de hiperativação associado a uma produção reduzida de NO (MOSS *et al.*, 2010; LEITE *et al.*, 2016). Essa hiperatividade plaquetária pode contribuir para a formação de trombos, que possuem um papel fundamental na patogênese de doenças isquêmicas, incluindo infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica (GUYTON *et al.*, 2006; JAGROOP *et al.*, 2007; RAJENDRAN; CHIRKOV, 2008).

Nas plaquetas, o NO é produzido a partir do aminoácido L-arginina pela ação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) e inibe a adesão, a ativação e a agregação. O segundo mensageiro nesses processos, o monofosfato cíclico de guanósina (GMPc), é formado pela ação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que converte guanósina trifosfato (GTP) em GMPc. Este promove a ativação de

proteínas quinases G (PKG) e, conseqüentemente, a fosforilação da fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) (MONCADA *et al.*, 1991).

A ação inibitória da PGI₂ também é mediada pela fosforilação das VASP, mas via proteínas quinases A (PKA). Para tanto, há interação PGI₂-receptor prostanoide acoplado à proteína G estimuladora, que ativa a enzima adenilato ciclase com subsequente aumento dos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e ativação da PKA (GAMBARYAN *et al.*, 2010). A fosforilação da VASP, tanto pela PKA quanto pela PKG, leva à redução da sua capacidade de ligação às proteínas do citoesqueleto, impedindo a ativação plaquetária (MONCADA *et al.*, 1991; BUTT *et al.*, 1994).

Por outro lado, a ativação plaquetária ocorre quando da lesão endotelial, ruptura da placa de atheroma ou exposição a agonistas e se caracteriza por alterações na forma da plaqueta e liberação de agentes pró-agregantes e vasoativos, incluindo ADP, serotonina e tromboxano A₂ (TxA₂) (GUYTON *et al.*, 2006; SEMPLE *et al.*, 2011). A ligação dos agonistas aos seus receptores ativa cascatas bioquímicas no citosol. A principal via de ativação plaquetária envolve a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). Essa enzima fosforila o fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂), formando o fosfatidilinositol trifosfato (IP₃), levando à ativação da proteína quinase B (PKB ou Akt), com conseqüente secreção dos grânulos e formação de trombos (LI *et al.*, 2010; SEMPLE *et al.*, 2011). A interação agonista plaquetário-receptor também ativa a fosfolipase C (PLC), com subsequente formação de IP₃ e diacilglicerol (DAG). Tanto o IP₃ quanto o DAG participam do aumento dos níveis intraplaquetários de cálcio (Ca⁺⁺), que é essencial para ativação adicional da plaqueta (p.ex.: via aumento da síntese de TxA₂ e do conteúdo de tirosina fosforilada) e agregação plaquetária (LI *et al.*, 2010). As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) – p.ex.: quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase c-Jun N-terminal (JNK) e p38 – também são estimuladas pelos agonistas plaquetários e estão envolvidas no processo de ativação plaquetária, via aumento da secreção do conteúdo de grânulos (LI *et al.*, 2010).

Diversos estudos demonstram que os flavonoides podem inibir a agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas (TZENG *et al.*, 1991; CHOI *et al.*, 2015; LUZAK *et al.*, 2017). Os mecanismos envolvidos incluem a estimulação da via do NO, a inibição da mobilização de Ca⁺⁺, a fosforilação de proteínas, a diminuição da

síntese de TxA_2 e a atividade antioxidante (PIGNATELLI *et al.*, 2000; GUERRERO *et al.*, 2005; GUO *et al.*, 2005; PIGNATELLI *et al.*, 2006).

A *Euterpe oleracea* Mart., também conhecida pelo nome popular açazeiro, é uma das plantas ricas em flavonoides. Ela é amplamente encontrada na região amazônica e a polpa do seu fruto, o açaí, é comumente consumida no Brasil na forma de suco, sorvete e doces (NASCIMENTO, 2008). Análises químicas do açaí mostraram que tanto a polpa quanto o caroço são ricos em polifenóis, sendo o conteúdo mais expressivo no caroço (RODRIGUES *et al.*, 2006; DE MOURA *et al.*, 2012).

Estudos demonstraram que o extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE) possui efeitos anti-hipertensivos, previne a disfunção endotelial, melhora os perfis lipídico e metabólico e ainda apresenta propriedades vasodilatadoras (ROCHA *et al.*, 2007; DE SOUZA *et al.*, 2012). No entanto, as ações do açaí sobre as plaquetas ainda permanecem desconhecidas.

Considerando os efeitos dos flavonoides sobre as plaquetas, o papel desses fragmentos celulares na DCV e as ações cardioprotetoras do ASE, pode-se hipotetizar que parte dos benefícios cardiovasculares do ASE seja atribuída à inibição plaquetária. Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos do ASE na agregação plaquetária de indivíduos saudáveis e as possíveis vias envolvidas.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Plaquetas: estrutura e função

1.1.1 Estrutura plaquetária

As plaquetas são corpúsculos anucleados, com a forma de disco, medindo cerca de 2 a 4 μm de diâmetro, derivados de células gigantes da medula óssea, os megacariócitos. Em condições normais, existem de 150 mil a 450 mil plaquetas por microlitro (milímetro cúbico) de sangue. Aproximadamente, 100 bilhões de plaquetas são produzidas por dia e estas apresentam meia-vida de 7 a 10 dias na circulação (ITALIANO JR, 2008; SEMPLE *et al.*, 2011).

Geralmente, a superfície da membrana plasmática plaquetária é lisa, exceto por invaginações periódicas, que determinam as entradas do sistema canalicular. Este sistema forma um complexo de membrana que permeia o citoplasma da plaqueta, permitindo a liberação de proteínas e demais moléculas quando da ativação plaquetária (ITALIANO JR, 2008; SEMPLE *et al.*, 2011). Os principais receptores presentes na superfície das plaquetas são o receptor de glicoproteína para o fator von Willebrand (FvW), denominado complexo glicoproteico Ib (GPIb); e receptores para fibrinogênio, chamados de complexo glicoproteico IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) ou integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (GRESELE *et al.*, 2007).

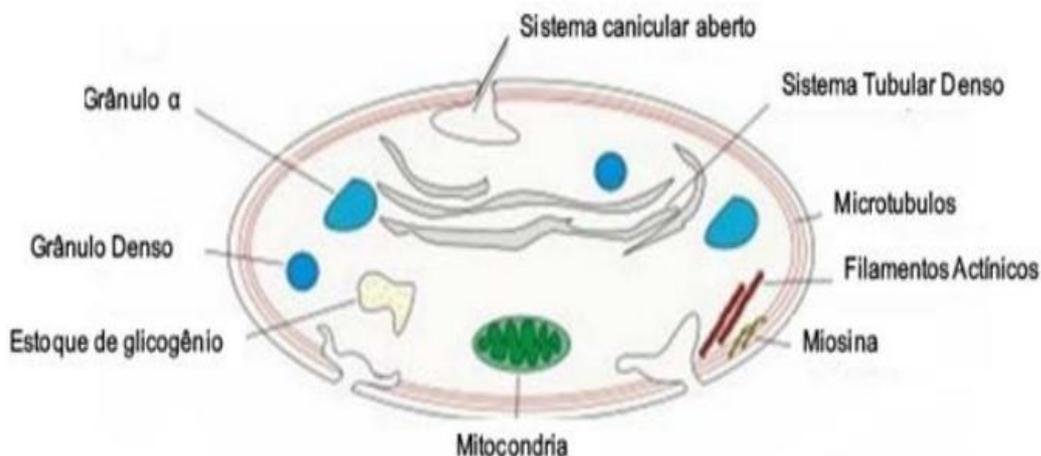
Os componentes presentes no interior da plaqueta são: (a) organelas, (b) grânulos e (c) sistemas de membrana especializados (Figura 1).

(a) Organelas – há pequeno número de mitocôndrias; lisossomos, com enzimas de degradação; e peroxissomos, que contêm a enzima antioxidante catalase (ITALIANO JR, 2008). Apesar de não possuírem núcleo, estudos mostram que as plaquetas são capazes de gerar suas próprias proteínas durante a hemostasia ou o processo inflamatório, pois contêm uma quantidade substancial de mRNA dos megacariócitos e possuem toda maquinaria necessária para o processo de tradução (WICKI *et al.*, 1989; ROWLEY *et al.*, 2012).

(b) Grânulos – subdividem-se em dois tipos, α e densos, e estão localizados próximo à membrana do sistema canicular aberto, quando as plaquetas estão em repouso. Os grânulos α são os mais abundantes e contêm proteínas fundamentais para adesão plaquetária durante o reparo vascular, como FvW, plasminogênio, fibronectina e P-selectina. Já os grânulos densos contêm serotonina, catecolaminas, adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP) e cálcio, que promovem o recrutamento de outras plaquetas para o tampão em crescimento via interação ligante-receptor específico (SEMPLE *et al.*, 2011).

(c) Sistemas de membrana especializados – acredita-se que tenha função semelhante a do sistema reticular endoplasmático liso de outras células e, portanto, sirva como o sistema predominante de armazenamento de cálcio nas plaquetas. A liberação de cálcio desse sistema leva à ativação plaquetária (PARISE *et al.*, 2001). Por ser o local no qual se encontra a enzima cicloxigenase, a síntese de prostaglandinas e TxA_2 ocorre nestes sistemas (PARISE *et al.*, 2001).

Figura 1- Estrutura plaquetária



Fonte: Disponível em: https://www.ufrgs.br/lacvet/site/wpcontent/uploads/2016/07/metabol_plaquetasRoberta.pdf/ Acesso em: 09 Jul. 2018.

1.1.2 Função plaquetária

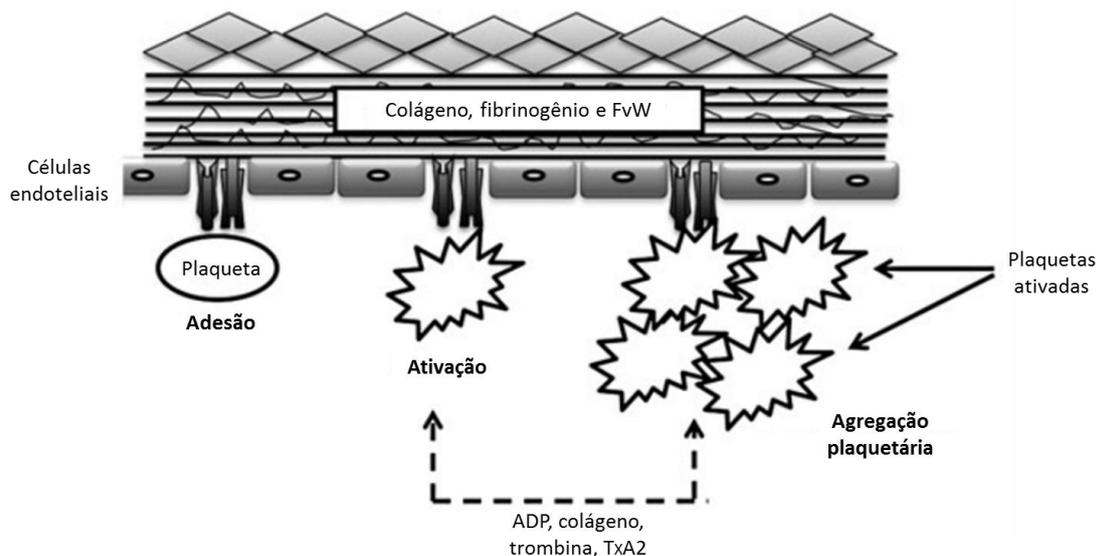
As funções primárias das plaquetas são prevenir a perda sanguínea e manter a integridade vascular, através da formação do trombo hemostático (FERRONI *et al.*, 2012). Em condições fisiológicas, as plaquetas fluem continuamente pelos vasos, sem aderir ou agregar porque a camada de células endoteliais que reveste os vasos sanguíneos possui um fenótipo anticoagulante, pela produção de PGI_2 e NO, ambos inibidores da ativação plaquetária (RADOMSKI *et al.*, 1987). No entanto, na presença de injúria ou trauma vascular, ocorre exposição de proteínas subendoteliais – p.ex.: FvW e colágeno – e, subsequentemente, a adesão plaquetária, a fim de promover a cicatrização tecidual (FERRONI *et al.*, 2012). Depois de alguns minutos, forma-se um tampão hemostático plaquetário que oclui a lesão e detém a perda de sangue. A formação desse tampão ocorre a partir de três fases (FERRONI *et al.*, 2012):

1ª) Adesão: evento resultante da ligação das plaquetas aos componentes da matriz extracelular e celular da parede vascular danificada. A interação do receptor plaquetário GPIb ao FvW desempenha importante papel na adesão inicial por possibilitar a adesão de outras plaquetas circulantes à superfície vascular, enquanto a adesão firme é promovida por integrinas plaquetárias e receptor de colágeno glicoproteína VI (GPVI) (ANDREWS; BERNDT, 2004; YIP *et al.*, 2005).

2ª) Ativação: a adesão plaquetária induz uma rápida transdução de sinal, provocando aumento de Ca^{++} intraplaquetário. Como consequência, a plaqueta modifica sua forma, que passa de discoide a irregular, devido à emissão de pseudópodos, que facilitam a agregação e atração de outras plaquetas (FERRONI *et al.*, 2012).

3ª) Agregação: processo através do qual as plaquetas se agrupam e se ligam às superfícies de outras plaquetas. A interação entre as plaquetas é o resultado da ligação do fibrinogênio à glicoproteína IIb/IIIa. O fibrinogênio se encontra solúvel no plasma e a glicoproteína IIb/IIIa está presente na membrana fosfolipídica da plaqueta. A glicoproteína IIb/IIIa apenas se liga ao fibrinogênio após a plaqueta sofrer a alteração em forma com a extensão de pseudópodes. Essa reação de agregação plaquetária é autocatalítica, ativando outras plaquetas para que ocorra a formação do tampão hemostático primário (Figura 2) (FERRONI *et al.*, 2012).

Figura 2 – Adesão, ativação e agregação plaquetária



Fonte: Adaptado de SANTHAKUMAR, A.B *et al.* (2014).

A ativação plaquetária *in vivo* normalmente resulta do contato com mais de um agonista. A lesão inicial do endotélio expõe o colágeno, mas também produzirá trombina. Da mesma forma, dano a tecidos e eritrócitos irá liberar ADP, assim como plaquetas ativadas irão sintetizar e liberar TxA₂. Também é importante lembrar que os agonistas estimulam diferentes vias com eficiência também distinta (ITALIANO JR, 2008; FERRONI *et al.*, 2012).

A trombina é o agonista plaquetário mais potente, pois induz a liberação de ADP e TxA₂ para promover máxima ativação plaquetária mesmo quando usada em baixíssimas concentrações *in vitro* (COUGHLIN, 2000). A ativação plaquetária induzida por trombina é mediada pela interação com receptores da família de receptores ativado por protease (PAR) acoplados à proteína G. As plaquetas humanas apresentam PAR-1 e -4, que coletivamente são acoplados a vias efetoras mediadas por proteína G_q e G₁₃. A ativação de G₁₃ está relacionada com reorganização do citoesqueleto e alterações de forma da plaqueta, enquanto G_q participa da eficiente hidrólise de PIP2 pela fosfolipase C, com aumento citosólico de cálcio (KAHN *et al.*, 1999; COUGHLIN, 2000).

O agonista ADP, por sua vez, atua nos receptores P2X₁, P2Y₁ e P2Y₁₂ (GACHET, 2005; ITALIANO JR, 2008). O receptor P2X₁ é um canal de cátions dependente de ATP, que permite o influxo de cálcio na plaqueta (LÉON *et al.*, 1997). No entanto, a sua ativação não é suficiente para promover completa agregação

plaquetária, mas induz a alteração morfológica da plaqueta e participa da agregação plaquetária induzida por estresse de cisalhamento e por colágeno (ROLF *et al.*, 2001). Os demais receptores, P2Y₁ e P2Y₁₂, são receptores acoplados a proteínas G_q e G_{i2}, respectivamente. O receptor P2Y₁ promove ativação da fosfolipase C e consequente mobilização de cálcio intracelular, que resulta em rearranjo do citoesqueleto e induz agregação plaquetária fraca e transitória; porém, fundamental para o início da agregação plaquetária induzida por ADP. Já o receptor P2Y₁₂ é responsável por completar a agregação plaquetária induzida por ADP e também por outros agentes, tais como a serotonina, TxA₂, trombina e colágeno. Deste modo, o receptor P2Y₁₂ possui o papel de amplificar os sinais intracelulares que ocorrem durante a agregação plaquetária via PI3K (GACHET, 2005; ITALIANO JR, 2008).

O colágeno é a maior molécula subendotelial capaz de servir como substrato para adesão de plaquetas, bem como provocar ativação plaquetária. O colágeno induz ativação plaquetária principalmente pela ligação aos receptores GPVI e integrina αIIbβ₃, que levam à ativação de tirosinas quinases, formação de TxA₂, aumento da concentração de Ca⁺⁺ e mudança no citoesqueleto. (YIP *et al.*, 2005; ITALIANO JR, 2008).

