

# BOLETIM

**Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação**  
**Bulletin of the Portuguese Society of Hemorheology and Microcirculation**

**Editor Principal/Editor-in-Chief:** Carlota Saldanha **Editor Associado/Associated Editor:** Henrique Luz Rodrigues **Conselho Editorial Internacional/International Editorial Board:** PORTUGAL: José Pereira Albino, J. M. Braz Nogueira, Victor Oliveira, Luís Mendes Pedro, Fausto J. Pinto, João Martins e Silva | OUTROS PAÍSES: Oguz K. Baskurt (Turquia), Jean-Frederic Brun (França), Greet Schmid-Schoenbein (EUA), Nadia Antonova (Bulgária), Yukihide Isogai (Japão). **Coordenador Editorial:** João Martins e Silva.

**Vol. 26 n.º 4 Outubro, Novembro, Dezembro 2011**

## Sumário / Summary

### NOTA DE ABERTURA/EDITORIAL

- Monóxido de Azoto é um Parâmetro Hemorreológico? 3
- *Is nitric oxide a hemorheologic parameter?*  
*Carlota Saldanha*

### ARTIGO DE REVISÃO/REVIEW ARTICLE

- Estatinas e hemorreologia. Parte 1 – efeitos na coagulação e fibrinólise 5  
*Filipe Vieira, Flávio Reis*

### ACTUALIZAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS/ARCHIVES

- Ghrelin protects musculocutaneous tissue from ischemic necrosis by improving microvascular perfusion. 22

### NOTÍCIAS/NEWS AND INFORMATIONS

- Prémio NOBEL da MEDICINA /2011 23
- Participação nacional em reuniões científicas e congressos internacionais 24
- Eleições da SPHM (biénio 2012-2014) 27

**Política Editorial:** O “Boletim da Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação” fica a deter o direito de propriedade sobre todo o material publicado e difundido (artigos ou vídeos), após concordância expressa, por escrito, dos respectivos autores. O material eventualmente recusado não será devolvido.

**Publication Policy of Material Presented:** The “Boletim da Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação” has the copyright ownership of all published and diffused material (articles or videos) conveyed, upon expressed and signed agreement of their Authors. The material eventually rejected will not be returned.

# Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação

**Presidente Honorário:** Prof. Doutor João Alcindo Martins e Silva

## ÓRGÃOS SOCIAIS DA SPHM / BOARDS (2009-2011)

Direção / Executive Committee	Assembleia Geral / General Assembly	Conselho Fiscal / Finance and Audit Committee
<i>Presidente</i> Prof. <sup>a</sup> Doutora Maria Carlota Saldanha Lopes	<i>Presidente</i> Prof. Doutor José Manuel Braz Nogueira	<i>Presidente</i> Prof. Doutor João Eurico Fonseca
<i>Vice-Presidentes</i> Prof. Doutor Henrique Luz Rodrigues Dr. José António Pereira Albino	<i>1.º Secretário</i> Prof. Doutor Luís Mendes Pedro	<i>1.º Vogal</i> Dr. <sup>a</sup> Maria Helena Baptista Manso Ribeiro
<i>Secretário-Geral</i> Dr. Flávio Nelson Fernandes Reis	<i>2.º Secretário</i> Dr. Miguel Frederico Leal Galvão	<i>2.º Vogal</i> Dr. Carlos Manuel dos Santos Moreira
<i>Tesoureiro</i> Prof. Doutor Henrique Sobral do Rosário	<i>1.º Secretário Suplente</i> Dr. <sup>a</sup> Ana Santos Silva Herdade	<b>Comissão de Delegados / Committee of Delegates</b> <i>Delegado da Região Norte</i> – Dr. Manuel Campos <i>Delegado da Região Centro</i> – Dr. João Morais <i>Delegado da Região Sul e Regiões Autónomas</i> – Dr. Mário Marques
<i>Secretários-Adjuntos</i> Prof. Doutor José Luis Ducla Soares Dr. Jorge Lima Dr. Luís Sargento	<i>2.º Secretário Suplente</i> Dr. Paulo Ferreira da Silva	

## MEMBROS CONSULTIVOS, HONORÁRIOS E CORRESPONDENTES / / CONSULTIVE, HONORARY AND CORRESPONDENT MEMBERSHIP

Conselho Científico / / Scientific Council	Sócios Honorários / / Honorary Members	Sócios Correspondentes / / Correspondent Member
A. Diniz da Gama Axel Pries Fernando Lacerda Nobre Helena Saldanha Oliveira J. Esperança Pina J. Luís Providência J. Martins e Silva J. Fernandes e Fernandes J. Rafael Ferreira João Morais José Ferro Manuel Carrageta Mário Andreia Ricardo Seabra Gomes	A. M. Ehrly (Alemanha) Carlos Ribeiro (Portugal) H. J. Meiselman (EUA) Helmut Drexler (Alemanha) J. F. Stoltz (França) J. E. Tooke (G. Bretanha) John A. Dormandy (G. Bretanha) Joaquim Silva Carvalho (Portugal) J. M. G. Toscano Rico (Portugal) L. Teixeira Diniz (Portugal) M. Boisseau (França) Políbio Serra e Silva (Portugal) Sandro Forconi (Itália) Y. Isogai (Japão)	Adrian J. Barnes (G. Bretanha) Alon Harris (USA) D. Seiffge (Alemanha) G. Caimi (Itália) G. D. O. Lowe (G. Bretanha) I. Juhan-Vague (França) I. Salama Benarroch (Argentina) J. Delaunay (França) J. F. Brun (França) Ricardo Manrique (Brasil) Shi Yong-de (China) T. Shiga (Japão) Thao Chan (França)