O quadro 1 apresenta uma descrição sucinta dos agonistas mencionados e suas vias efetoras.

Quadro 1 - Agonistas plaquetários: Receptores e efetores bioquímicos

Agonistas	Receptores	Efeitores bioquímicos
Trombina	PAR-1 e -4	Proteína G _q → PLC → IP ₃ → ↑ Ca ⁺⁺
	P2X ₁	Canal de cátion dependente de ATP → ↑ Ca ⁺⁺
ADP	P2Y ₁	Proteína G _q → PLC → IP ₃ → ↑ Ca ⁺⁺
	P2Y ₁₂	Proteína G _{i2} → PI3K → Akt → Secreção de grânulos
Colágeno	GPVI	PLC → IP ₃ → ↑ Ca ⁺⁺
	Integrina αIIbβ ₃	PI3K → Akt → Secreção de grânulos

Fonte: A autora, 2018.

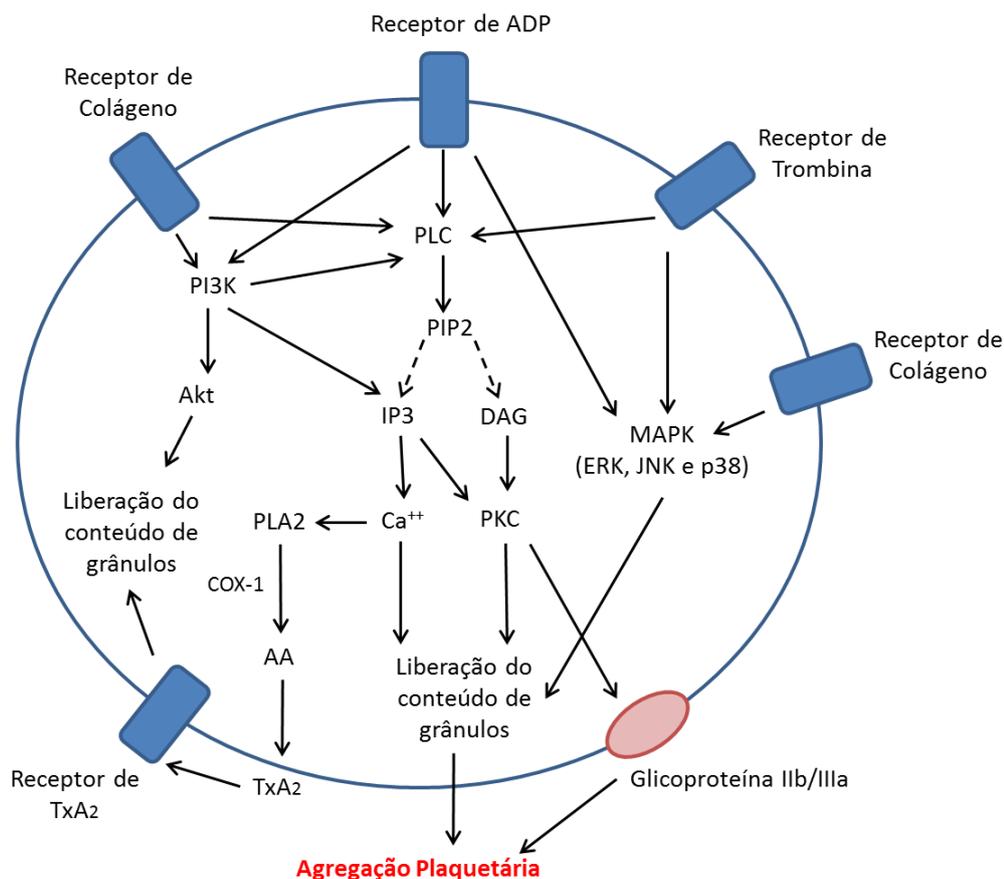
Após a ligação desses agonistas aos seus receptores acoplados à proteína G intracelular, ocorrerá ativação de fosfolipases. A principal via de ativação plaquetária envolve a PI3K, que, quando ativa, fosforila o PIP₂ para formar IP₃. Este induz a ativação da Akt, levando à secreção de grânulos e formação de trombos (GACHET,

2005; LI *et al.*, 2010). Em conjunto com a PI3K, a enzima PLC hidrolisa o PIP2 da membrana plaquetária em 2 componentes, o IP3 e o DAG. O IP3 ativa os receptores do sistema tubular denso, permitindo a liberação de cálcio para o citosol. Este aumento de cálcio intraplaquetário é responsável por maior liberação do conteúdo dos grânulos e ligação à calmodulina e, conseqüentemente, rearranjar o citoesqueleto da plaqueta para a formação dos pseudópodes. O DAG ativa a PKC que, assim como o IP3, induz a liberação dos componentes dos grânulos intracelulares e ativa o complexo $\alpha\text{IIb}\beta_3$. A integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ expõe seu sítio de ligação, passando de um estado de baixa atividade (plaqueta em repouso), para o estado de alta afinidade (plaqueta ativada). Neste estado, a integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ interage fortemente com o fibrinogênio solúvel no plasma, mediando o processo de agregação e a formação do tampão plaquetário (GACHET, 2005; YIP *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2010).

A ligação dos agonistas aos seus receptores também promove ativação da cascata das MAPK. As MAPK constituem uma família de proteínas serina/treonina quinases que abrangem grande número de proteínas, tais como ERK, JNK e p38 (FLEVARIS *et al.*, 2009). Adam *et al.* (2010) demonstraram que ratos “Knockout” para JNK 1 apresentaram prejuízo na formação de trombos “in vivo” e “in vitro” e que esta enzima desempenha um papel indireto na ativação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (ADAM *et al.*, 2010). Outros estudos verificaram que a ERK também é essencial para a ativação do receptor de fibrinogênio, além de contribuir para a secreção e a agregação plaquetária induzida por colágeno (GARCIA *et al.*, 2005). A p38 é fundamental para agregação induzida por colágeno ou trombina. Entre os numerosos alvos desta enzima, o mais relevante nas plaquetas parece ser a fosfolipase A_2 (PLA₂), que catalisa a liberação de ácido araquidônico (AA) da membrana fosfolipídica para produzir TxA₂ (SAKLATVALA *et al.*, 1996). O TxA₂ age na própria plaqueta ou em plaquetas adjacentes, estimulando a fosfolipase C, através de um mecanismo de retroalimentação positivo (ITALIANO JR, 2008).

A figura 3 apresenta um esquema resumido das principais vias de sinalização envolvidas na ativação plaquetária.

Figura 3 – Vias de sinalização envolvidas na ativação plaquetária



Fonte: A autora, 2018.

Legenda: →, estímulo; -->, produtos formados a partir do PIP2 por ação de PLC; AA, ácido araquidônico; Akt, proteína quinase B; COX-1, cicloxigenase-1; DAG, diacilglicerol; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; IP3k, fosfatidilinositol trifosfato; JNK, quinase c-Jun N-terminal; MAPK, Proteínas quinases ativadas por mitógenos; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinase; PIP2, fosfatidilinositol bifosfato; PKC, proteína quinase C; PLA2, fosfolipase A2; PLC, fosfolipase C; TxA₂, tromboxano A₂.

Como as plaquetas possuem a habilidade de serem rapidamente ativadas, são necessários mecanismos fisiológicos reguladores para evitar a agregação indiscriminada. A PGI₂ e o NO são dois destes reguladores, ambos liberados pelo endotélio vascular (RADOMSKI *et al.*, 1987). Além disso, o NO também pode ser produzido pela própria plaqueta, como descrito a seguir (MONCADA *et al.*, 1991).

O NO é um gás inorgânico de meia-vida curta (menos de 30 segundos em sistemas biológicos de mamíferos) e está envolvido em importantes processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, vasodilatação, atividade citotóxica do sistema imune, inibição da adesão e agregação plaquetárias (MONCADA *et al.*, 1988; MONCADA *et al.*, 1991; MONCADA; HIGGS, 2006). Nos mamíferos, o NO é

sintetizado a partir do aminoácido catiônico L-arginina pela família de enzimas NOS. As plaquetas expressam as isoformas endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) (MONCADA; HIGGS, 1993). Inicialmente, acreditava-se que apenas o NO produzido pelo endotélio modulasse a função das plaquetas. No entanto, Freedman e colaboradores demonstraram que o NO produzido pela própria plaqueta era capaz de regular sua função e inibir de forma marcante o recrutamento de plaquetas na formação do trombo (FREEDMAN *et al.*, 1999).

Uma vez que o NO é produzido, seus efeitos são mediados diretamente por segundos mensageiros, sendo a via da ativação da enzima GCs a mais estudada. Essa enzima converte GTP em GMPc, que promove o relaxamento da musculatura lisa vascular e a inibição da adesão e agregação plaquetárias. O GMPc se liga a proteínas-alvo, como proteínas quinases dependentes de PKG e canais iônicos regulados por GMPc, o que leva à redução da concentração intracelular de Ca^{++} , com consequente relaxamento do músculo liso (IGNARRO, 2002; MONCADA; HIGGS, 2006). A ativação das PKG também resulta em: inibição de eventos relacionados com a ativação plaquetária, tais como elevação intracelular de cálcio, ativação de integrinas, reorganização do citoesqueleto, secreção de grânulos; redução da liberação de P-selectina, que é necessária à adesão plaquetária; e inibição da ligação do fibrinogênio ao receptor IIb/IIIa durante a agregação plaquetária, pela redução do número total destes receptores na superfície da membrana da plaqueta (LI *et al.*, 2003).

Da mesma forma, a função plaquetária também pode ser inibida por AMPc, induzido por PGI_2 . A PGI_2 , sintetizada no endotélio, ativa diretamente receptores prostanoídes acoplados à proteína G presentes na membrana da plaqueta, ativando a adenilato ciclase, aumentando o segundo mensageiro AMPc, cujos efeitos são principalmente mediados por PKA (GAMBARYAN *et al.*, 2010).

Tanto as PKA quanto as PKG têm como substrato a proteína de adesão focal VASP. A PKA fosforila a VASP principalmente no resíduo de serina 157, enquanto a PKG fosforila o resíduo de serina 239 (HORSTRUP *et al.*, 1994; SMOLENSKI *et al.*, 1998). A VASP no estado fosforilado mostra uma redução na capacidade de se ligar a proteínas do citoesqueleto, o que compromete a reorganização estrutural das plaquetas e, conseqüentemente, impede a ativação plaquetária (MASSBERG *et al.*, 2004).

Embora sejam essenciais para a manutenção da hemostasia vascular e no processo de cicatrização, as plaquetas quando hiperativadas estão envolvidas na trombogênese, um importante fator para o desenvolvimento da placa aterosclerótica (MICHELSON, 2003; RAJENDRAN; CHIRKOV, 2008). Esta, por sua vez, pode bloquear o suprimento sanguíneo do coração ou do cérebro e desencadear infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (GUYTON *et al.*, 2006), que são responsáveis por 80% das mortes por DCV, a principal causa de morte no mundo (OMS, 2017). Assim, o uso de agentes antiplaquetários – p. ex.: inibidores da ciclooxigenase (ex. ácido acetilsalicílico), inibidores da fosfodiesterase (ex. dipiridamol), antagonistas do receptor de ADP (ex. clopidogrel, prasugrel) e antagonistas da glicoproteína IIb/IIIa (ex. abciximabe) – estão entre as medidas de prevenção secundária de DCV em pacientes com doença estabelecida (BRUNTON *et al.*, 2012; OMS, 2017).

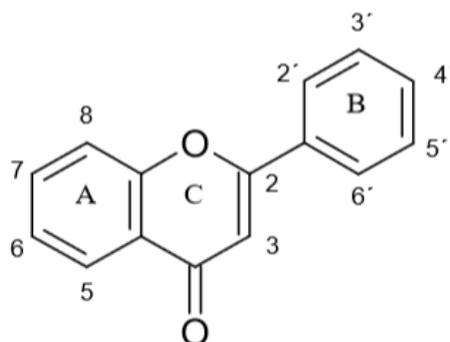
1.2 Modulação da função plaquetária pelos flavonoides

Os flavonoides são um grande grupo de compostos secundários das plantas, que conferem pigmentos e odores a frutas e vegetais (presentes principalmente nas sementes, casca e flores) (FELDMANN, 2001), com importante papel no crescimento e desenvolvimento porque protegem o vegetal contra o estresse biótico e abiótico (DIXON; HARRISON, 1990). Em humanos, o consumo de flavonoides está associado à redução da mortalidade total e por DCV (GROSSO *et al.*, 2017; KIM; JE, 2017; LIU *et al.*, 2017).

A descoberta dos flavonoides ocorreu em 1930 por Albert Szent-Gyorgyi, durante seus estudos sobre metabolismo celular e vitamina C. Tais estudos motivaram o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1937 (SZENT-GYÖRGYI, 1933). Posteriormente, os flavonoides foram descritos como compostos polifenólicos com dois anéis de benzeno (A e B) ligados através de um anel de pirona (C) (Figura 4) (PIETTA, 2000; HODEK *et al.*, 2002). Mais de 8000 flavonoides já foram identificados em plantas e a lista está constantemente aumentando (PIETTA, 2000). Isso ocorre devido à modificação do anel aromático, como hidroxilação, metilação, glicosilação (PIETTA, 2000). As principais classes de flavonoides incluem os

flavonóis, as flavonas, as flavanonas, flavanóis, as antocianinas e as isoflavonas (ROSS; KASUM, 2002).

Figura 4 - Estrutura básica dos flavonoides



Fonte: FAGGIO *et al.* (2013).

Dentro dos subgrupos dos flavonóis, a quercetina é o flavonoide de maior ocorrência nas frutas. As flavonas são encontradas em abundância nas cebolas, maçãs e brócolis. As flavanonas estão presentes na maioria das frutas cítricas. Os flavanóis são subdivididos em duas classes, monoméricos (p.ex.: catequina e epicatequina) e poliméricos (p.ex.: proantocianidinas) e estão em grande quantidade nos chás verde e preto, no vinho tinto e no açaí. Além de presentes nestes alimentos, as antocianinas são encontradas no morango e nas uvas. Já as isoflavonas, chamadas fitoestrógenos em função de serem consideradas moduladoras naturais de receptor de estrógeno, são encontradas em grande quantidade na soja (ROSS; KASUM, 2002).

Além da ação antioxidante descrita por Albert Szent Gyorgyi em 1930, diversas atividades biológicas são atribuídas aos flavonoides: antitumoral (MIDDLETON *et al.*, 2000), anti-inflamatória (MIDDLETON *et al.*, 2000), antialérgica (RIVERA *et al.*, 2006), antiplaquetária (TZENG *et al.*, 1991; GUO *et al.*, 2005), anti-hipertensiva (ROCHA *et al.*, 2008).

Apesar de ter sido demonstrado que elevadas concentrações de flavonoides podem inibir a agregação plaquetária provocada por ADP, trombina e colágeno (TZENG *et al.*, 1991; CHOI *et al.*, 2015; LUZAK *et al.*, 2017), os mecanismos envolvidos neste processo são complexos e dependem de cada composto. Contudo, a maioria dos flavonoides parece inibir a agregação plaquetária através da via do

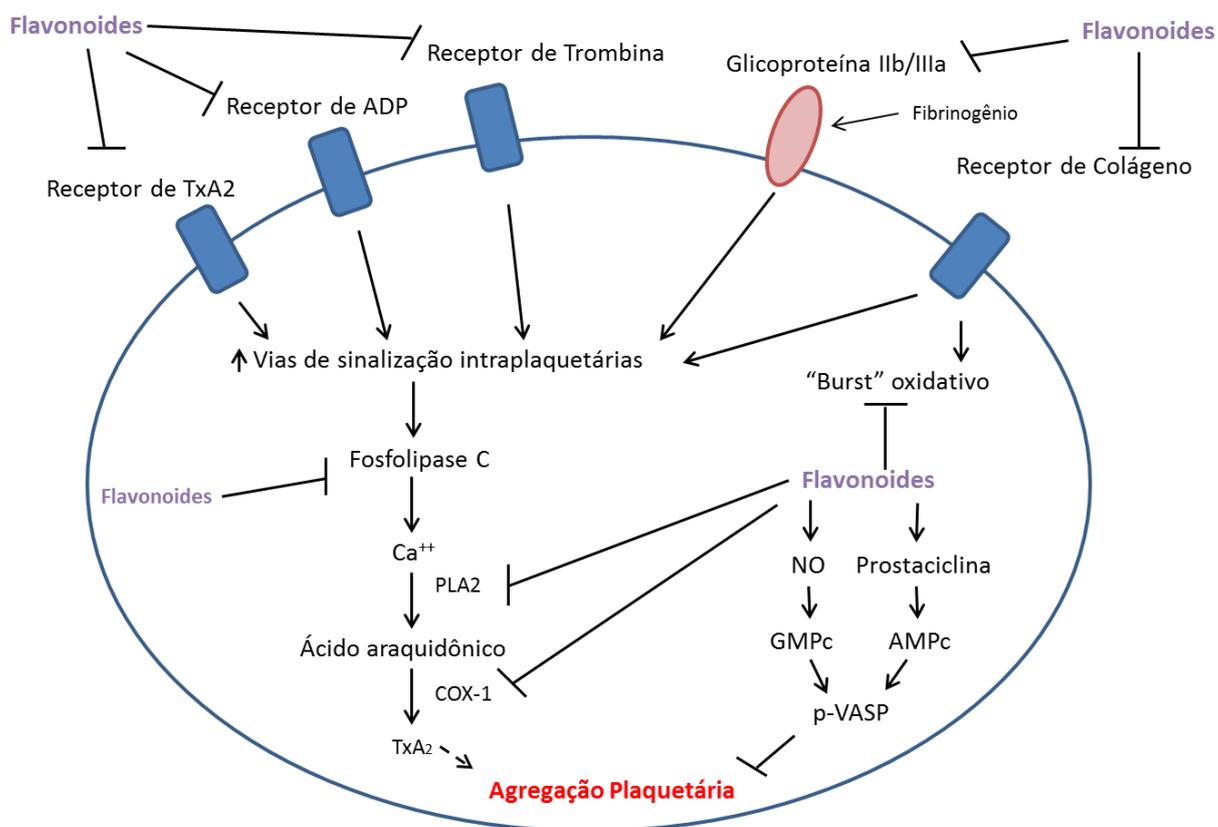
ácido araquidônico, diminuindo os níveis de TxA_2 . Isto ocorre, principalmente, através da inibição da COX-1 (CORVAZIER; MACLOUF, 1985) ou da PLA_2 (NANDA *et al.*, 2007), ou via antagonismo no receptor de TxA_2 (GUERRERO *et al.*, 2005) (Figura 5).