## FILIAÇÃO INTERNACIONAL EUROPEAN SOCIETY FOR CLINICAL HEMORHEOLOGY EUROPEAN SOCIETY FOR MICROCIRCULATION

**Referência da capa:** Vénula pós-capilar (diâmetro aproximado: 30 mm) de rede microvascular em mesentério de rato (*Rattus norvegicus*), observada por microscopia intravital de transluminação. No interior do vaso sanguíneo visualizam-se leucócitos a interagir com a parede vascular. Imagem obtida por Henrique Sobral do Rosário (Instituto de Biopatologia Química – Prof.a Doutora Carlota Saldanha, Faculdade de Medicina de Lisboa; Unidade de Biopatologia Vascular, Instituto de Medicina Molecular)

Esta publicação é subsidiada em 2011 por:

**FCI: Fundação para a Ciência e Tecnologia** (Ministério da Educação e Ciência – Portugal)

Ao abrigo do: **Apoio do Programa Operacional Ciência, Tecnologia, Inovação do Quadro Comunitário de Apoio III**

**O Boletim (ISSN 0872-4938)** é publicado trimestralmente pela Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação. Isenta de registo no ICS nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 12.º do Decreto Regulamentar n.º 8/99, de 9 de Junho. **Depósito Legal** 30 525/89. **Tiragem** 100 exemplares **Distribuição** sócios, sociedades científicas afins, entidades oficiais e privadas de âmbito médico e áreas de educação da ciência. Todos os direitos estão reservados. **Preço de cada número avulso:** 5 € a que acresce 2,5 € para portes de correio. **Editor, Proprietário, Administração e Secretariado:** Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação, a/c Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina de Lisboa. **Endereço do Secretariado:** Apartado 4098, 1501-001 Lisboa, Portugal. **Telefone** 217 985 136; **Fax:** 219 999 477 **Execução Gráfica:** Publicações Ciência e Vida, Lda. Apartado 44 – 2676-901 Odivelas. **Telef.:** 21 478 78 50; **Fax:** 21 478 78 59. **E-mail:** pub@cienciaevida.pt

## É O MONÓXIDO DE AZOTO UM PARÂMETRO HEMORREOLÓGICO?

Para fim deste ano de 2011, vamos pensar numa pergunta inquietante nomeadamente sobre a função do monóxido de azoto (NO) como um parâmetro hemorreológico.

Vou deixar a nomenclatura de lado pois, recentemente, Jorge Calado, numa alocução na Fundação Calouste Gulbenkian, chamou-lhe óxido de nitrogénio, enquanto outros também o apelidam de óxido nítrico; mas será que ao monóxido de carbono lhe atribuem roupagem semelhante?

Voltando à nossa questão do NO poder ser considerado um parâmetro hemorreológico, ou não?

De entre os consagrados factores hemorreológicos temos interligações, por exemplo, entre a agregação e a deformabilidade eritrocitárias e entre qualquer uma delas e a viscosidade sanguínea. Salientamos ainda a influência da viscosidade plasmática, do hematócrito e do fibrinogénio na agregação eritrocitária. E o que sabemos nós da acção do NO sobre qualquer um dos consagrados parâmetros hemorreológicos?.

Começando por uma abordagem de situações clínicas, por exemplo, nos doentes com sepsis, o aumento em circulação de moléculas derivadas e dadores de NO como os nitrosídeos diminuem a deformabilidade eritrocitária. Em doentes com disfunção endotelial como a hipertensão, hipercolesterolemia e disfunção eréctil, apresentam diminuta deformabi-

lidade eritrocitária mas com capacidade de libertarem NO quando estimulados com acetilcolina. Compostos dadores de NO, como a espezmina NONOate, induzem diminuição da deformabilidade eritrocitária. A acetilcolina é um estimulante do efluxo de NO dos eritrocitos e da deformabilidade, contrariando a inibição da proteína cinase C. Recordo que a acetilcolina existe em circulação sanguínea, produzida linfócitos e das células endoteliais e, em situações de resposta inflamatória, aumenta de concentração.

Compostos endógenos como o fibrinogénio, que intervém no aumento da agregação eritrocitária, bloqueia a libertação de NO dos eritrocitos. No entanto, em elevadas concentrações e na presença de acetilcolina, aumenta a deformabilidade sem desbloquear a libertação de NO do eritrocito. O stress oxidativo gerador de anião superóxido pode combinar-se com o NO e formar peroxinitritos lesivos para a membrana celular, com repercussão na deformabilidade eritrocitária.

Na longa lista dos factores influentes na deformabilidade eritrocitária podemos incluir o NO, que é uma charneira entre o vaso sanguíneo e os elementos figurados do sangue. Assim como as proteínas do citoesqueleto e as integrais como a proteína band 3, cujo grau de associação em dímeros ou em tetrâmeros influencia

a deformabilidade eritrocitária, também a concentração de moléculas derivadas de NO no interior do eritrócito, e o próprio influxo e ou efluxo, são determinantes da deformabilidade do glóbulo vermelho.

Afinal, consideramos o NO um parâmetro hemorreológico ou um factor influente

nos parâmetros hemorreológicos? Por analogia com o que se passa na função vascular,

podemos considerar a segunda opção como a que mais se enquadra no pensamento tradicional, mas a porta está aberta.

Também a SPHM está aberta para novo acto eleitoral, a decorrer no dia 12 de Dezembro, que se repete após 11 meses, para ajuste de calendário dos órgãos de acordo com os estatutos.

Desejo bom trabalho e boas contribuições para a SPHM cujo site nunca é de mais recordar [www.hemorreologia.com](http://www.hemorreologia.com). Desta vez não coloco de propósito referências, é o presente que vos deixo com os votos de um excelente 2012.

*Carlota Saldanha*  
Presidente da SPHM

## ESTATINAS E HEMORREOLOGIA

### PARTE 1 – EFEITOS NA COAGULAÇÃO E FIBRINÓLISE

Filipe Vieira, Flávio Reis<sup>1</sup>

#### RESUMO

Os inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase, ou estatinas, são potentes inibidores da síntese do colesterol, sendo uma das principais categorias de fármacos

hipolipemiantes. Estudos clínicos sugerem que os benefícios das estatinas podem não ser apenas devidos às suas propriedades antilipidémicas, mas também aos seus efeitos pleiotrópicos, em grande medida resultantes da inibição da síntese de isoprenóides, com consequente influência nas vias de sinalização posteriores. Entre outras propriedades, as estatinas apresentam efeitos benéficos sobre os parâmetros hemorreológicos, podendo ser um contributo adicional para a prevenção de episódios do foro cardio e cerebrovascular. O presente artigo pretende rever os efeitos das estatinas na coagulação e fibrinólise, focando alguns dos factores mais pertinentes e os estudos mais significativos. A diminuição da for-

mação de trombina, e da expressão de factores chave na coagulação, incluindo do factor tecidual (FT) são maioritariamente atribuídas ao efeito das estatinas na inibição da isoprenilação das proteínas sinalizadoras. Ainda não é certo até que ponto é que estas propriedades das estatinas, algumas delas resultantes de estudos *in vitro* e/ou em modelos animais, contribuem para a redução da mortalidade ou morbidade cardio e cerebrovascular. Para além disso, ainda não está esclarecido se todas as estatinas têm o mesmo mecanismo ou propriedades anticoagulantes. Estudos clínicos futuros podem ajudar a entender o impacto das estatinas nas reacções da cascata de coagulação, e também sobre os principais marcadores da fibrinólise, e estabelecer o papel destes fármacos na prevenção e tratamento de trombose arterial em vasos ateroscleróticos e, possivelmente, na trombose venosa.

**Palavras-chave:** estatinas, efeitos pleiotrópicos, coagulação, fibrinólise.

<sup>1</sup> Morada para envio correspondência: Flávio Reis, PhD Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, IBILI, Sub-Unit 1 (Polo III), Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra  
3000-548 Coimbra, Portugal  
Tel: +351 239480053; Fax: +351 239480065; E-mail: freis@fmed.uc.pt

## INTRODUÇÃO

As estatinas são fármacos inibidores da enzima 3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductase, que assim inibem a biossíntese do colesterol, sendo a sua principal aplicação terapêutica as hipercolesterolemias (Bhindi et al., 2008) e, por isso, são usadas na prevenção primária e secundária da doença arterial coronária (DAC). A sua importância clínica também advém da sua segurança relativa comparada com a de outros agentes hipolipemiantes e o seu efeito benéfico na mortalidade e morbidade, particularmente na área de doença cardiovascular (DCV) (LaRosa et al., 1999; Zhou et al., 2010).

Uma vez que os níveis de colesterol plasmático estão fortemente relacionados com a doença coronária, assumiu-se que os efeitos benéficos da terapêutica com estatinas estavam relacionados totalmente com a redução do colesterol. Contudo, sabe-se hoje que existem efeitos independentes do colesterol ou pleiotrópicos (Zhou et al., 2009). As estatinas reduzem os eventos cardiovasculares não só em pacientes hipercolesterolemicos mas também normocolesterolemicos com DAC ou risco cardiovascular aumentado (Wang et al., 2008). Com efeito, vários ensaios têm mostrado uma redução significativa do risco de todas as manifestações clínicas do processo aterosclerótico. Para além disso, resultados a longo prazo de ensaios clínicos mostraram também diminuir significativamente a incidência e mortalidade total na DAC, bem como no enfarte do miocárdio (EM), em procedimentos de revascularização, no acidente

vascular cerebral (AVC) e na doença vascular periférica. Estes efeitos benéficos das estatinas são independentes do género e são mais evidentes em pacientes de meia-idade e idosos (também os mais afectas por hipercolesterolemias), tanto em prevenção primária como secundária. Mais ainda, devido à sua fácil e cómoda administração, as estatinas mostraram uma alta taxa de *compliance* pelos pacientes (Bhindi et al., 2008). Em comparação com alguns dos outros fármacos hipocolesterolémicos, as estatinas têm um bom perfil de segurança, estando bem descritos os seus principais efeitos secundários, que incluem principalmente a rabdomiólise, miopatia, e possibilidade de toxicidade hepática e renal em determinados circunstâncias (Pasternak et al., 2002).

As estatinas produzem o seu efeito anti-colesterolémico ao inibir competitivamente a HMG-CoA reductase, inibindo assim a conversão de HMG-CoA em ácido L-mevalónico. Este mecanismo limita a taxa de biossíntese do colesterol, ao prevenir o acesso do substrato para os locais activos da enzima (Istvan et al., 2001). Em consequência deste mecanismo, ocorre diminuição da síntese hepática do colesterol, aumento da regulação dos receptores LDL e aumento da *clearance* plasmática do colesterol LDL. Para além disso, ao inibir a HMG-CoA reductase, as estatinas podem também inibir a síntese de importantes isoprenóides intermediários, como o farnesilpirofosfato (FPP) e o geranylgeranylpirofosfato (GGPP), que provêm do ácido L-mevalónico (Goldstein et al., 1990). O GGPP e o FPP servem de importantes ligações lipídicas para a modificação pós-

-translacional de proteínas intracelulares, como Ras, Rho e Rac (Van Aelst et al., 1997). Assim, para além da diminuição do colesterol também a inibição destas proteínas intracelulares dependentes de isoprenóides pode contribuir para alguns dos efeitos biológicos das estatinas (Figura 1).