Os efeitos dos flavonoides sobre as plaquetas incluem também: a inibição do aumento citoplasmático de Ca^{++} (GUO *et al.*, 2005) e da secreção de grânulos (LIU *et al.*, 2017); aumento nos níveis de AMPc e GMPc (RUCKSTUHL *et al.*, 1979; DI VITO *et al.*, 2012); diminuição da degradação de PIP2 e da atividade de PKC (LIU *et al.*, 2016); e inibição da fosforilação de diversas vias, tais como PI3K/Akt e ERK 1/2, p38 e JNK 1/2 (CHOI *et al.*, 2015; HAO *et al.*, 2015).

O NO é outro ponto importante da ação dos flavonoides sobre as plaquetas. Um estudo realizado com catequinas e quercetinas demonstrou que esses flavonoides aumentaram a produção de NO, acompanhado pela diminuição da expressão da integrina $\alpha IIb\beta 3$, receptor de fibrinogênio e colágeno (PIGNATELLI *et al.*, 2006). De forma semelhante, o tratamento com flavonoides curcuminoides aumentou os níveis de NO em plaquetas ativadas por agonistas (MAHESWARAIAH *et al.*, 2015).

Conforme anteriormente mencionado, os flavonoides possuem ainda um importante efeito sobre o estresse oxidativo, por sua capacidade de neutralizar diretamente os radicais livres, diminuir a produção enzimática de espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou aumentar a atividade de enzimas antioxidantes (BORS *et al.*, 1990; PIGNATELLI *et al.*, 1998). O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre as ERO e antioxidantes (FINKEL; HOLBROOK, 2000; WEI *et al.*, 2004). Esse desequilíbrio pode ser decorrente de aumento da produção de ERO, redução das defesas antioxidantes, ou ambos os processos (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

Figura 5 – Modulação da função plaquetária pelos flavonoides



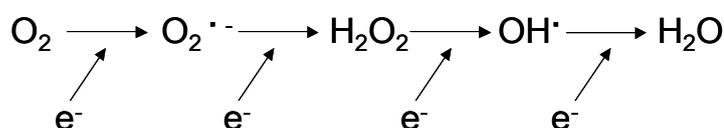
Fonte: Adaptado de FAGGIO *et al.* (2013).

Legenda: →, estímulo nas vias de ativação plaquetária; —|, bloqueio; AMPc, monofosfato cíclico de adenosina; COX-1, cicloxigenase-1; GMPc, monofosfato cíclico de guanosina; NO, óxido nítrico; PLA₂, fosfolipase A₂; TxA₂, tromboxano A₂; p-VASP, fosfoproteína estimulada por vasodilatadores.

O termo ERO refere-se não apenas a radicais livres – átomos ou moléculas altamente reativas, que contêm um número ímpar de elétrons na sua última cadeia eletrônica – (BALLATORI *et al.*, 2009), mas também a moléculas com relativa instabilidade que não possuem elétrons desemparelhados, sendo a maioria derivadas do metabolismo do oxigênio e encontradas no ambiente e em todos os sistemas biológicos (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Em condições fisiológicas, durante o metabolismo aeróbico, o O₂ tende a receber um elétron de cada vez devido a sua configuração eletrônica, formando intermediários altamente reativos – como o superóxido (O₂^{•-}), o radical hidroxila (OH[•]) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (KOPANI *et al.*, 2006) (Figura 6).

Figura 6 - Redução tetravalente do O_2 com formação das espécies reativas ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet})



Fonte: Adaptado de KOPANI *et al.* (2006).

As ERO incluem: $O_2^{\bullet-}$, que pode sofrer dismutação e favorecer a formação do H_2O_2 , ou reagir com o NO para formar $ONOO^-$ (uma espécie reativa de nitrogênio, ERN); H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério porque participa da produção de OH^{\bullet} ; que, por sua vez, é considerado o radical mais reativo em sistemas biológicos, produzindo dano no local onde foi produzido (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MONCADA; HIGGS, 2006; OLAS; WACHOWICZ, 2007).

Uma produção adicional de ERO ocorre a partir da ação da NOS quando a concentração de tetrahydrobiopterina (cofator) ou de L-arginina (substrato) está reduzida. Assim, a NOS passa a produzir $O_2^{\bullet-}$ e não NO. Esse fenômeno tem sido referido como desacoplamento de NOS (MONCADA; HIGGS, 2006; OLAS; WACHOWICZ, 2007). O NO e $O_2^{\bullet-}$ reagem, formando um agente mais tóxico, o $ONOO^-$ (OLAS; WACHOWICZ, 2007).

Semelhante a neutrófilos, células endoteliais, células do músculo liso, fibroblastos e macrófagos, as plaquetas possuem diversas fontes enzimáticas de produção de ERO como ciclooxigenase, xantina oxidase, citocromos, eNOS “desacoplada” e NADPH oxidase, sendo esta última a principal produtora de $O_2^{\bullet-}$ (PIETRAFORTE *et al.*, 2014). Nas plaquetas, as ERO e ERN desempenham um papel chave nos processos de adesão e ativação. O colágeno, ao se ligar ao seu receptor na plaqueta, estimula a ativação da PKC, que, por sua vez, estimula a NADPH oxidase a produzir $O_2^{\bullet-}$ (KRÖTZ *et al.*, 2002). O aumento desta ERO parece estimular a liberação de ADP, aumentando o recrutamento plaquetário. Além disso, o $O_2^{\bullet-}$ parece aumentar a expressão do CD40L na membrana da plaqueta (PIGNATELLI *et al.*, 2004). Como mencionado anteriormente, o $O_2^{\bullet-}$ pode reagir com NO formando $ONOO^-$, reduzindo a biodisponibilidade de NO (OLAS; WACHOWICZ, 2007).

Para evitar a ação prejudicial das ERO e ERN, as plaquetas, assim como outras células, contêm mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (SEDDON *et al.*, 2007). O termo antioxidante se refere a substâncias que, mesmo em pequenas concentrações quando comparadas às do substrato oxidável, reduzem significativamente ou inibem a oxidação de tal substrato (RIBEIRO *et al.*, 2005).

O mecanismo antioxidante enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). Já as vias não enzimáticas são formadas pelas vitaminas A, C e E, e pela glutathiona (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MULLER; MORAWIETZ, 2009). A SOD catalisa a conversão do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , que, posteriormente, é convertido em água pela ação das enzimas CAT e GPx (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BRUCKDORFER, 2005).

Embora seja bem estabelecida a ação antioxidante dos flavonoides, pouco se sabe sobre seus efeitos no estresse oxidativo em plaquetas. Um estudo demonstrou que os flavonoides quercetina e catequinas reduzem o *burst* oxidativo, inibindo o aumento do influxo de Ca^{++} , a ativação do inositol e subsequente agregação plaquetária (PIGNATELLI *et al.*, 2000). Em modelo animal de hipotireoidismo, o tratamento com quercetina reverteu o aumento da agregação plaquetária e a redução da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em plaquetas (BALDISSARELLI *et al.*, 2017). Já Wang *et al.* (2015) mostraram que o flavonoide kaempferol inibiu a fosforilação da subunidade $p47^{phox}$ da enzima NADPH oxidase, assim como diminuiu a produção de ERO (WANG *et al.*, 2015). Uma redução da produção de $O_2^{\bullet-}$ em plaquetas humanas, não estimuladas e estimuladas com trombina, foi observada quando da incubação com frações fenólicas do fruto da *Hippophae rhamnoides* L. Adicionalmente, houve menor dano lipídico, mensurado pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em plaquetas, sob estímulo ou não (OLAS *et al.*, 2016).

1.3 Papel dos flavonoides presentes no açaí na DCV

A planta *Euterpe oleracea* Mart., popularmente conhecida como açaizeiro, é uma Palmácea da família Aracaceae amplamente encontrada na região Amazônica, principalmente nos estados do Pará, Amazonas, Tocantins, Maranhão e Amapá. Os frutos dessa planta possuem cor violeta, forma arredondada, diâmetro de cerca de 13,3 mm, pesam aproximadamente 2 g, distribuídos em uma polpa violeta ($\pm 17\%$) e uma semente bege ($\pm 83\%$) (Figura 7) . A polpa do fruto do açaí é comumente consumida no Brasil na forma de suco, sorvete, doces (NASCIMENTO, 2008).

Figura 7 - Foto da palmeira *Euterpe oleracea* Mart. (açaizeiro)



Fonte: Disponível em: <https://www.sitiodamata.com.br/acai-precoce-brs-para-euterpe-oleracea/> Acesso em 14 abr. 2018.

A maioria dos estudos farmacológicos sobre a polpa do açaí começou no início dos anos 2000 e se concentrou principalmente na sua composição química e no seu efeito antioxidante (DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2004; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; SCHAUSS *et al.*, 2006; DE MOURA; RESENDE, 2016). Análises químicas do açaí mostraram que tanto a polpa quanto a semente são ricas em polifenóis. Na polpa, por meio de análises cromatográficas, foi demonstrada a presença de quantidade significativa de flavonoides, com predomínio das antocianinas do tipo cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo. Também foram identificados o ácido protocatecuico e a epicatequina (DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2004; SCHAUSS *et al.*, 2006). Diferentemente da polpa, a análise química do ASE mostrou a presença predominante de catequina, epicatequina e proantocianidinas poliméricas e

oligoméricas (RODRIGUES *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). Além disso, estudos demonstraram que o caroço apresenta conteúdo polifenólico mais expressivo que a polpa (ROCHA *et al.*, 2007).

Diversos estudos demonstram os efeitos benéficos do açaí no tratamento e na prevenção de DCV. No entanto, poucos estudos foram realizados em humanos. O primeiro deles trata-se de um estudo piloto que buscou investigar o efeito da polpa do açaí sobre os marcadores de desordem metabólica em 10 sujeitos com sobrepeso. Esses pacientes ingeriram 100 g dessa fruta, duas vezes ao dia, durante um mês. Após o tratamento foi observado uma redução nos níveis de glicose, insulina, colesterol total, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), na razão do colesterol total pelas lipoproteínas de alta densidade (HDL), além de redução nos níveis de glicose pós-prandial (UDANI *et al.*, 2011). Recentemente, Alqurashi *et al.* (2016) investigaram o efeito agudo do consumo da polpa do açaí em homens com sobrepeso. Os resultados apontaram uma melhora na função vascular, avaliada pela dilatação fluxo-mediada da artéria braquial, medida 2 e 6 horas depois da refeição, e redução no estresse oxidativo, observada pela redução total de peróxido no plasma (ALQURASHI *et al.*, 2016).

Em modelo animal, diferentes estudos mostraram que ratos submetidos a uma dieta rica em gordura, quando tratados com a polpa, óleo ou com o ASE, obtiveram uma redução nos níveis de colesterol total, triglicerídeos e LDL, melhora nos níveis de HDL e níveis aterogênicos, além de apresentarem uma menor formação de placa aterosclerótica em suas artérias (DE SOUZA *et al.*, 2012; FEIO *et al.*, 2012; FARIA E SOUZA *et al.*, 2017a; FARIA E SOUZA *et al.*, 2017b).

O efeito anti-hipertensivo do ASE foi observado pela primeira vez no trabalho de Rocha *et al.* (2008). Nesse estudo foi relatado que o tratamento com o ASE reduziu a pressão arterial em diferentes modelos experimentais de hipertensão, sugerindo ainda que isso tenha ocorrido devido às ações antioxidantes e vasodilatadoras do açaí (ROCHA *et al.*, 2008). Essa mesma autora, no ano anterior já havia mostrado o efeito vasodilatador dependente do endotélio do ASE, sugerindo a participação da via NO/GMPc nas ações cardioprotetoras do açaí (ROCHA *et al.*, 2007). Em 2012, da Costa *et al.* mostraram que esse composto também preveniu a disfunção endotelial e reduziu os níveis de renina em ratos com hipertensão renovascular (DA COSTA *et al.*, 2012). Essa diminuição nos níveis de renina também foi observada por Bem *et al.* (2014) em ratos submetidos à restrição

proteica e tratados com ASE. A renina é um componente chave do sistema renina-angiotensina que tem como principal função a regulação da pressão arterial. Esse mesmo estudo também constatou que esse tratamento protegeu os animais contra a hipertensão na idade avançada, estresse oxidativo, alterações funcionais e estruturais renais (BEM *et al.*, 2014). Em 2015, Morsy *et al.* mostraram que o extrato do açaí, de forma dose-dependente, foi capaz de atenuar a lesão renal induzida por isquemia/reperfusão (EL MORSY *et al.*, 2015).

Além da hipertensão, o ASE também se mostrou benéfico em um modelo experimental de infarto agudo do miocárdio. Em um modelo de ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda, o ASE preveniu a intolerância ao esforço, hipertrofia cardíaca e fibrose ventricular esquerda, características do infarto (ZAPATA-SUDO *et al.*, 2014).

A atividade farmacológica antioxidante do açaí também foi observada em diversos estudos e pode ser devido à eliminação direta de radicais livres (“scavenging”), diminuição da atividade de enzimas endógenas produtoras de ERO e/ou aumento da atividade de enzimas antioxidantes (DE MOURA; RESENDE, 2016). Em 2012, da Costa *et al.* mostraram o aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase e GPx, e da expressão da SOD, em ratos hipertensos tratados com ASE, além de redução no dano oxidativo estimado pela da peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas (DA COSTA *et al.*, 2012). Oliveira *et al.* (2010) constataram que o ASE preveniu o aumento de malondealdeído e dano proteico em ratos submetidos a uma dieta rica em gordura (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010). A redução do estresse oxidativo também foi observada em ratos adultos submetidos à restrição proteica materna durante a gravidez (BEM *et al.*, 2014).

Considerando os importantes efeitos dos flavonoides sobre a função plaquetária e o potencial do açaí na prevenção e no tratamento de DCV, pode-se hipotetizar que os benefícios do ASE podem estar relacionados com a modulação da função plaquetária. No entanto, até o momento, a ação do açaí sobre a função plaquetária não foi investigada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos *in vitro* do ASE sobre a função plaquetária de indivíduos saudáveis, bem como os mecanismos moleculares envolvidos.

2.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos deste trabalho determinar os efeitos do ASE sobre:

- a) a agregação plaquetária induzida por colágeno, ADP e trombina;
- b) a atividade da enzima óxido nítrico sintase;
- c) a expressão das enzimas óxido nítrico sintases endotelial, ERK, JNK e Akt;
- d) os níveis intraplaquetários de GMPc e AMPc;
- e) a atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção dos indivíduos

Participaram do estudo 15 homens jovens aparentemente saudáveis entre 20 e 40 anos de idade. Foram considerados critérios de exclusão: qualquer doença de diagnóstico conhecido, tabagismo, dislipidemia, sobrepeso ou obesidade, uso de medicamentos antiplaquetários e/ou anti-inflamatórios nas duas semanas anteriores à coleta de sangue e transfusão recente de sangue e/ou derivados. A participação no estudo foi voluntária e somente se deu após o consentimento por escrito dos participantes (Anexo A). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ (CAAE 69677817.0.0000.5259) (Anexo B).

3.2 Coleta de sangue e avaliação laboratorial

Após jejum de 12 horas, o sangue foi coletado por venopunção em tubos contendo o anticoagulante apropriado para cada um dos experimentos (EDTA para o hemograma e ACD ou citrato de sódio 3,8% para os experimentos com plaquetas) ou sem anticoagulante e com ativador de coágulo para obtenção de soro para análises bioquímicas de rotina.