O benefício das estatinas na aterosclerose estende-se para lá da sua capacidade hipolipemiante, estando descritos aspectos como a estabilização de placas ateroscleróticas e a redução da inflamação vascular, trombogenicidade e disfunção endotelial (Ito et al., 2006). Numerosos estudos têm demonstrado que os distúrbios da coagulação e fibrinólise contribuem para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose. As estatinas parecem apresentar efeitos benéficos sobre os parâmetros hemostáticos, principalmente aqueles que são factores de risco para a DCV (Krysiak et al., 2003).

### ESTATINAS, MONÓXIDO DE AZOTO E PLAQUETAS

As estatinas inibem a actividade da oxidase do NADPH mediada pelo Rac1 (uma isoforma da superfamília de GTPases), e assim reduzem a produção de ROS induzido pela angiotensina II e a hipertrofia no músculo liso vascular e cardíaco (Takemoto et al., 2001; Wassmann et al., 2001). A activação do Rac1 na parede vascular tem sido associada a aterosclerose, proliferação neointimal, hipertrofia cardíaca e disfunção endotelial. O Rac1 tem múltiplos papéis em diversos processos celulares e na fisiologia cardiovascular. Assim, a inibição do Rac1 pode também contribuir para

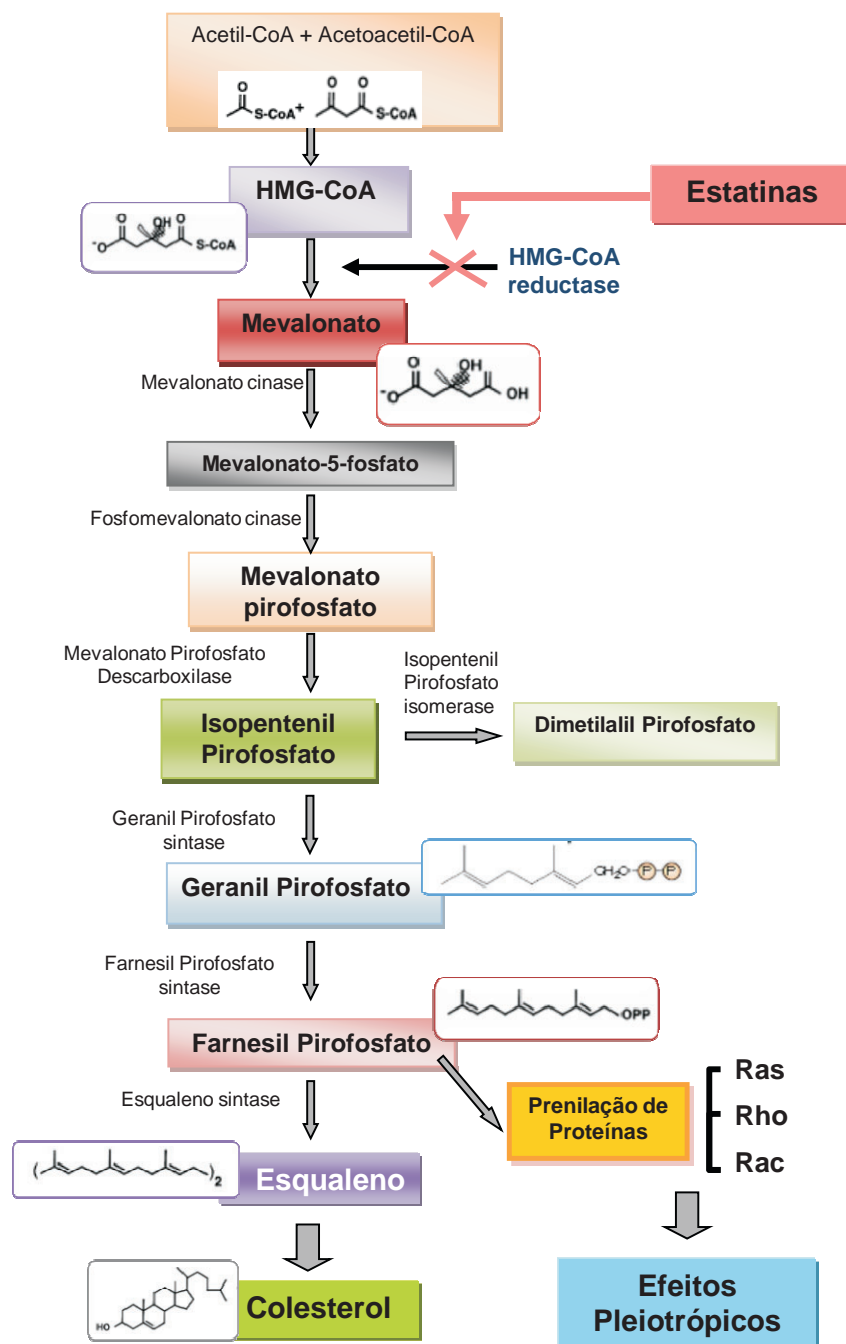


Fig. 1 – Via do mevalonato e síntese de colesterol e isoprenóides. As estatinas inibem a actividade da HMG-CoA reductase e reduzem a isoprenilação de moléculas sinalizadoras intracelulares, como Ras, Rho e Rac, propriedades que estão associadas aos seus efeitos pleiotrópicos. Adaptado de Zhou et al. (2010).

alguns efeitos pleiotrópicos das estatinas (Wang et al., 2008).

O monóxido de azoto (NO) é um vasodilatador fisiológico sintetizado pelas sintetases do NO (NOS), e as suas principais funções biológicas

são: a inibição da agregação plaquetário, da adesão de leucócitos, da trombogénese, da proliferação de células musculares lisas e a supressão do stresse oxidativo (Miida et al., 2004). A função endotelial está normalmente prejudicada em pacientes com hipercolesterolemia ou aterosclerose (Egashira et al., 1993). Esta disfunção endotelial está associada a uma diminuição da síntese ou actividade do NO derivado do endotélio (Pritchard et al., 1995). As estatinas melhoram a disfunção endotelial ao aumentar a produção de NO. Em pacientes hipercolesterolemicos, o tratamento com estatinas atenua a vasoconstrição mediada por acetilcolina (um vasodilatador dependente do endotélio) e aumenta o fluxo sanguíneo plasmático (Egashira et al., 1993). Estes efeitos favoráveis foram observados no período das 24h de tratamento e na ausência de redução significativa do colesterol (Wassmann et al., 2003).