Os dados clínicos dos participantes do estudo foram obtidos utilizando-se a ficha de dados apresentada no Apêndice. As avaliações bioquímicas e hematológicas foram realizadas no Laboratório Central do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE).

3.3 Preparo do ASE

O ASE foi gentilmente cedido pelo Professor Dr. Roberto Soares de Moura, que obteve os frutos da planta *Euterpe oleracea* Mart. pela Universidade Federal do Pará. Após a lavagem, aproximadamente 200 g do caroço do açaí foram separados da casca, triturados, embebidos em 400 mL de água destilada e fervidos por cinco minutos. Após o resfriamento, foi adicionado 400 mL de etanol. O extrato hidroalcoólico foi guardado em geladeira durante 10 dias e agitado periodicamente por 2 a 4 h. Depois desse período, o extrato foi filtrado em papel de filtro tipo xarope e, posteriormente, em papel de filtro tipo Whatman número 1. O etanol foi evaporado à baixa pressão na temperatura de 50° a 60°C. O resíduo foi liofilizado e mantido a -20°C até o uso. Finalizado o preparo, o conteúdo de polifenóis foi medido por Folin Ciocalteu e seu potencial vasodilator verificado através da reatividade vascular. Essas medidas foram utilizadas como controle de qualidade e viabilidade do extrato para a posterior utilização (ROCHA *et al.*, 2007).

Foram preparadas soluções estoque de ASE nas concentrações de 1000, 5000, 10000 µg/mL utilizando água destilada como diluente. As soluções ficaram armazenadas no freezer -20°C até o momento do uso.

3.4 Agregação plaquetária

3.4.1 Agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas

O sangue coletado, anticoagulado com citrato de sódio a 3,8%, foi centrifugado (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Alemanha) a 200 g por 15 minutos em temperatura ambiente, para obtenção do plasma rico em plaqueta (PRP). O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido por centrifugação de 800 g por 10 minutos (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Alemanha). A concentração plaquetária do PRP foi ajustada com o PPP para uma contagem constante de $1,5 \times 10^8$ /mL. A agregação plaquetária foi induzida por diferentes agonistas, conforme a seguir, na ausência e

na presença de ASE e monitorada por 8 minutos em um agregômetro óptico de 4 canais (Chrono-Log, EUA):

- a) Colágeno (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Chrono-Log, EUA) – o PRP foi pré-incubado com 10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ASE por 15 minutos.
- b) ADP (10 μM ; Chrono-Log, EUA) – o PRP foi pré-incubado com 10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ASE por 15 minutos.
- c) Trombina (0,4 U /mL; Cayman Chemical, EUA) – o PRP foi pré-incubado com 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ASE por 15 minutos.

Para investigar se o NO estaria envolvido nas ações do ASE sobre a agregação plaquetária, esta foi realizada na presença de N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA; Sigma, EUA) (0,1 mM) uma vez que compete com a L-arginina pelo transportador e pela enzima NOS. O L-NMMA foi adicionado ao plasma rico em plaquetas 20 minutos antes da incubação com ASE.

Os testes foram realizados a 37°C, numa velocidade de rotação de 900 rpm. A agregação máxima foi expressa em percentual.

3.4.2 Agregação plaquetária em sangue total

O sangue coletado anticoagulado com citrato de sódio a 3,8% foi diluído em solução salina (0,9%, 1:1) e pré-incubado por 15 minutos com ASE (50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), além da condição basal. Similarmente à agregação em PRP, o L-NMMA (0,1 mM) também foi adicionado a cada uma dessas condições. Posteriormente, a agregação foi induzida por colágeno (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e monitorada por 8 minutos (Agregômetro 560CA, Chrono-log, EUA). Os testes foram realizados a 37°C numa velocidade de rotação de 1200 rpm. A agregação máxima foi expressa em ohms.

3.5 Isolamento e preparo da suspensão de plaquetas

O preparo da suspensão de plaquetas descrito a seguir foi realizado para os experimentos da atividade da NOS, GMPc, AMPc, Western blotting e ensaios antioxidantes.

As amostras de sangue foram coletadas por venopunção e transferidas para tubos de polipropileno, onde o sangue foi misturado com anticoagulante ACD (73,7 mM ácido cítrico, 85,9 mM citrato de sódio e 111 mM glicose). Todas as etapas de isolamento e preparo das plaquetas foram realizadas em temperatura ambiente. A primeira centrifugação das amostras foi realizada durante 15 minutos a 200 g (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Alemanha), para obtenção do PRP. Em seguida, o PRP foi transferido para tubos de polipropileno e centrifugado a 900 g (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Alemanha) por 10 minutos. O sobrenadante foi, então, descartado e as plaquetas ressuspensas em solução Krebs (mM) (119 NaCl, 4,6 KCl, 1,5 CaCl₂, 1,2 NaH₂PO₄, 1,2 MgCl₂, 15 NaHCO₃ e 11 glicose, pH 7,4) .

3.6 Mensuração da atividade da óxido nítrico sintase plaquetária

As plaquetas ressuspensas em solução Krebs (500 µL) foram pré-incubadas com 50 ug/mL ou 100 ug/mL de ASE por 15 minutos para posterior mensuração da atividade da NOS. A atividade desta enzima foi avaliada pela conversão de L-[³H]-arginina em L-[³H]-citrulina. A L-[³H]-arginina (0,01 M) foi adicionada à suspensão de plaquetas, seguida de incubação por 45 minutos a 37°C. A reação foi interrompida por rápida centrifugação (20800 g, 1 minuto) (Centrifuge 5417 C, Eppendorf AG, Alemanha) e posterior lavagem com solução de Krebs. As plaquetas foram lisadas com Triton X-100 e transferidas para uma coluna contendo a resina Dowex. A L-[³H]-citrulina foi removida para tubos de cintilação, o líquido cintilante adicionado e a radioatividade contada (LS 6500 Liquid Scintillation Counter, Beckman Counter Inc., California, EUA) .

3.7 Mensuração intraplaquetária de GMPc e AMPc

A suspensão de plaquetas (500 μ L) foi pré-incubada por 15 minutos na ausência (condição basal) e na presença de ASE (50 e 100 μ g/mL). Em seguida, 200 μ M de IBMX (inibidor de fosfodiesterase) foi adicionado à amostra e, após 30 minutos, a reação foi interrompida ao adicionarmos 500 μ L de ácido perclórico (3M). A solução foi submetida ao banho de ultrassom (MaxiClean 1400, Unique, São Paulo, Brasil) por 15 minutos e mergulhada no nitrogênio líquido (para a lise de plaquetas). Em sequência, a amostra foi centrifugada (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Alemanha) a 20800 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e estocado a -80°C (Thermo Scientific Forma 900 series, EUA), até a leitura por um ensaio enzimático utilizando o método ELISA (Kit Cayman - Michigan, EUA) .

3.8 Extração de proteínas e western blotting

Foram avaliadas a expressão das enzimas eNOS, óxido nítrico sintase endotelial fosforilada (p-eNOS) , ERK, quinase regulada por sinal extracelular fosforilada (p-ERK), quinase c-Jun N-terminal fosforilada (p-JNK), Akt, proteína quinase B fosforilada (p-Akt). A suspensão de plaquetas foi previamente incubada com ASE nas concentrações de 50 ou 100 μ g/mL durante 15 minutos. Em seguida, adicionaram-se 10 μ L do coquetel de inibidores de protease (p8340-Sigma) e 10 μ L do coquetel de inibidores de fosfatase (p0044-Sigma), 200 μ L de tampão de extração de proteínas, e 50 μ L de EDTA (100mM). As amostras foram rapidamente congeladas com nitrogênio líquido e, após o descongelamento, foram colocadas em banho de ultrassom (MaxiClean 1400, Unique, São Paulo, Brasil) por 15 minutos. A remoção de debris celulares foi realizada depois de centrifugação (Centrifuge 5417 C, Eppendorf AG, Alemanha) a 20800 g por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi armazenado no freezer -80°C (Thermo Scientific Forma 900 series, EUA) até a sua utilização.

Os ensaios de western blotting foram realizados com 20 µg de proteína dos lisados de plaquetas suspensos em tampão NuPAGE LDS, após desnaturação das proteínas por incubação a 70°C (Tchne Dri-Block CB-3D, Sigma Chemical, St. Louis, EUA) por 10 minutos.

As proteínas foram fracionadas por eletroforese (200 V, 200 mA, 60 min) em gel Stain Free™ 10% ou 12% (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), utilizando-se tampão de corrida [concentrado 5 x (250 mM MOPS, 250 mM Tris; 5 mM EDTA, 17,3 SDS)], e transferidas (15 V, 328 mA, 45 min) para membranas de PVDF (Invitrogen, Califórnia, EUA) em tampão de transferência (48 mM Tris, 39 mM Glicina, 1,3 mM SDS).

Foram utilizados anticorpos eNOS (610297, BD Biosciences, Califórnia, EUA), p-eNOS (S1177, Cell signaling technology, Massachusetts, EUA), p-JNK (SC-6254, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA), Akt (SC-8312, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) e p-Akt (SC-33437, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) na concentração 1:1000, já as proteínas ERK (SC-135900, Santa Cruz Biotechnology) e p-ERK (SC-16982, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) na concentração 1:500. O gel ativado por exposição à ultravioleta no aparelho Bio-Rad ChemiDoc MP imager foi utilizado como controle de quantidade de proteína nas amostras. O Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Marker (GE Healthcare, EUA) foi usado como padrão de peso molecular. O procedimento empregado para detecção das bandas foi a incubação com ECL (Bio-Rad, Clarity Max, Califórnia, EUA). As intensidades das bandas foram normalizadas para a intensidade das bandas do gel por análise densitométrica.

A quantificação das imagens foi realizada com o programa Adobe Photoshop (Adobe Photoshop CS5.1 Extended Edition).

3.9 Ensaio antioxidantes

As plaquetas ressuspensas em solução Krebs, como já descrito anteriormente, foram pré-incubadas com 100 µg/mL de ASE por 15 minutos para posterior mensuração da atividade de enzimas antioxidante.

3.9.1 Mensuração da atividade da superóxido dismutase

A atividade da SOD foi estimada por um ensaio que determina a habilidade da enzima de inibir a auto-oxidação do pirogalol. O princípio desse método é baseado na competição entre a auto-oxidação do pirogalol pelo $O_2^{\bullet-}$ e o processo de “dismutação” do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 pela SOD (MARKLUND; MARKLUND, 1974). Uma vez que não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade, utiliza-se uma unidade relativa. Define-se uma unidade de SOD como a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição na auto-oxidação do pirogalol. Para tal, foi feita uma curva padrão com concentrações conhecidas de SOD.

Previamente ao experimento, o volume da amostra foi calculado para conter 200 ug de proteína. Em uma cubeta estrangulada foi adicionado 970 μ L Tampão Tris-HCl (0,05 M de Tris-HCl + 1 mM de EDTA) e 10 μ L de Pirogalol. A oxidação do pirogalol forma um produto colorido detectado espectrofotometricamente, através de uma análise cinética com duração de 5 minutos e intervalos de 20 segundos, numa absorvância de 325 nm. (Genesys™ 10SUV-Vis Spectrophotometer, EUA).

3.9.2 Mensuração da atividade da enzima catalase

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do H_2O_2 . Foram utilizados 200 μ L da suspensão de plaquetas em cubetas de quartzo. Em cada cubeta, foram adicionados 1800 μ L de tampão com peróxido de hidrogênio (25 mL de PBS para 40 μ L de H_2O_2). A leitura foi realizada nos tempos de 0, 30 e 60 segundos, numa absorvância de 240 nm (Genesys™ 10SUV-Vis Spectrophotometer, EUA) (AEBI, 1984).

3.9.3 Mensuração da atividade da enzima glutathiona peroxidase

Foram adicionados a uma cubeta 200 μ L da suspensão de plaqueta e 1800 μ L de tampão fosfato (PBS) que contem glutathiona reduzida (GSH), glutathiona reductase (GR) e azida sódica (20 mL de tampão para 4mL de GSH + 4mL GR + 1mL de azida sódica). A amostra foi incubada nesse tampão por 10 minutos. Após adição de 200 μ L de peróxido de hidrogênio, foi realizada leitura por 5 minutos.

A determinação da atividade da GPx foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determina por espectrofotômetro, no comprimento de onda de 340 nm (Genesys™10SUV-Vis Spectrophotometer, EUA) (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984).

3.10 **Análise estatística**

Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média (EPM). Para comparação das diferentes concentrações do ASE, foi utilizado o teste ANOVA de uma entrada com medidas repetidas. Em caso de F significativo, foi realizado um pós -teste de Holm Sidak. Quando apenas uma concentração do ASE foi testada, o teste-t pareado foi aplicado. As premissas para ambos os testes foram testadas antes da utilização dos mesmos. A significância estatística foi considerada quando $p \leq 0,05$. Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 6.0.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação laboratorial

Foram selecionados para o estudo voluntários aparentemente saudáveis. Dessa forma, eles apresentavam perfil lipídico, glicêmico, estado nutricional e pressão arterial dentro dos valores de referência. A Tabela 1 apresenta os dados clínicos e laboratoriais desses pacientes (n=15).

Tabela 1 - Dados clínicos e laboratoriais dos voluntários do estudo

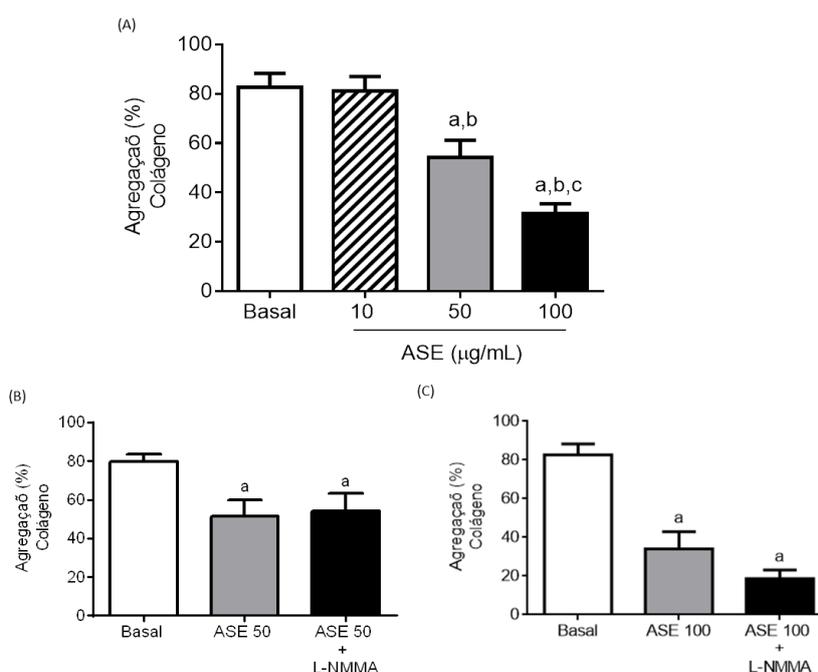
Dados	Indivíduos
Idade (anos)	30,3 ± 7,9
Índice de massa corporal (kg/m ²)	23,6 ± 2,9
Pressão arterial sistólica (mm Hg)	124,0 ± 8,4
Pressão arterial diastólica (mm Hg)	78,0 ± 11,3
Hematócrito (%)	44,5 ± 2,2
Hemoglobina (g/dL)	15,2 ± 1,0
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	201,3 ± 39,8
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	5767,5 ± 1200,2
Creatinina (mmol/L)	1,0 ± 0,2
Ácido úrico (mg/dL)	5,1 ± 1,0
Glicose (mg/dL)	80,7 ± 1,7
Colesterol total (mg/dL)	168,1 ± 13,0
Colesterol HDL (mg/dL)	62,3 ± 4,2
Colesterol LDL (mg/dL)	91,5 ± 11,5
Triglicerídeos (mg/dL)	64,1 ± 17,1

Fonte: A autora, 2018.

4.2 Agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas

Nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, o ASE reduziu a porcentagem de agregação induzida por colágeno (Gráfico 1A) e ADP (Gráfico 2A). A trombina, além de estimular a agregação plaquetária, também induz a formação do coagulo de fibrina em plasma rico em plaqueta. O ASE nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a formação do coagulo e a agregação plaquetária induzidas por trombina (Gráfico 3A). A ação do L-NMMA diferiu de acordo com o agonista utilizado. Quando as plaquetas foram estimuladas com colágeno, o L-NMMA não reverteu os efeitos do ASE (Gráfico 1B e 1C). No entanto, o L-NMMA eliminou a ação do ASE nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ em plaquetas ativadas com trombinas (Gráfico 3B e 3C), mas apenas na menor concentração em plaquetas estimuladas com ADP (Gráfico 2B).

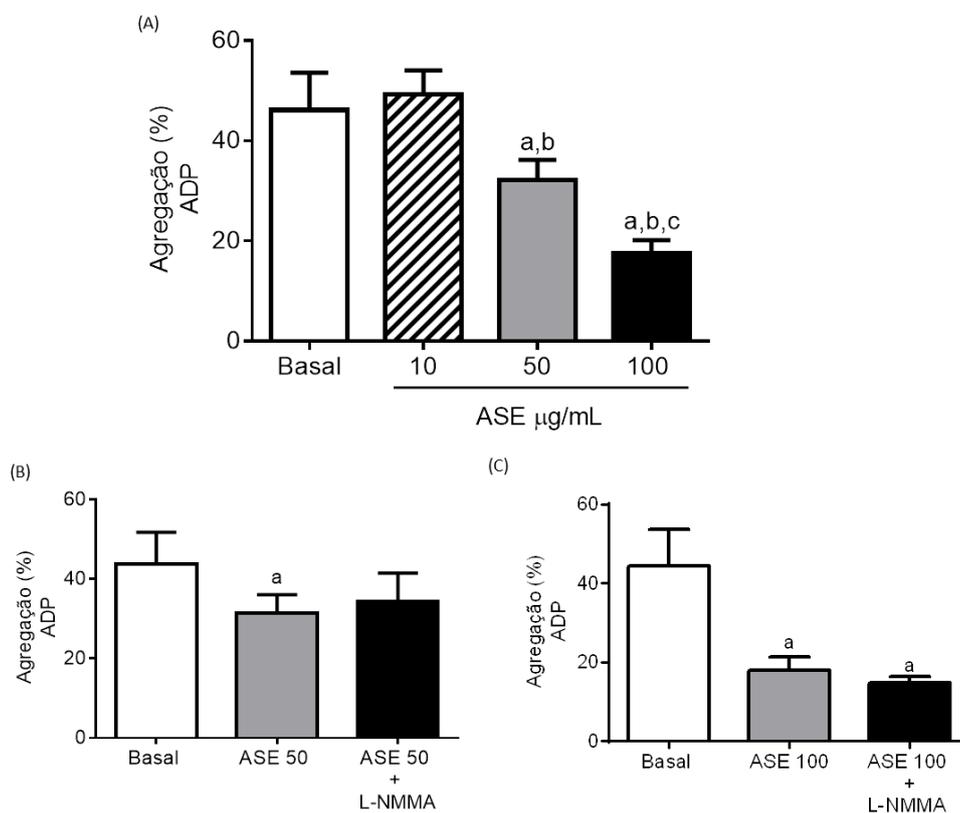
Gráfico 1 - Agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas, induzida por colágeno (n=10). (A) Diferentes concentrações do ASE, (B) efeito do L-NMMA sobre a agregação com 50 $\mu\text{g/mL}$ de ASE, (C) efeito do L-NMMA sobre a agregação com 100 $\mu\text{g/mL}$ de ASE



Legenda: ^a Diferente do grupo basal, ^b diferente do grupo ASE 10 $\mu\text{g/mL}$, ^c diferente do grupo ASE 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p \leq 0,05$).

Fonte: A autora, 2018.

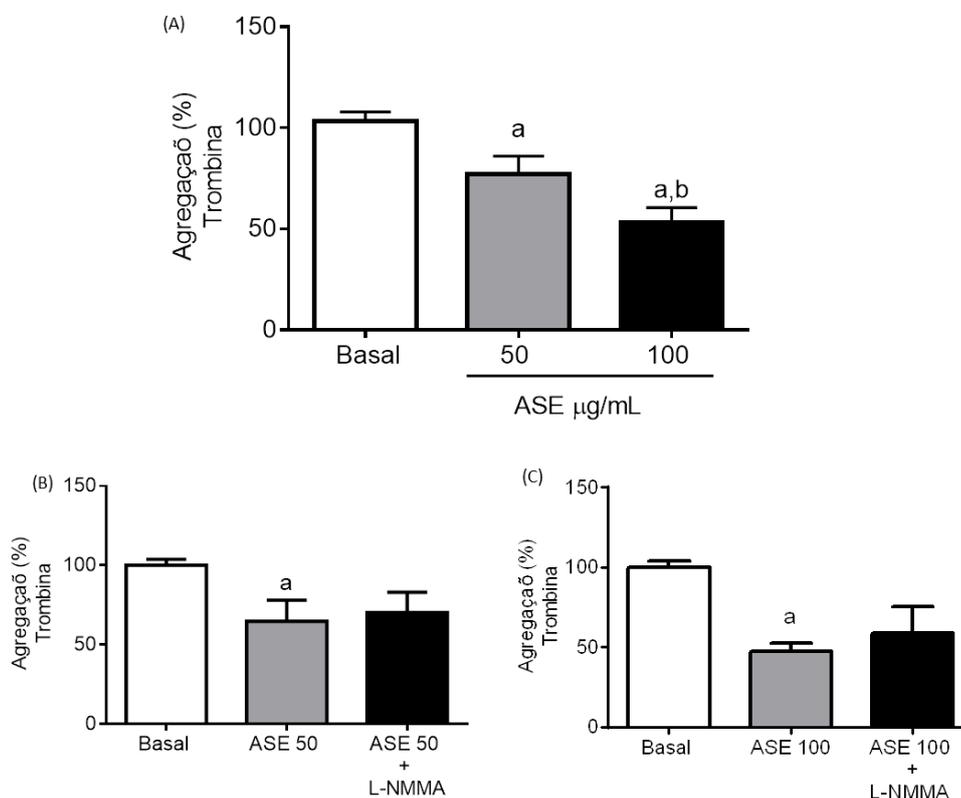
Gráfico 2 - Agregação plaquetária, em plasma rico em plaquetas, induzida por ADP (n=10). (A) Diferentes concentrações do ASE, (B) efeito do L-NMMA sobre a agregação com 50 µg/mL de ASE, (C) efeito do L-NMMA sobre a agregação com 100 µg/mL de ASE



Legenda: ^a Diferente do grupo basal, ^b diferente do grupo ASE 10 µg/mL, ^c diferente do grupo ASE 50 µg/mL ($p \leq 0,05$).

Fonte: A autora, 2018.

Gráfico 3 - Agregação plaquetária, em plasma rico em plaquetas, induzida por trombina (n=8). (A) Diferentes concentrações do ASE, (B) efeito do L-NMMA sobre a agregação com 50 µg/mL de ASE, (C) efeito do L-NMMA sobre a agregação com 100 µg/mL de ASE



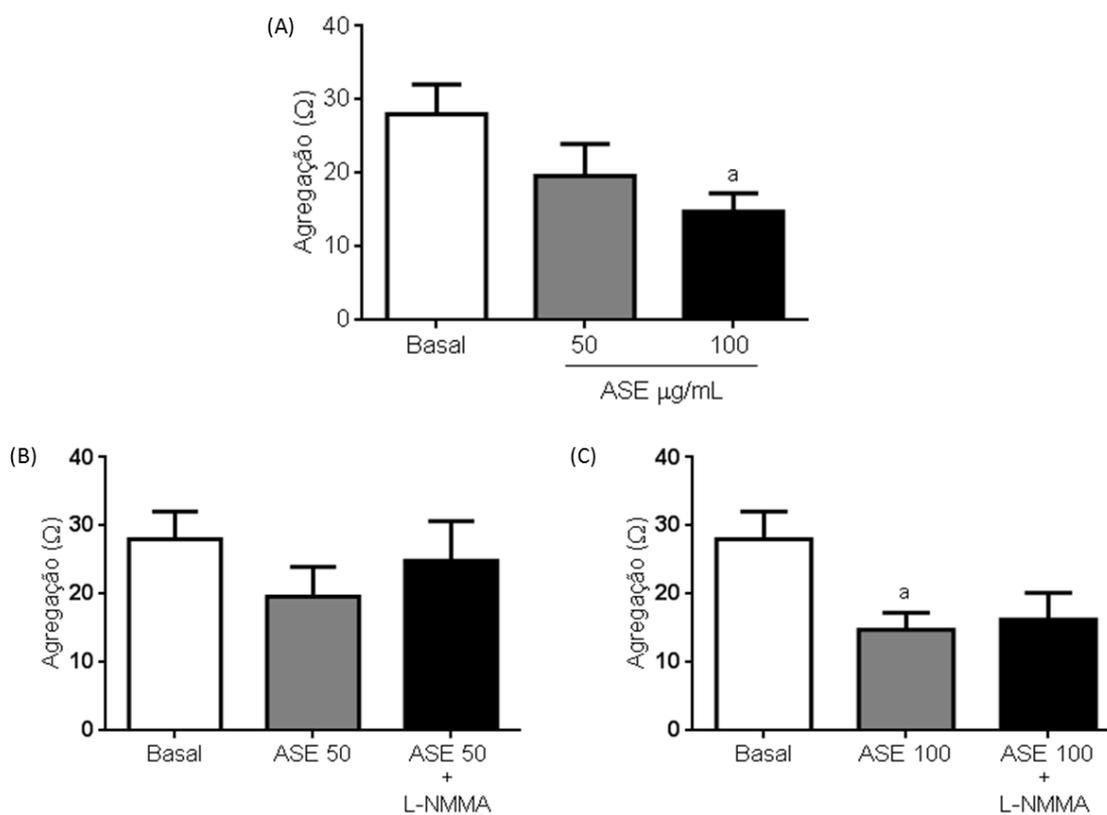
Legenda: ^a Diferente do grupo basal, ^b diferente do grupo ASE 10 µg/mL, ^c diferente do grupo ASE 50 µg/mL ($p \leq 0,05$).

Fonte: A autora, 2018.

4.3 Agregação plaquetária em sangue total

A concentração de 100 µg/mL de ASE reduziu a agregação plaquetária realizada em sangue total induzida por colágeno. O L-NMMA não interferiu na agregação em nenhuma das concentrações de ASE utilizadas (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Agregação plaquetária em sangue total, induzida por colágeno (n=8). (A) diferentes concentrações do ASE, (B) efeito do L-NMMA sobre a agregação com 50 µg/mL de ASE, (C) efeito do L-NMMA sobre a agregação com 100 µg/mL de ASE



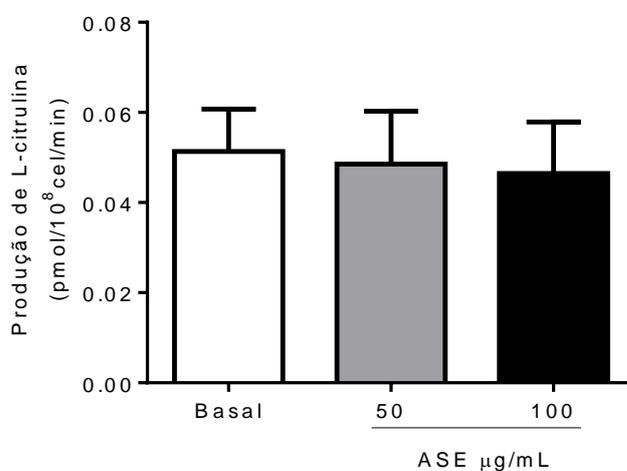
Legenda: ^a Diferente do grupo basal ($p \leq 0,05$).

Fonte: A autora, 2018.

4.4 Mensuração da atividade da óxido nítrico sintase plaquetária

A atividade da NOS plaquetária, avaliada através da produção de L-citrulina, não se mostrou alterada após a incubação com as diferentes doses de ASE testadas (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Atividade da enzima óxido nítrico sintase em plaquetas (n=10)

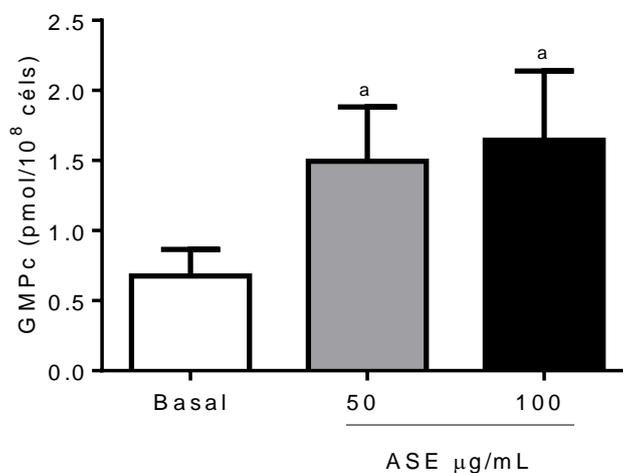


Fonte: A autora, 2018.

4.5 Mensuração do GMPc

Houve um aumento significativo nos níveis de GMPc em plaquetas que foram previamente incubadas com ASE nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Níveis intraplaquetários do GMPc (n=12)

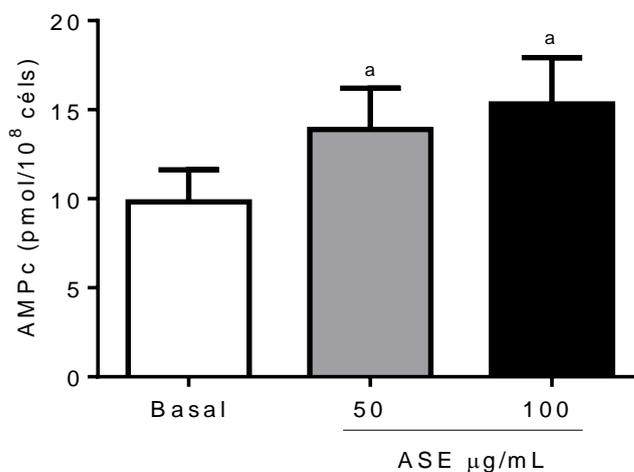


Legenda: ^a Diferente do grupo basal ($p \leq 0,05$).
Fonte: A autora, 2018.

4.6 Mensuração do AMPc

Plaquetas incubadas com ASE nas concentrações de 50 e 100 µg/mL apresentaram níveis intraplaquetários de AMPc significativamente mais elevados, quando comparado ao grupo controle (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Níveis intraplaquetários do AMPc (n=12)

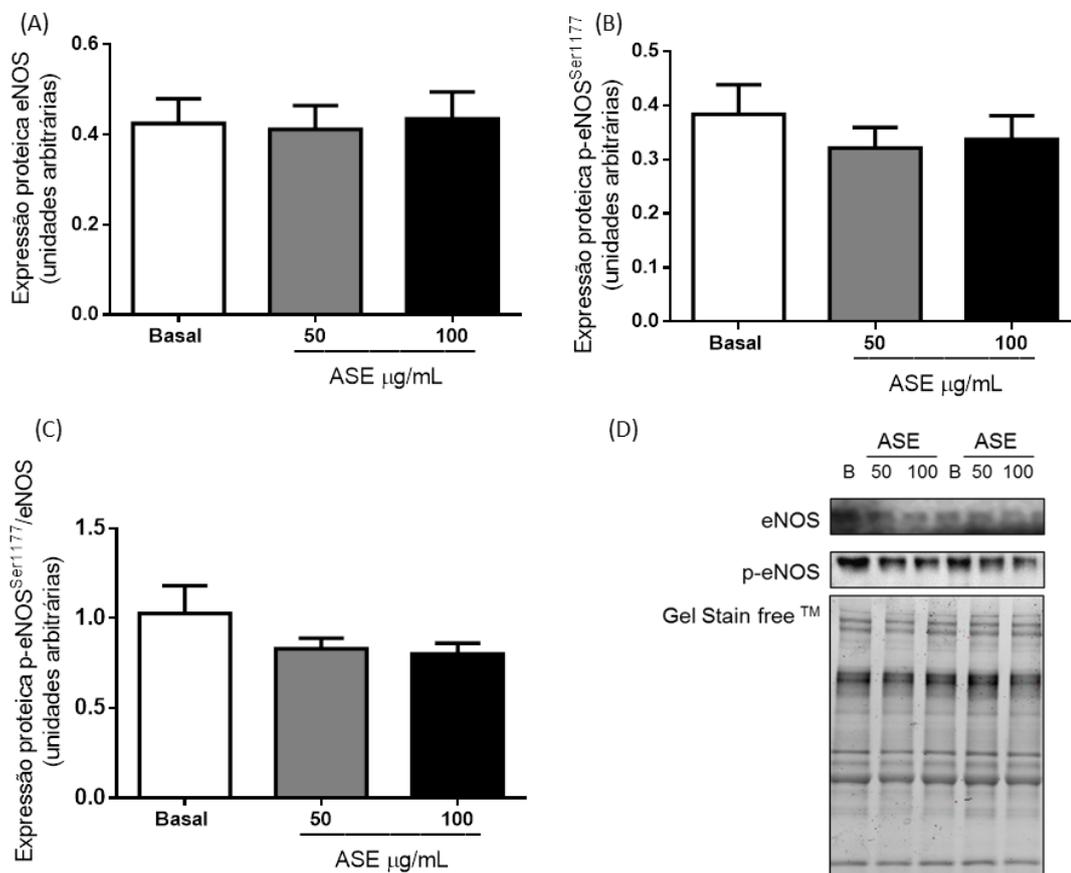


Legenda: ^a Diferente do grupo basal ($p \leq 0,05$).
Fonte: A autora, 2018.