O mecanismo subjacente a este efeito protector das estatinas consiste no aumento da biodisponibilidade de NO, resultando no aumento da vasodilatação e facilitando o fluxo sanguíneo miocárdico regional em condições de hipóxia (Laufs et al., 1997). Para além disso, a produção de NO induzida por estatinas inibe o aumento da regulação de moléculas de adesão envolvidas em interacções de leucócitos-células endoteliais (Zhou et al., 2010). Finalmente, estatinas podem também preservar o potencial da membrana mitocondrial em resposta ao stresse oxidativo em monócitos de uma forma dependente do NO (Jones et al., 2003).

As plaquetas circulantes estão associadas à formação de trombos mu-

rais no local da rotura das placas e lesão vascular. Este mecanismo é fundamental na origem de síndromes coronárias agudas (Zhou et al., 2010). A hipercolesterolemia tem sido associada com aumentos na reactividade plaquetário. As estatinas podem diminuir a reactividade plaquetário, através da redução dos níveis de colesterol plasmático (Zhou et al., 2010). No entanto, estudos recentes sugerem que alguns dos efeitos podem não ser dependentes do colesterol (Glynn et al., 2009). Um dos mecanismos propostos consiste no aumento da regulação mediada pelas estatinas da eNOS nas plaquetas, o que leva a diminuição da sua activação (Laufs et al., 2000). Para além disso, inibem a expressão do factor tecidual (FT) por macrófagos e, assim, reduzem o potencial trombótico da parede vascular (Aikawa et al., 2001). Foi ainda sugerido que os receptores activadores de peroxissomas proliferativos (PPARs) também podem mediar algumas das acções anti-plaquetárias das estatinas (Ali et al., 2009).

A análise de alguns estudos sugere uma relação entre o aumento do risco de AVC não hemorrágico com o aumento da concentração de colesterol. No entanto, esta relação não é tão forte como aquela entre a doença cardíaca isquémica e o colesterol (Miida et al., 2004). Apesar da correlação entre níveis elevados de colesterol e doença cerebrovascular permanecer controversa, as estatinas tornaram-se uma das terapêuticas mais importantes para a prevenção e tratamento de AVCs (Zhou et al., 2010). Muitos estudos clínicos consideraram que as estatinas reduzem o AVC em 10-30% (Miida et al.,



2004). Os efeitos benéficos das estatinas no AVC isquémico são provavelmente independente do colesterol, uma vez que estudos com outros fármacos modificadores lipídicos não tiveram sucesso na redução da incidência de AVC (Zhou et al., 2010). Este efeito é devido à redução da aterosclerose pré-cerebral e aos efeitos pleiotrópicos, como a melhoria da disfunção endotelial, estabilização da placa, inibição da agregação plaquetária e acções anti-inflamatórias (Miida et al., 2004).

## EFEITOS DAS ESTATINAS NA COAGULAÇÃO

### Efeitos no fibrinogénio

O fibrinogénio pode ser considerado como um factor de risco na doença cardiovascular (Krysiak et al., 2003). Níveis elevados de fibrinogénio representam um factor de risco para a DAC e trombose, e afectam significativamente a trombogenicidade plasmática (Undas et al., 2005). Vários estudos mostraram que em pacientes com níveis elevados de fibrinogénio o risco de DAC é superior aos pacientes que apresentam níveis de colesterol total aumentados. O risco de episódios coronários permanece baixo quando os níveis de fibrinogénio são baixos, mesmo que os níveis de colesterol sejam altos (Mede et al., 1986; Kannel et al., 1987). O fibrinogénio é também um factor de risco importante na mortalidade de pacientes com claudicação intermitente (Gensini et al., 1998).

Os efeitos das estatinas no fibrinogénio apresentam resultados contraditórios. Está descrito que as estatinas

aumentam, diminuem ou, na maioria dos estudos, não apresentam qualquer efeito, nos níveis de fibrinogénio plasmático (Undas et al., 2005). Estas discrepâncias podem dever-se ao facto de se usarem diferentes métodos laboratoriais para medir os níveis de fibrinogénio, como métodos imunonefelométricos ou métodos imunoturbidimétricos (Krysiak et al., 2003). Estes métodos podem apresentar resultados errados quando os níveis de triglicédeos estão aumentados (Song et al., 2001). O “*Clauss method*” parece ser o melhor para medir os níveis de fibrinogénio no plasma; no entanto, níveis elevados de produtos de degradação do fibrinogénio (PDF) podem inibir a polimerização da fibrina, reduzindo assim os níveis de fibrinogénio no plasma quando medidos por este método (Clauss et al., 1957). Há ainda outras razões que podem explicar as discrepâncias encontradas. Os níveis de fibrinogénio plasmáticos aumentam em várias doenças agudas, como EM, infecção e trauma, hipertensão arterial (HTA), diabetes mellitus (DM) e deslipidémia, e ainda nas seguintes condições: envelhecimento, hábitos tabágicos, obesidade e contraceção oral (Heinrich et al., 1995; De Maat, 2001). Pelo contrário, os níveis de fibrinogénio diminuem em vegetarianos, após o consumo moderado de álcool, exercício físico e tratamento com derivados do ácido fólico, antagonistas dos receptores beta-adrenérgicos, ticlopidina, pentoxifilina, defibrotide e algumas drogas anti-inflamatórias (Heinrich et al., 1995; De Maat, 2001). Os níveis de fibrinogénio também parecem depender do polimorfismo do seu gene na população (De Maat, 2001) e mos-

tram variação sazonal, o que pode também explicar as discrepâncias entre os diferentes estudos (Krysiak et al., 2003).