4.7 Expressão plaquetária das enzimas eNOS, p-eNOS, ERK, p-ERK, p-JNK, Akt, p-Akt

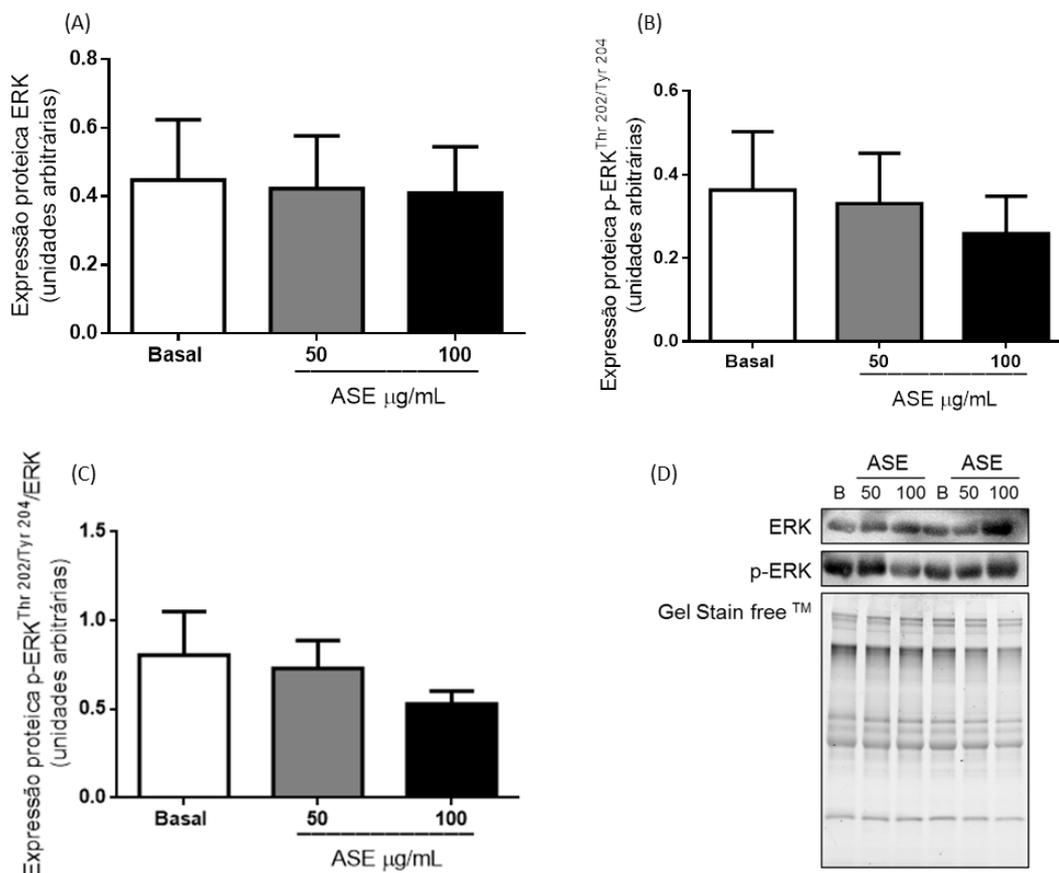
As diferentes concentrações de ASE testadas não alteraram a expressão plaquetária da enzima eNOS em sua forma total (Gráfico 8A) e p-eNOS (Gráfico 8B), nem na razão entre elas ($p\text{-eNOS}^{\text{Ser117}}/e\text{NOS total}$) (Gráfico 8C). Da mesma forma, a enzima ERK na sua forma fosforilada ($p\text{-ERK}^{\text{Thr 202/Tyr 204}}$) (Gráfico 9A) e total (ERK total) (Gráfico 9B), e razão entre elas (Gráfico 9C) não sofreram alteração quando incubadas com ASE. A expressão da enzima Akt em sua forma fosforilada ($p\text{-Akt}^{\text{Ser473}}$) (Gráfico 10A) e total (Gráfico 10B) também foi avaliada, bem como a razão entre elas. Não houve diferença significativa em nenhuma das condições estudadas (Gráfico 10C). A expressão da enzima JNK em seu estado fosforilado ($p\text{-JNK}^{\text{Thr183/Tyr185}}$) também não diferiu após a incubação com ASE (Gráfico 11A).

Gráfico 8 – Expressão plaquetária da enzima (A) eNOS total, (B) p-eNOS^{Ser1177}, (C) p-eNOS^{Ser1177}/eNOS total. (D) Imagens ilustrativas das expressões enzimáticas por western blotting e gel Stain Free™ (n=6)



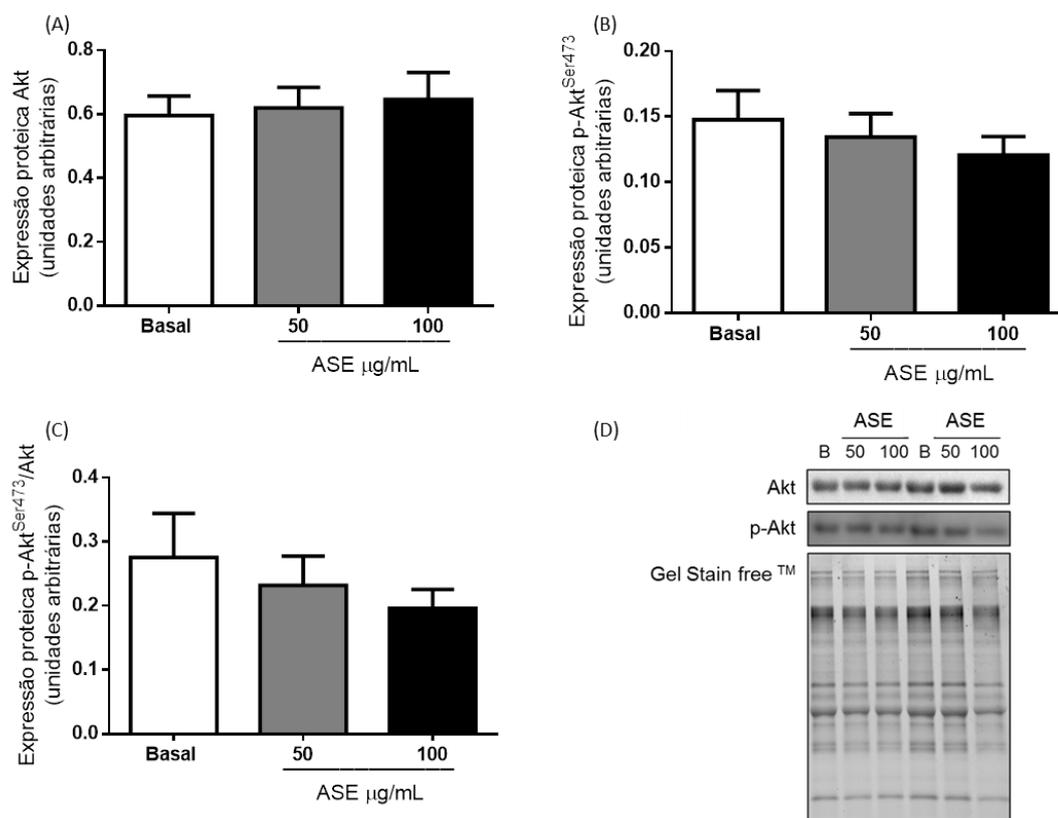
Fonte: A autora, 2018.

Gráfico 9 – Expressão plaquetária da enzima (A) ERK total, (B) p-ERK^{Thr 202/Tyr 204}, (C) p-ERK^{Thr 202/Tyr 204}/ERK total. (D) Imagens ilustrativas das expressões enzimáticas por western blotting e gel Stain FreeTM (n=6)



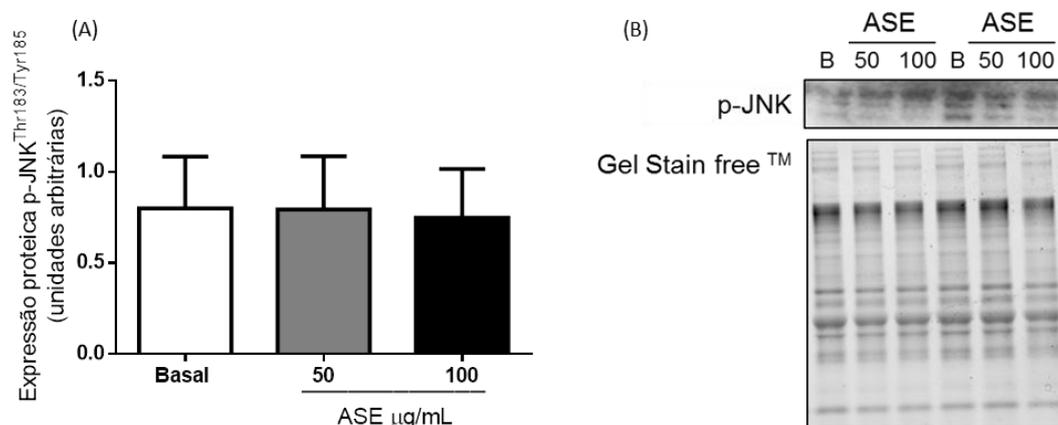
Fonte: A autora, 2018.

Gráfico 10 – Expressão plaquetária da enzima (A) Akt total, (B) p-Akt^{Ser473}, (C) p-Akt^{Ser1177}/Akt total. (D) Imagens ilustrativas das expressões enzimáticas por western blotting e gel Stain FreeTM (n=6)



Fonte: A autora, 2018.

Gráfico 11 – Expressão plaquetária da enzima (A) p-JNK^{Thr183/Tyr185}. (B) Imagens ilustrativas das expressões enzimáticas por western blotting e gel Stain FreeTM (n=6)



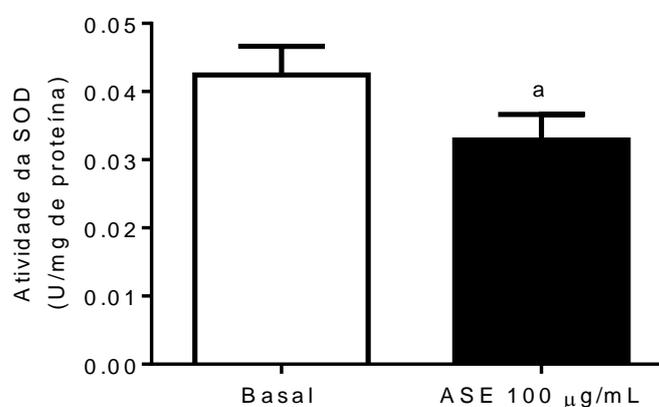
Fonte: A autora, 2018.

4.8 Ensaio antioxidantes

4.8.1 Mensuração da atividade da superóxido dismutase

Plaquetas pré-incubadas com ASE (100 µg/mL) apresentaram uma menor atividade da enzima SOD (Gráfico 12).

Gráfico 12 - Atividade da enzima SOD em plaquetas (n=12)



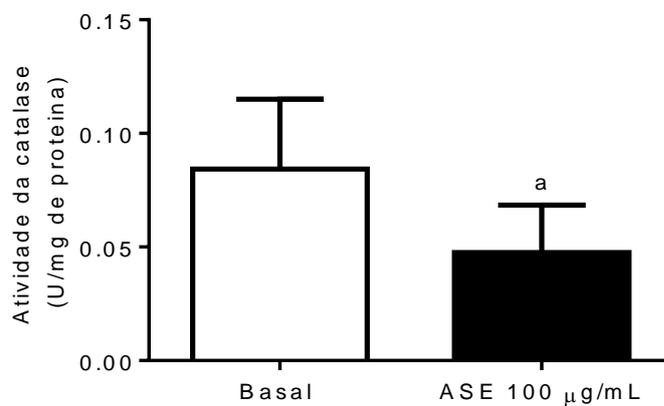
Legenda: ^a Diferente do grupo basal ($p \leq 0,05$).

Fonte: A autora, 2018.

4.8.2 Mensuração da atividade da enzima catalase

Foi possível observar uma diminuição na atividade da enzima catalase quando as plaquetas foram previamente incubadas com ASE (100 µg/mL).

Gráfico 13 - Atividade da enzima catalase em plaquetas (n=12)



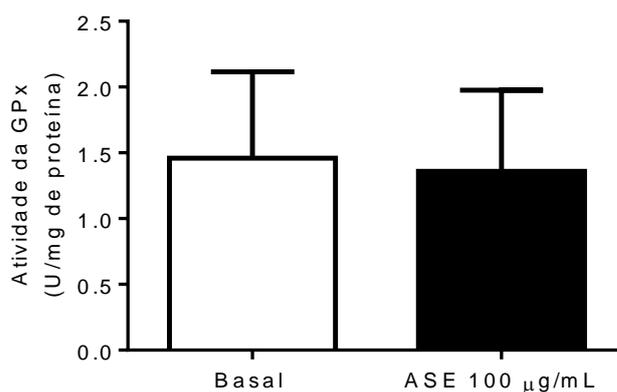
Legenda: ^a Diferente do grupo basal ($p \leq 0,05$).

Fonte: A autora, 2018.

4.8.3 Mensuração da atividade da enzima glutathiona peroxidase

A atividade da enzima GPx não foi alterada na presença de ASE (100 µg/mL) (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Atividade da enzima GPx em plaquetas (n=12)



Fonte: A autora, 2018.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou, pela primeira vez, a ação do ASE em plaquetas de indivíduos saudáveis, visando contribuir para uma melhor compreensão sobre o papel cardioprotetor dos flavonoides presentes no açaí. Os principais resultados desta tese demonstraram que o ASE promoveu inibição da agregação plaquetária, com aumento dos nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc.

A agregação plaquetária em PRP, induzida pelos agonistas colágeno, trombina e ADP, foi inibida pelas concentrações de 50 e 100 µg/mL de ASE, mas apenas a maior concentração reduziu a agregação em sangue total (estimulada por colágeno). Ao estudar o sangue total, o efeito do ASE não é exclusivo sobre as plaquetas, uma vez que o mesmo é composto pelos demais elementos figurados do sangue além do plasma. Assim, concentrações maiores de ASE podem ser necessárias para inibir a agregação plaquetária em sangue total. Há evidências de efeitos de flavonoides sobre eritrócitos (BREINHOLT *et al.*, 1999) e cultura de monócitos e macrófagos (MATHEUS *et al.*, 2006), o que poderia resultar em uma menor fração de compostos polifenólicos disponíveis para atuar sobre as plaquetas. Em cultura de monócitos e macrófagos, um extrato composto por diferentes partes do açaizeiro inibiu a produção de NO, estimado pela concentração de nitrito e pela expressão da iNOS (MATHEUS *et al.*, 2006). As plaquetas, como mencionado na revisão de literatura, podem sofrer ação do NO produzido por células adjacentes. Como exemplo, um estudo realizado pelo nosso grupo demonstrou que o NO produzido pelos neutrófilos é capaz de inibir a agregação plaquetária (ABRANTES *et al.*, 2015). Assim, esse efeito inibitório sobre a produção de NO por monócitos pode atenuar a inibição da agregação plaquetária pelo ASE em sangue total. Já foi descrita a ação de diferentes flavonoides sobre os eritrócitos, sendo mais um possível avo de ação do ASE (BREINHOLT *et al.*, 1999).

Como uma das principais vias inibitórias em plaquetas é representada pela via NO/GMPc/PKG e um estudo prévio evidenciou a participação do NO na ação vasodilatadora do ASE (ROCHA *et al.*, 2007), foram mensurados a atividade e a expressão da enzima NOS, os níveis intraplaquetários de GMPc e a agregação plaquetária na presença do inibidor L-NMMA. A síntese do NO ocorre a partir do aminoácido L-arginina pela ação enzima NOS, havendo concomitante produção

equimolar de L-citrulina (MONCADA; HIGGS, 1993). Como o NO é um gás de meia vida curta (MONCADA *et al.*, 1988) e, portanto, de difícil mensuração, sua quantificação foi feita de maneira indireta através da produção L-citrulina. O ASE não alterou a produção de L-citrulina plaquetária em nenhuma das concentrações testadas. Logo não houve diferença na produção de NO. Também não foi observada alteração na fosforilação da enzima eNOS, sugerindo que a mesma não foi ativada pelo ASE. Similarmente, da Costa *et al.* (2017) evidenciaram que a expressão da eNOS permaneceu inalterada em ratos saudáveis que receberam tratamento crônico com ASE. No entanto, o ASE restaurou a expressão desta enzima nos animais hipertensos. Dessa forma, é possível que o ASE apenas estimule a atividade da NOS quando a mesma se encontra prejudicada.

Na agregação plaquetária, a presença do análogo da L-arginina, o L-NMMA, inibidor tanto do transporte de L-arginina quanto da atividade da enzima NOS (DE MEIRELLES *et al.*, 2007; MATSUURA *et al.*, 2012) , foi capaz de eliminar apenas parcialmente os efeitos inibitórios do ASE sobre a agregação plaquetária. Observamos uma variação no padrão de resposta ao L-NMMA com os diferentes agonista utilizados e condição de análise (sangue total/PRP), o que indica o envolvimento de outras vias nas ações do ASE sobre as plaquetas.

Embora a produção de NO tenha permanecido inalterada, os níveis intraplaquetários de GMPc apresentaram-se aumentados quando da incubação com ASE nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Possivelmente, o ASE aumenta a biodisponibilidade do NO, ao reduzir as concentrações intracelulares de $O_2^{\bullet-}$. Já foi demonstrado que os flavonoides possuem a capacidade de inibir a síntese de $O_2^{\bullet-}$ e/ou inativá-lo (atuando como antioxidante não enzimático) (FERGUSON, 2001). Dessa forma, uma menor concentração $O_2^{\bullet-}$ estaria disponível para reagir com NO e formar ONOO⁻, permitindo uma maior ativação da enzima GC. Assim, o ASE não estaria estimulando o aumento da produção de NO e sim impedindo que ele seja degradado, o que justificaria a diminuição da agregação plaquetária na presença de ASE mesmo com a produção de NO em concentrações iguais à condição basal.

Até onde temos conhecimento nenhum outro estudo com açai mensurou os níveis intraplaquetários de GMPc. Porém, estudos dosaram os níveis de GMPc em células endoteliais estimuladas com diferentes flavonoides como procianidina C1, glabidina, quercetina, catequina e observaram um elevação em seus valores, indicando que o efeito vasodilatador mediado por esses compostos está associado à

via NO/GMPc (BENITO *et al.*, 2002; BYUN *et al.*, 2014; CHANDA *et al.*, 2016), assim como demonstrado com o açai (ROCHA *et al.*, 2007).

Um importante inibidor plaquetário produzido pelo endotélio, além do NO, é a PGI₂ (RADOMSKI *et al.*, 1987). O ASE também ocasionou aumento dos níveis de AMPc nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Efeito semelhante foi encontrado com o fitoestrógeno 8-prenilnaringenina, composto rico em polifenóis, que foi capaz de aumentar os níveis intraplaquetários de AMPc e GMPc (DI VITO *et al.*, 2012). A elevação dos níveis de nucleotídeos cíclicos pode ser resultante da inibição da sua degradação pelas fosfodiesterases (PDE) e/ou do aumento da sua síntese. As plaquetas humanas apresentam três isoformas distintas de PDE: PDE2, PDE3 e PDE5, sendo as PDE3 e PDE5 as principais isoformas que hidrolisam AMPc e GMPc, respectivamente (ITO *et al.*, 1996; WILSON *et al.*, 2008). Previamente, foi evidenciada ação inibitória da catequina, um dos flavonoides mais abundantes no ASE, sobre PDE 3 e 5 em homogenato de pulmão bovino (RUCKSTUHL *et al.*, 1979).

As ações inibitórias do ASE sobre as plaquetas podem ser resultantes de suas propriedades antioxidantes, via inibição da síntese de ERO e/ou inativação das mesmas direta ou indiretamente, através da estimulação da atividade de enzimas antioxidantes. De acordo com Ferguson *et al.* (2001), provavelmente, a principal atividade antioxidante atribuída aos polifenóis é a sua habilidade de neutralizar diretamente as ERO (FERGUSON, 2001). No presente estudo, foi demonstrado que o ASE induziu a redução da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT. Resultados semelhantes foram encontrados em ratos que receberam por gavagem, durante 14 dias consecutivos, seis tipos de flavonoides. A crisina, quercetina e genisteína foram capazes de reduzir a atividade das enzimas catalase, GPx e glutathione redutase em hemácias. Já a enzima SOD foi inibida apenas pela genisteína. Ao final de seu estudo, o autor sugere que a redução na atividade enzimática tenha ocorrido devido a uma melhora no estado antioxidante desses animais, pois a capacidade inibitória do flavonoide foi diretamente proporcional à sua atividade antioxidante (BREINHOLT *et al.*, 1999). Da mesma forma, o ASE pode ter melhorado o estado antioxidante das plaquetas, reduzindo a quantidade de O₂^{•-}, o que vai de encontro com nossos resultados em relação aos níveis de NO e GMPc. Por outro lado, em modelo de hipertensão 2 rins- 1 clipe em Wistars, o tratamento com ASE promoveu aumento da atividade destas mesmas enzimas em homogenato

de leito arterial mesentérico, em relação aos animais não tratados com ASE (DA COSTA *et al.*, 2012). Similarmente, o ASE restaurou a atividade hepática das enzimas antioxidantes SOD e CAT em modelo animal submetido à dieta hiperlipídica (C57BL/6) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015), bem como em homogenato de rim obtido através de modelo animal de diabetes e de hipertensão espontânea (DA SILVA CRISTINO CORDEIRO *et al.*, 2018). Cabe ressaltar que o aumento da atividade das enzimas antioxidantes foi observado em estudos onde já havia um contexto de dano oxidativo estabelecido, verificado pela quantificação de malondialdeído e carbonilação de proteínas (DA COSTA *et al.*, 2012; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). Portanto, os flavonoides presentes nessa planta foram capazes de reverter esse problema aumentando a atividade das enzimas antioxidantes.

Além de ativar vias inibitórias da plaqueta, o ASE pode exercer seus efeitos através do bloqueio de vias envolvidas na estimulação destes fragmentos celulares. A fosforilação das quinases Akt, JNK e ERK em plaquetas, que regulam muitas vias de sinalização ativadas pelos receptores de colágeno e trombina (p.ex.: a secreção de grânulos da plaqueta) (SONG *et al.*, 2014), foi avaliada em estudos com outras fontes de flavonoides, mas não com ASE. Em humanos, os flavonoides encontrados em frutas cítricas tangeritina e nobiletina inibiram a agregação, a mobilização de cálcio intracelular e a secreção de grânulos, com aumento dos níveis de GMPc, aumento da fosforilação da VASP e inibição da fosforilação da Akt (VAIYAPURI *et al.*, 2013; VAIYAPURI *et al.*, 2015). O fitoestrogênio 8-prenilnaringenina também inibiu a fosforilação da Akt, bem como da ERK em plaquetas humanas (DI VITO *et al.*, 2012). Já a fosforilação da JNK, foi inibida em macrófagos peritoneais de ratos e macrófagos RAW 264.7 pela velutina, única flavona presente na polpa do açaí (XIE *et al.*, 2012). Entretanto, no presente estudo, a fosforilação da Akt, ERK e JNK não foi alterada pelo ASE. As divergências entre esses resultados podem ser atribuídas aos diferentes tipos de flavonoides e células testados.

Outra importante via de atuação dos flavonoides é a via do AA (CORVAZIER; MACLOUF, 1985) ao diminuir a produção de TxA₂, por inibir a COX-1 (LANDOLFI *et al.*, 1984) e a PLA₂ (NANDA *et al.*, 2007), e/ou atuando como antagonistas do receptor de TxA₂ (GUERRERO *et al.*, 2005). *In vitro*, foi demonstrada que o extrato da polpa e da casca do açaí inibe tanto a COX-1 quanto a COX-2, com maior capacidade inibitória sobre a COX-1 (SHAUSS *et al.*, 2006). Portanto, é possível que

essa seja mais uma via de atuação do ASE necessitando ser estudada em plaquetas, a fim de compreender melhor os mecanismos de ação desse composto.

CONCLUSÃO

Neste trabalho verificamos que o ASE apresenta uma ação inibitória sobre a agregação plaquetária, bem como promoveu aumento dos níveis de AMPc e GMPc. Portanto, estes achados demonstram que o ASE possui propriedades farmacológicas úteis para um possível uso terapêutico no tratamento de doenças cardiovasculares. No entanto, para tal, um melhor entendimento dos mecanismos de ação do ASE sobre as plaquetas ainda se faz necessário.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, D.C. *et al.* Diminished nitric oxide generation from neutrophils suppresses platelet activation in chronic renal failure. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 401, n. 1-2, p. 147-153, 2015.
- ADAM, F. *et al.* Platelet JNK1 is involved in secretion and thrombus formation. *Blood*, v. n. blood-2009-2007-233932, 2010.
- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, n. 121-126, 1984.
- ALQURASHI, R.M. *et al.* Consumption of a flavonoid-rich açai meal is associated with acute improvements in vascular function and a reduction in total oxidative status in healthy overweight men, 2. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 104, n. 5, p. 1227-1235, 2016.
- ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C. Platelet physiology and thrombosis. *Thrombosis Research*, v. 114, n. 5-6, p. 447-453, 2004.
- BALDISSARELLI, J. *et al.* Hypothyroidism enhanced ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in rat synaptosomes can be prevented by the naturally occurring polyphenol quercetin. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 37, n. 1, p. 53-63, 2017.
- BALLATORI, N. *et al.* Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological Chemistry*, v. 390, n. 3, p. 191-214, 2009.
- BEM, G.F. *et al.* Protective effect of Euterpe oleracea Mart (acai) extract on programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during pregnancy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 66, n. 9, p. 1328-1338, 2014.
- BENITO, S. *et al.* A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *British Journal of Pharmacology*, v. 135, n. 4, p. 910-916, 2002.
- BORS, W. *et al.* Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, v. 186, n. 343-355, 1990.
- BREINHOLT, V. *et al.* Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica*, v. 29, n. 12, p. 1227-1240, 1999.
- BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 26, n. 1-2, p. 3-31, 2005.
- BRUNTON, L.L. *et al.* *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*. 12.ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2012.

- BUTT, E. *et al.* cAMP-and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 20, p. 14509-14517, 1994.
- BYUN, E.-B. *et al.* Procyanidin C1 causes vasorelaxation through activation of the endothelial NO/cGMP pathway in thoracic aortic rings. *Journal of Medicinal Food*, v. 17, n. 7, p. 742-748, 2014.
- CHANDA, D. *et al.* Glabridin-induced vasorelaxation: Evidence for a role of BKCa channels and cyclic GMP. *Life Sciences*, v. 165, n. 26-34, 2016.
- CHOI, J.-H. *et al.* Kaempferol inhibits thrombosis and platelet activation. *Biochimie*, v. 115, n. 177-186, 2015.
- CORVAZIER, E.; MACLOUF, J. Interference of some flavonoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs with oxidative metabolism of arachidonic acid by human platelets and neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, v. 835, n. 2, p. 315-321, 1985.
- COUGHLIN, S.R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, v. 407, n. 6801, p. 258, 2000.
- DA COSTA, C.A. *et al.* Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 385, n. 12, p. 1199-1209, 2012.
- DA SILVA CRISTINO CORDEIRO, V. *et al.* Euterpe oleracea Mart. seed extract protects against renal injury in diabetic and spontaneously hypertensive rats: role of inflammation and oxidative stress. *European Journal of Nutrition*, v. 57, n. 2, p. 817-832, 2018.
- DE MEIRELLES, L.R. *et al.* Inhibitory effects of endogenous L-arginine analogues on nitric oxide synthesis in platelets: Role in platelet hyperaggregability in hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 34, n. 12, p. 1267-1271, 2007.
- DE MOURA, R.S. *et al.* Effects of Euterpe oleracea Mart.(AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine*, v. 19, n. 3-4, p. 262-269, 2012.
- DE MOURA, R.S.; RESENDE, Â.C. Cardiovascular and metabolic effects of açaí, an Amazon plant. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 68, n. 1, p. 19-26, 2016.
- DE OLIVEIRA, P.R.B. *et al.* Effects of an extract obtained from fruits of Euterpe oleracea Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 56, n. 6, p. 619-626, 2010.

DE OLIVEIRA, P.R.B. *et al.* Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols protect mice from diet-induced obesity and fatty liver by regulating hepatic lipogenesis and cholesterol excretion. *PLoS One*, v. 10, n. 12, p. e0143721, 2015.

DE SOUZA, M.O. *et al.* The hypocholesterolemic activity of acai (Euterpe oleracea Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. *Nutrition Research*, v. 32, n. 12, p. 976-984, 2012.

DEL POZO-INSFRAN, D. *et al.* Phytochemical composition and pigment stability of Açai (Euterpe oleracea Mart.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 6, p. 1539-1545, 2004.

DI VITO, C. *et al.* The phytoestrogen 8-prenylnaringenin inhibits agonist-dependent activation of human platelets. *Biochim Biophys Acta*, v. 1820, n. 11, p. 1724-1733, 2012.

DIXON, R.A.; HARRISON, M.J. (1990). Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Advances in Genetics*, Elsevier. 28: 165-234.

EL MORSY, E.M. *et al.* Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by açai extract preconditioning in a rat model. *Life Sciences*, v. 123, n. 35-42, 2015.

FARIA E SOUZA, B.S. *et al.* Effect of Euterpe oleracea Mart.(Açai) Oil on Dyslipidemia Caused by Cocos nucifera L. Saturated Fat in Wistar Rats. *Journal of Medicinal Food*, v. 20, n. 9, p. 830-837, 2017a.

FARIA E SOUZA, B.S.F. *et al.* Effect of the treatment with Euterpe oleracea Mart. oil in rats with Triton-induced dyslipidemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 90, n. 542-547, 2017b.

FEIO, C.A. *et al.* Euterpe oleracea (Acai) modifies sterol metabolism and attenuates experimentally-induced atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, v. 19, n. 3, p. 237-245, 2012.

FELDMANN, K.A. Cytochrome P450s as genes for crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 4, n. 2, p. 162-167, 2001.

FERGUSON, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 475, n. 1, p. 89-111, 2001.

FERREIRA, A.L.; MATSUBARA, L.S. [Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERRONI, P. *et al.* Platelet function in health and disease: from molecular mechanisms, redox considerations to novel therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 17, n. 10, p. 1447-1485, 2012.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FLEVARIS, P. *et al.* Two distinct roles of mitogen-activated protein kinases in platelets and a novel Rac1-MAPK-dependent integrin outside-in retractile signaling pathway. *Blood*, v. 113, n. 4, p. 893-901, 2009.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, v. 105, n. 114, 1984.

FRANKEL, E. *et al.* Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet*, v. 341, n. 8843, p. 454-457, 1993.

FREEDMAN, J.E. *et al.* Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circulation Research*, v. 84, n. 12, p. 1416-1421, 1999.

GACHET, C. The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 108, n. 2, p. 180-192, 2005.

GAMBARYAN, S. *et al.* Thrombin and collagen induce a feedback inhibitory signaling pathway in platelets involving dissociation of the catalytic subunit of protein kinase a from an NFκB-IκB complex. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 24, p. 18352-18363, 2010.

GARCIA, A. *et al.* Src family kinase-mediated and Erk-mediated thromboxane A2 generation are essential for VWF/GPIIb-induced fibrinogen receptor activation in human platelets. *Blood*, v. 106, n. 10, p. 3410-3414, 2005.

GRESELE, P. *et al.* *Platelets in hematologic and cardiovascular disorders: a clinical handbook*. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

GROSSO, G. *et al.* Dietary flavonoid and lignan intake and mortality in prospective cohort studies: Systematic review and dose-response meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, v. 185, n. 12, p. 1304-1316, 2017.

GUERRERO, J. *et al.* Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 3, n. 2, p. 369-376, 2005.

GUO, Y. *et al.* Effects of total flavone of *Abelmoschli Manihot L.* Medic on the function of platelets and its mechanism. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, v. 11, n. 1, p. 57-59, 2005.

GUYTON, A.C. *et al.* *Tratado de fisiologia médica*. Rio de Janeiro: Elsevier 2006.

HAO, H.-Z. *et al.* Antiplatelet activity of loureirin A by attenuating Akt phosphorylation: In vitro studies. *European Journal of Pharmacology*, v. 746, n. 63-69, 2015.

HODEK, P. *et al.* Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-biological Interactions*, v. 139, n. 1, p. 1-21, 2002.

HORSTRUP, K. *et al.* Phosphorylation of Focal Adhesion Vasodilator- Stimulated Phosphoprotein at Ser157 in Intact Human Platelets Correlates with Fibrinogen Receptor Inhibition. *The FEBS Journal*, v. 225, n. 1, p. 21-27, 1994.

IGNARRO, L.J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 53, n. 4 Pt 1, p. 503-514, 2002.

ITALIANO JR, J.E. (2008). The structure and production of blood platelets. Platelets in Hematologic and Cardiovascular Disorders P. Gresele; V. Fuster; J. A. Lopez *et al.* Cambridge. 1: 1-21.

ITO, M. *et al.* Characterization of the isoenzymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase in human platelets and the effects of E4021. *Cell Signaling*, v. 8, n. 8, p. 575-581, 1996.

JAGROOP, I. *et al.* Platelets and vascular risk: an option for treatment. *Current Pharmaceutical Design*, v. 13, n. 16, p. 1669, 2007.

KAHN, M.L. *et al.* Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 103, n. 6, p. 879-887, 1999.

KIM, Y.; JE, Y. Flavonoid intake and mortality from cardiovascular disease and all causes: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Clinical Nutrition* v. 20, n. 68-77, 2017.

KOPANI, M. *et al.* Oxidative stress and electron spin resonance. *Clinica Chimica Acta*, v. 364, n. 1-2, p. 61-66, 2006.

KRÖTZ, F. *et al.* NAD (P) H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood*, v. 100, n. 3, p. 917-924, 2002.