A acção pró-aterogénica complexa do fibrinogénio sugere que até pequenas alterações nos seus níveis podem contribuir para os benefícios cardiovasculares iniciais e tardios da terapêutica com estatinas. No entanto, para que mais resultados conclusivos sejam obtidos serão necessários mais estudos com períodos padronizados de observação e dosagem, numa população representativa e com um método uniforme para medir os níveis de fibrinogénio (Krysiak et al., 2003).

### Efeitos no factor tecidual

O factor tecidual (FT) é o principal iniciador fisiológico da coagulação sanguínea ao servir de co-factor ao factor VII activado (FVIIa), sem o qual é uma enzima inactiva (Morrissey, 2001). O FT é sintetizado por estimulação ou lesão de monócitos, macrófagos e células musculares lisas e endoteliais (Rosenson et al., 1998). Depois de se ligar ao FVIIa, o FT activa os factores IX e X, assim iniciando a cascata da coagulação.

Estudos com simvastatina mostraram que o efeito das estatinas no FT abrange não só macrófagos e monócitos mas também outros tipos de células, incluindo do músculo liso e do endotélio, inibindo a expressão do FT e também a sua actividade (Eto et al., 2002). Trabalhos realizados em células obtidas tanto de dadores saudáveis como de pacientes com hipercolesterolemia, nos quais foram usados vários tipos de estatinas (simvastatina, flu-

vastatina, cerivastatina e pravastatina), mostraram redução nos níveis e actividade do FT em culturas de monócitos e macrófagos humanos, estimulados ou não por factores inflamatórios (lipopolissacarídeos: LPS) e lipoproteínas aterogénicas (LDLs acetiladas) (Krysiak et al., 2003).

Vários estudos em animais foram efectuados para avaliar as alterações na expressão do FT em artérias, incluindo estudos em que foi administrada simvastatina e pravastatina em macacos *cynomolgus* em dieta aterogénica; cerivastatina em coelhos do tipo *Watanabe Heritable Hyperlipidemic* (WHHL), um modelo de hipercolesterolemia isolada; simvastatina em ratos com défice de apolipoproteína-E; fluvastatina em coelhos alimentados com colesterol. Estes trabalhos mostraram uma redução substancial na expressão do FT em lesões ateroscleróticas, em conjunto com a supressão da inflamação no ateroma, independentemente dos efeitos da redução lipídica das estatinas (Undas et al., 2005). O estudo com cerivastatina em coelhos do tipo WHHL mostrou que os efeitos da cerivastatina estão relacionados não só com a diminuição do número de macrófagos na placa aterosclerótica como também com a redução da expressão do FT nas células da membrana interna da aorta (Aikawa et al., 2001).

Em humanos foram encontradas evidências de que o FT está envolvido na acção *in vivo* das estatinas (Krysiak et al., 2003), comprovando efeitos idênticos aos observados nos trabalhos em animais (Undas et al., 2005). O estudo ATROCAP (*the Atorvastatin and Thrombogenicity of the Carotid Atherosclerotic Plaque*),

no qual foi administrada atorvastatina (a doses de 20 mg/dia durante 4-6 meses) a 59 pacientes com estenose carotídea bilateral, mostrou redução dos níveis de antigénio FT e da actividade em homogenizados de placas aterogénicas. Os resultados apresentaram uma diminuição de 29% dos níveis de antigénio FT e diminuição de 56% da actividade do FT em placas ateroscleróticas removidas por endarterectomia em comparação com resultados obtidos em pacientes sujeitos a placebo (Cortellaro et al., 2002). Outro estudo em humanos demonstrou o efeito das estatinas na redução da actividade do FT e nos níveis de antigénio do FT. A administração de 20 mg/dia de Simvastatina durante 8 semanas em 24 pacientes com hipercolestrolémia poligénica apresentou uma redução acentuada na actividade do FT e nos níveis de antigénio do FT (em 61% e 68%, respectivamente) em monócitos estimulados (Ferro et al., 1997). Um efeito semelhante na actividade do FT foi produzido com doses baixas de simvastatina (10 mg/dia) tanto em monócitos não estimulados como estimulados por LPS de 15 pacientes que tinham sido submetidos a transplante cardíaco (Holschermann et al., 2000).

Em suma, os estudos até hoje realizados sobre o efeito das estatinas no FT apontam para uma diminuição da expressão do FT em monócitos e vários tipos de células vasculares (Undas et al., 2005).

### Efeitos no factor VII

Alguns estudos clínicos mostraram que a actividade coagulante do

factor VII (FVII) no plasma é um factor de risco para DAC (Krysiak et al., 2003). Em pacientes com história de EM foi encontrada alta actividade coagulante do FVII e em doentes com DAC instável e EM uma elevada razão FVII funcionante/antigénio do FVII (Gensini et al., 1998).