LANDOLFI, R. *et al.* Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids: structure-activity relations. *Biochemical Pharmacology*, v. 33, n. 9, p. 1525-1530, 1984.

LEITE, N.R.P. *et al.* Platelet hyperaggregability in obesity: is there a role for nitric oxide impairment and oxidative stress? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 43, n. 8, p. 738-744, 2016.

LÉON, C. *et al.* The P2Y1 receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. *FEBS Letters*, v. 403, n. 1, p. 26-30, 1997.

LI, Z. *et al.* Signaling during platelet adhesion and activation. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, v. 30, n. 12, p. 2341-2349, 2010.

LI, Z. *et al.* A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Cell*, v. 112, n. 1, p. 77-86, 2003.

LICHTENTHÄLER, R. *et al.* Total oxidant scavenging capacities of Euterpe oleracea Mart.(Acai) fruits. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 56, n. 1, p. 53-64, 2005.

LIU, G. *et al.* Antiplatelet activity of chrysin via inhibiting platelet α IIb β 3-mediated signaling pathway. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 60, n. 9, p. 1984-1993, 2016.

LIU, X.-M. *et al.* Dietary total flavonoids intake and risk of mortality from all causes and cardiovascular disease in the general population: A systematic review and meta- analysis of cohort studies. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 61, n. 6, p. 1601003, 2017.

LUZAK, B. *et al.* Xanthohumol from hop cones (*Humulus lupulus* L.) prevents ADP-induced platelet reactivity. *Archives of Physiology and Biochemistry*, v. 123, n. 1, p. 54-60, 2017.

MAHESWARAIAH, A. *et al.* Anti-Platelet Activity of Water Dispersible Curcuminoids in Rat Platelets. *Phytotherapy Research*, v. 29, n. 3, p. 450-458, 2015.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *The FEBS Journal*, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MASSBERG, S. *et al.* Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood*, v. 103, n. 1, p. 136-142, 2004.

MATHEUS, M.E. *et al.* Inhibitory effects of Euterpe oleracea Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, n. 2, p. 291-296, 2006.

MATSUURA, C. *et al.* Nitric oxide activity in platelets of dengue haemorrhagic fever patients: the apparent paradoxical role of ADMA and I-NMMA. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 106, n. 3, p. 174-179, 2012.

MICHELSON, A.D. How platelets work: platelet function and dysfunction. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v. 16, n. 1, p. 7-12, 2003.

MIDDLETON, E. *et al.* The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England Journal of Medicine*, v. 329, n. 27, p. 2002-2012, 1993.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*, v. 147 Suppl 1, n. S193-201, 2006.

MONCADA, S. *et al.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MONCADA, S. *et al.* The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension*, v. 12, n. 4, p. 365-372, 1988.

MOSS, M.B. *et al.* Platelet aggregation in arterial hypertension: is there a nitric oxide-urea connection? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 37, n. 2, p. 167-172, 2010.

MULLER, G.; MORAWIETZ, H. Nitric oxide, NAD(P)H oxidase, and atherosclerosis. *Antioxidant and Redox Signaling*, v. 11, n. 7, p. 1711-1731, 2009.

NANDA, B. *et al.* PLA2 mediated arachidonate free radicals: PLA2 inhibition and neutralization of free radicals by anti-oxidants-a new role as anti-inflammatory molecule. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 7, n. 8, p. 765-777, 2007.

NASCIMENTO, W.M.O. Açaí: *Euterpe oleracea* Mart. Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia, EMBRAPA. n.18, 2008.

OLAS, B. *et al.* Hippophae rhamnoides L. fruits reduce the oxidative stress in human blood platelets and plasma. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, n. 2016.

OLAS, B. *et al.* Evaluation of polyphenolic fraction isolated from aerial parts of Tribulus pterocarpus on biological properties of blood platelets in vitro. *Platelets*, v. 24, n. 2, p. 156-161, 2013.

OLAS, B.; WACHOWICZ, B. Role of reactive nitrogen species in blood platelet functions. *Platelets*, v. 18, n. 8, p. 555-565, 2007.

OMS, O.M.D.S. *Doenças cardiovasculares*. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=839>. Acesso em: 21/05/2018.

PARISE, L.V. *et al.* (2001). Platelet morphology, biochemistry and function. Williams Hematology. M. A. Lichtman; E. Beutler; T. J. Kippset al. Pensilvânia, McGraw-Hill Professional: 1597-1645.

PIETRAFORTE, D. *et al.* Redox control of platelet functions in physiology and pathophysiology. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 21, n. 1, p. 177-193, 2014.

PIETTA, P.-G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PIGNATELLI, P. *et al.* Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. *The FASEB Journal*, v. 20, n. 8, p. 1082-1089, 2006.

PIGNATELLI, P. *et al.* The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 72, n. 5, p. 1150-1155, 2000.

PIGNATELLI, P. *et al.* Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood*, v. 91, n. 2, p. 484-490, 1998.

PIGNATELLI, P. *et al.* gp91phox-dependent expression of platelet CD40 ligand. *Circulation*, v. 110, n. 10, p. 1326-1329, 2004.

RADOMSKI, M.W. *et al.* The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*, v. 92, n. 3, p. 639-646, 1987.

RAJENDRAN, S.; CHIRKOV, Y.Y. Platelet hyperaggregability: impaired responsiveness to nitric oxide ("platelet NO resistance") as a therapeutic target. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, v. 22, n. 3, p. 193-203, 2008.

RIBEIRO, S.M.R. *et al.* The formation and the effects of the reactive oxygen species in biological media. *Bioscience Journal*, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RIVERA, D.G. *et al.* Anti-allergic properties of *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and contribution of its glucosylxanthone mangiferin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 58, n. 3, p. 385-392, 2006.

ROCHA, A. *et al.* Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart.(Acai) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascular Pharmacology*, v. 46, n. 2, p. 97-104, 2007.

ROCHA, A. *et al.* Antihypertensive effects and antioxidant action of a hydro-alcoholic extract obtained from fruits of *Euterpe oleracea* Mart.(Acai). *Journal of Pharmacology and Toxicology*, v. 3, n. 6, p. 435-448, 2008.

RODRIGUES, R.B. *et al.* Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart.(açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 12, p. 4162-4167, 2006.

ROLF, M.G. *et al.* Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with alpha,beta-methylene ATP. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 85, n. 2, p. 303-308, 2001.

ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, v. 22, n. 1, p. 19-34, 2002.

ROWLEY, J.W. *et al.* Platelet mRNA: the meaning behind the message. *Current opinion in hematology*, v. 19, n. 5, p. 385-391, 2012.

RUCKSTUHL, M. *et al.* Flavonoids are selective cyclic GMP phosphodiesterase inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, v. 28, n. 4, p. 535-538, 1979.

SAKLATVALA, J. *et al.* Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 12, p. 6586-6589, 1996.

SANTHAKUMAR, A.B. *et al.* A review of the mechanisms and effectiveness of dietary polyphenols in reducing oxidative stress and thrombotic risk. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, v. 27, n. 1, p. 1-21, 2014.

SCHAUSS, A.G. *et al.* Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 22, p. 8598-8603, 2006.

SEDDON, M. *et al.* Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart*, v. 93, n. 8, p. 903-907, 2007.

SEMPLE, J.W. *et al.* Platelets and the immune continuum. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 4, p. 264, 2011.

SMOLENSKI, A. *et al.* Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 32, p. 20029-20035, 1998.

SONG, F. *et al.* Plant food anthocyanins inhibit platelet granule secretion in hypercholesterolaemia: Involving the signalling pathway of PI3K-Akt. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 112, n. 5, p. 981-991, 2014.

STOCLET, J.-C. *et al.* Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*, v. 500, n. 1, p. 299-313, 2004.

SZENT-GYÖRGYI, A. Recent studies of vitamin C. *JAMA*, v. 10, n. 6, p. 450-451, 1933.

TZENG, S.-H. *et al.* Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thrombosis Research*, v. 64, n. 1, p. 91-100, 1991.

UDANI, J.K. *et al.* Effects of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: a pilot study. *Nutrition Journal*, v. 10, n. 1, p. 45, 2011.

VAIYAPURI, S. *et al.* Tangeretin regulates platelet function through inhibition of phosphoinositide 3-kinase and cyclic nucleotide signaling. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, v. 33, n. 12, p. 2740-2749, 2013.

VAIYAPURI, S. *et al.* Pharmacological actions of nobiletin in the modulation of platelet function. *British Journal of Pharmacology*, v. 172, n. 16, p. 4133-4145, 2015.

WANG, S.B. *et al.* Kaempferol suppresses collagen-induced platelet activation by inhibiting NADPH oxidase and protecting SHP-2 from oxidative inactivation. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 83, n. 41-53, 2015.

WEI, P.F. *et al.* The investigation of glutathione peroxidase, lactoferrin, myeloperoxidase and interleukin-1beta in gingival crevicular fluid: implications for oxidative stress in human periodontal diseases. *Journal of Periodontal Research*, v. 39, n. 5, p. 287-293, 2004.

WICKI, A. *et al.* Isolation and characterization of human blood platelet mRNA and construction of a cDNA library in lambda gt11. Confirmation of the platelet derivation by identification of GPIb coding mRNA and cloning of a GPIb coding cDNA insert. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 61, n. 3, p. 448-453, 1989.

WILSON, L.S. *et al.* Compartmentation and compartment-specific regulation of PDE5 by protein kinase G allows selective cGMP-mediated regulation of platelet functions. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 105, n. 36, p. 13650-13655, 2008.

XIE, C. *et al.* The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 23, n. 9, p. 1184-1191, 2012.

YIP, J. *et al.* Primary platelet adhesion receptors. *IUBMB Life*, v. 57, n. 2, p. 103-108, 2005.

ZAPATA-SUDO, G. *et al.* Oral treatment with *Euterpe oleracea* Mart.(acai) extract improves cardiac dysfunction and exercise intolerance in rats subjected to myocardial infarction. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 14, n. 1, p. 227, 2014.

APÊNDICE – Ficha para coleta de dados e anamnese

PROTOCOLO DO LABORATÓRIO DE TRANSPORTE DE MEMBRANA

DADOS PESSOAIS

Nome _____ Prontuário: _____
 Data de Nascimento ____/____/____ Idade: _____ Sexo _____
 Estado Civil _____ Profissão _____
 Endereço _____
 Cidade _____ Estado _____ Telefone _____

ANAMNESE

Está em tratamento médico atualmente? () Sim () Não

Atividade física? () Sim () Não Tempo: _____

Está fazendo uso de alguma medicação (antiinflamatório, antibiótico)?

() Sim () Não _____

Já foi operado? () Sim () Não -Qual(is)? _____

Fez transfusão sanguínea recentemente? _____

Sofre de alguma das seguintes doenças ?

Febre Reumática: Sim () Não ()

Problemas Cardíacos (Cardiopatia isquêmica, ICC, HAS, prótese cardíaca):

Sim () Não () _____

Problemas Hepáticos: Sim () Não () _____

Problemas Renais (IRC): Sim () Não () _____

Problemas Gástricos: Sim () Não () _____

Problemas Respiratórios: Sim () Não () _____

Problemas Alérgicos: Sim () Não () _____

Problemas Articulares ou Reumatismo: Sim () Não () _____

Problema Sanguíneos: Sim () Não () _____

Diabetes: Sim () Não () _____

Tabagismo (atual/ passado- tempo, nº de cigarros/dia): Sim () Não () _____

Peso: _____ Kg **Altura:** _____ m **IMC:** _____ kg/m²

Pressão Arterial: _____ mmHg

ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Identificação do projeto de pesquisa

Título do projeto: Efeitos da *Euterpe oleracea* Mart. sobre a via L-arginina-NO-GMPc em plaquetas e sobre o estresse oxidativo.

Pesquisadores participantes: Prof^a. Cristiane Matsuura e Prof^a. Mariana Siqueira de Medeiros e Wanda Vianna Mury (aluna de doutorado).

Instituição onde será realizado: Laboratório de Transporte de Membrana, Departamento de Farmacologia e Psicobiologia, UERJ.

O senhor está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima identificado. O texto abaixo contém todas as informações sobre o mesmo.

Natureza da pesquisa. O estudo tem como finalidade verificar os efeitos do extrato do caroço do açaí sobre as plaquetas (“células” do sangue).

Envolvimento na pesquisa. A sua participação no estudo envolverá um encontro com os pesquisadores para realização das atividades descritas a seguir. O senhor tem liberdade de se recusar a participar ou de retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade ou prejuízo. Sempre que quiser, poderá pedir informações adicionais sobre a pesquisa diretamente à pesquisadora ou ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Protocolo experimental. Os procedimentos que realizaremos irão ocorrer em apenas um dia, de acordo com a sua disponibilidade.

Será realizada uma coleta de sangue após 12 h de jejum para exames de sangue de rotina e para ser utilizado nos experimentos que serão realizados no laboratório Transporte de Membrana. Em seguida será feita a medida de seu peso e de sua altura. Duração aproximada: 30 minutos.

Riscos e desconfortos. No local de retirada do sangue, o paciente poderá sentir um desconforto ao introduzir a agulha. Além disso, pode haver a formação de um leve hematoma (marca roxa) na região. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12 de dezembro de 2012.

Confidencialidade. Todas as informações coletadas neste estudo serão confidenciais; porém, poderão ser utilizadas para fins educacionais e/ou de pesquisa sem que seu nome seja identificado.

Informações adicionais. Todos os procedimentos são inteiramente gratuitos e não exigirão vínculo da sua participação até o término da pesquisa, não prevendo também qualquer tipo de remuneração ou recompensa pela sua participação no estudo. O paciente não precisará consumir o açaí, uma vez que só será usado nas plaquetas obtidas após a coleta de sangue.

Declaro que li ou que alguém leu para mim todas as informações contidas neste termo de consentimento livre e esclarecido. As informações presentes neste documento foram explicadas para mim e tive a oportunidade de esclarecer minhas dúvidas. Minha assinatura ou impressão digital abaixo indica que concordo em participar do projeto descrito neste documento. Escrevi pessoalmente meu nome em letra de forma, além de assinar e datar as duas vias deste termo de consentimento, ou uma testemunha escreveu meu nome e dataram as duas vias deste termo de consentimento para que depois eu fornecesse minha impressão digital. Eu guardarei uma delas e o médico do estudo guardará a outra nos seus arquivos.

_____	_____	____/____/____
Nome do Participante (em letra de forma)	Assinatura do Participante	Data

De acordo com meus conhecimentos, declaro que ofereci explicações completas e detalhadas do estudo ao participante que assinou este termo de consentimento; ele, por sua vez, teve a oportunidade de esclarecer suas dúvidas referentes ao conteúdo deste termo de consentimento e à participação neste estudo de pesquisa.

_____	_____	____/____/____
Nome do Pesquisador (em letra de forma)	Assinatura do Pesquisador	Data

Pesquisadora responsável: Prof^a. Cristiane Matsuura

Endereço: Blvd. 28 de setembro, 87, fundos, 5^o andar, sala 1, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 20551-030

Telefone: (21) 2868-8021

E-mail: crismatsuura@yahoo.com.br

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto

Endereço: Blvd. 28 de setembro, 77, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ - Cep 20551-030

Telefone: (21) 2868-8253; Fax: (21) 2264-0853

E-mail: cep-hupe@uerj.br

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos da Euterpe oleracea Mart. sobre a via L-arginina-NO-GMPc e estresse oxidativo em plaquetas

Pesquisador: Cristiane Matsuura

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 69677817.0.0000.5259

Instituição Proponente: Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.284.247

Apresentação do Projeto:

Continuação do Parecer: 2.229.879

Objetivo da Pesquisa:

Continuação do Parecer: 2.229.879

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Continuação do Parecer: 2.229.879

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Continuação do Parecer: 2.229.879

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram atendidas as considerações do Parecer anterior. Foram avaliadas as informações contidas na Plataforma Brasil e as mesmas se encontram dentro das normas vigentes e sem riscos eminentes aos participantes envolvidos de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto pode ser realizado da forma como está apresentado. Diante do exposto e à luz da

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

E-mail: cep.hupe.interno@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.284.247

Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente, o CEP recomenda ao Pesquisador: Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido, para análise das mudanças; Informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa; O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que encaminhe relatórios parciais de andamento a cada 06 (seis) Meses da pesquisa e ao término, encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto; Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_867154.pdf	29/08/2017 11:26:15		Aceito
Outros	Carta_Coordenador.pdf	29/08/2017 11:25:26	Cristiane Matsuura	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto2.pdf	29/08/2017 11:25:00	Cristiane Matsuura	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.pdf	29/08/2017 11:24:46	Cristiane Matsuura	Aceito
Outros	Declaracao_de_Ciencia.pdf	04/05/2017 10:47:55	Cristiane Matsuura	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	20/03/2017 15:28:46	Cristiane Matsuura	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	15/02/2017 12:36:13	Cristiane Matsuura	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

E-mail: cep.hupe.interno@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.284.247

RIO DE JANEIRO, 19 de Setembro de 2017

Assinado por:
DENIZAR VIANNA ARAÚJO
(Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

E-mail: cep.hupe.interno@gmail.com