Os estudos que avaliaram o efeito das estatinas no FVII revelaram diferentes resultados, mas na maioria deles as estatinas apresentavam um efeito benéfico (Krysiak et al., 2003). Em pacientes hipercolesterolémicos os níveis de antigénio e a actividade coagulante do FVII diminuíram após 12 semanas de tratamento com 10 mg/dia de atorvastatina e após 4 a 6 semanas de tratamento com 20 mg/dia do mesmo fármaco. Estas alterações não se encontravam relacionadas com os efeitos hipolipemiantes deste fármaco (Undas et al., 2005). Em pacientes com história de EM a pravastatina reduziu os níveis de FVII. Em pacientes com hiperlipoproteinemia tipo IIa, IIb e IV a atorvastatina diminuiu os níveis de antigénio e/ou actividade coagulante do FVII. A administração de simvastatina em pacientes com hiperlipoproteinemia tipo II primária, de cerivastatina em pacientes com hiperlipidemia primária mista e de simvastatina e fluvastatina em pacientes com dislipidemia diabética reduziu a actividade coagulante do FVII (Krysiak et al., 2003). Contudo, também existem dados publicados que mostram que a simvastatina, a pravastatina e a fluvastatina não têm efeito nos níveis e/ou actividade coagulante do FVII (Undas et al., 2005). Outros estudos mostraram que a simvastatina produz uma diminuição insignificante na actividade coagulante do FVII em pa-

cientes com hiperlipoproteinemia tipo IIa e em pacientes com risco aumentado de DAC; a simvastatina diminuiu também os níveis de antigénio do FVII (Bo et al., 1991; Mitropoulos et al., 1997). Como o antigénio do FVII, a actividade coagulante do FVII e a actividade do FVIIa correlacionam-se com os níveis de triglicéridos, ácidos gordos livres e colesterol, as discrepâncias entre os estudos pode resultar de diferentes critérios de inclusão e diferentes efeitos das estatinas no perfil lipídico (Krysiak et al., 2003). Neste contexto, mais estudos são necessários, usando ensaios específicos para quantificar os níveis de FVIIa no sangue circulante, para clarificar se as estatinas podem alterar a actividade do complexo iniciador TF-FVIIa não só pela expressão do FT mas também pela formação ou actividade do FVIIa (Undas et al., 2005).

### Efeitos no inibidor da via do factor tecidual

O inibidor da via do factor tecidual (TFPI) apresenta um potencial anticoagulante marcado. Este está envolvido na regulação da coagulação induzida pelo FT (Hansen et al., 1995). O TFPI é o único inibidor fisiológico do complexo TF-FVIIa que também neutraliza a actividade catalítica do factor X activado. Oitenta % do TFPI encontra-se ligado a LDL, o que sugere que as alterações induzidas por fármacos no perfil lipídico podem afectar a actividade deste inibidor (Undas et al., 2005). Como a actividade anticoagulante do TFPI está relacionada com a fracção livre de TFPI, este facto parece ter um pa-

pel importante nos efeitos anticoagulantes das estatinas (Krysiak et al., 2003). No entanto, resultados contraditórios têm sido relatados. Lovastatina, fluvastatina, simvastatina e atorvastatina mostraram diminuir a actividade do TFPI, causado pela redução nos complexos LDL-TFPI, e níveis totais de TFPI sem qualquer alteração no TFPI livre em indivíduos hiperlipidémicos (Undas et al., 2005). A inibição da HMG-CoA reductase promove a redução de antigénio do TFPI, o que estará muito provavelmente ligado à normalização dos distúrbios funcionais do endotélio, e não tanto à supressão do potencial anticoagulante do *pool* endotelial do TFPI livre (Hansen et al., 1995). A informação disponível indica que não há alterações significativas nos níveis/actividade do TFPI durante a terapêutica com estatinas (Undas et al., 2005).

### Efeitos na trombina

A trombina, uma proteína do tipo serina protease, tem como principal função converter fibrinogénio em fibrina, realizando um papel fundamental no processo de coagulação. A trombina é produzida da protrombina, que é essencialmente o estado inactivo desta proteína (Krysiak et al., 2003). Para avaliar os efeitos das estatinas na trombina, a maioria dos estudos focaram os seguintes parâmetros: fragmento da protrombina (F1+2); fibrinopeptídeo A (FPA); e complexo trombina-antitrombina III (TAT) (Krysiak et al., 2003). O F1+2 é um polipeptídeo que é clivado da protrombina quando esta é convertida em trombina. O FPA resulta da

clivagem do fibrinogénio pela trombina. O F1+2 reflecte o último passo da formação da fibrina, enquanto o FPA reflecte a actividade da trombina. A trombina livre é inactivada quando se liga ao complexo TAT, sendo os níveis deste um marcador da activação da coagulação (Dahlback, 2000).

A terapêutica com estatinas resulta na diminuição da formação de trombina. Um estudo de 16 pacientes com EM prévios e níveis de colesterol elevados tratados com pravastatina (40 mg/dia), mostrou que a correcção do aumento do potencial trombogénico pode ser importante para benefícios clínicos nos primeiros meses após um episódio coronário agudo (Undas et al., 2005). De todas as estatinas, a simvastatina e a pravastatina são as melhores estudadas em termos dos efeitos na trombina. Vários estudos mostraram que a simvastatina diminuiu os níveis de F1+2, TAT e FPA no sangue venoso de pacientes com hipercolesterolemia (Krysiak et al., 2003). Foi também documentado que a simvastatina inibiu a conversão da protrombina em trombina, o que foi acompanhado por aumento do tempo de hemorragia em pacientes com DAC e níveis de colesterol alto *borderline* que se encontravam a tomar baixas doses de aspirina (75 mg/dia) (Musial et al., 2001).

São vários os estudos que incidiram sobre a análise do efeito das estatinas na trombina. Num estudo em que foi administrada pravastatina durante 3 meses em baixas doses (10 mg/dia) em pacientes com hipercolesterolemia houve uma diminuição nos níveis dos complexos TAT e FPA (Wada et al., 1993). Noutro estudo em que este fármaco foi administrado

durante 8 semanas numa dose maior (40 mg/dia) foi observado um efeito semelhante nos níveis de F1+2 em pacientes com hipercolesterolemia (Cipollone et al., 2002). A administração de 15 mg/dia de pravastatina (mínimo durante 1 mês) inibiu a formação de trombina dependente de plaquetas, um parâmetro que se encontra aumentado em pacientes com hipercolesterolemia e hiperlipidemia mista. O efeito da pravastatina na formação de trombina resultou da melhoria da desregulação plaquetas-factores de coagulação porque a actividade e agregação das plaquetas não sofreu alterações nos pacientes, nem antes nem depois do tratamento (Aoki et al., 1997). Um tratamento de 16 semanas no qual foi administrado 20 mg/dia de pravastatina durante 8 semanas e 40 mg/dia de pravastatina durante as outras 8 semanas mostrou diminuição nos níveis de F1+2 e TAT, que estavam aumentados em pacientes com história de EM. O efeito favorável das estatinas na coagulação foi observado independentemente da gravidade das lesões ateroscleróticas nas artérias carotídeas (Di Garbo et al., 2000). O tratamento com cerivastatina, simvastatina, atorvastatina, pravastatina e fluvastatina, durante 12 semanas, produziu um efeito inibitório na formação de trombina dependente de plaquetas em pacientes com hipercolesterolemia (Puccetti et al., 1999, 2001).

Alguns estudos sugerem que nem todas as estatinas produzem o mesmo efeito na formação de trombina e que este efeito pode ser diferente entre pacientes. Três meses de tratamento com atorvastatina, simvastatina ou pravastatina revelaram uma diminuição significativa nos níveis dos mar-

cadres plasmáticos da trombina no sangue venoso periférico. No entanto, as estatinas tiveram efeitos diferentes na formação de trombina. A simvastatina, administrada a 40 mg/dia durante 3 meses, inibiu a formação de trombina e a atorvastatina, administrada a 10 mg/dia, inibiu insignificamente a formação de trombina; enquanto a pravastatina administrada a 40 mg/dia não apresentou qualquer efeito (Joukhadar et al., 2001). Deve ser referido que o papel da trombina na acção das estatinas na coagulação pode depender do sexo do paciente e tipo de estatina. Num estudo em que foi administrada simvastatina 20-40 mg/dia durante 6 meses houve inibição da formação de trombina apenas em mulheres (Dangas et al., 1999).

Foi demonstrado que o efeito das estatinas na formação de trombina resulta de dois mecanismos: da inibição da formação da trombina dependente de plaquetas e da inibição da expressão do FT. Esta afirmação baseia-se no facto de que quando o sistema de coagulação é activado *in vitro* por monócitos estimulados com LPS, o efeito da simvastatina nos níveis de F1+2 (uma diminuição proporcional à dose) correlaciona-se com o efeito inibitório do fármaco na expressão do FT (75), e também no facto de que a cerivastatina diminuiu os níveis de FT nos monócitos em que os níveis de FT estão aumentados na presença de plaquetas, o que indica uma interacção entre plaquetas e o FT na regulação da formação de trombina (Krysiak et al., 2003).

Num estudo em que foi administrada simvastatina 20 mg/dia durante 3 meses em pacientes com DAC avançada e níveis altos *borderline* de

colesterol verificou-se que o atraso e redução da activação da protrombina eram acompanhados por alterações na actividade de outros factores de coagulação cujas funções são fisiologicamente reguladas pela trombina. Estas alterações incluem: diminuição da formação de cadeias leves e pesadas de factor V activado, diminuição da activação do factor XIII e inibição da proteólise do fibrinogéneo em fibrina (níveis reduzidos de FPA e fibrinopeptídeo B (FPB)) (Undas et al., 2001). Isto suporta o conceito de que as estatinas, por influenciarem a formação de trombina e a sua actividade, afectam a homeostasia, o que pode produzir efeitos clínicos favoráveis (Krysiak et al., 2003).

Uma vez que a trombina estimula vários processos aterogénicos, incluindo a migração/proliferação celular, tráfico de leucócitos e inflamação, é possível especular que o efeito das estatinas na trombina passa não só pela redução na formação da trombina mas pode também inibir a aterosclerose por vários mecanismos indirectos, como alterações na sinalização da trombina pela proteína G ligada a receptores activados por proteases (PARs) (Undas et al., 2005).

A activação do PAR-1 (receptor 1 da trombina activado por proteases), através de várias vias de sinalização, incluindo as proteínas isopreniladas Rho, resulta não só em alterações pós-transcricionais mas também em alterações na transcrição de alguns genes (Minami et al., 2004). Por exemplo, o aumento da expressão do FT pela trombina, como documentado por vários investigadores, pode estar reduzido como resultado da diminuição, induzida pelas estatinas, na formação de trombina em adição

**Tabela I.** Efeitos das estatinas na coagulação: sumário de alguns dos principais resultados

– Diminuição da expressão do factor tecidual
– Diminuição da produção e/ou activação do factor VII
– Diminuição da produção de trombina
– Diminuição da activação do factor V
– Diminuição da clivagem do fibrinogénio
– Diminuição da activação do factor XIII
– Inexistência de alterações na síntese do fibrinogénio
– Aumento da expressão de trombomodulina
– Aumento da inactivação do factor Va
– Diminuição da produção e/ou activação do inibidor da via do factor tecidual

Adaptado de Undas et al. (2005).

à inibição da isoprenilação de sinalizadores intermediários envolvidos na função do PAR-1 (Undas et al., 2005).

Foi proposta a hipótese de que este mecanismo relacionado com o PAR-1 tem particular importância na expressão dos efeitos anti-trombóticos das estatinas. No entanto, o efeito anti-trombóticos das estatinas através da activação do PAR-1 nas plaquetas e células vasculares, bem como nas vias de sinalização e transcrição da trombina, ainda não estão totalmente estabelecidos (Undas et al., 2005).

Alguns dos efeitos das estatinas nos principais factores de coagulação descritos na literatura estão sumariados na tabela I.

## EFETOS DAS ESTATINAS NA FIBRINÓLISE

### Efeitos no tPA e PAI-1

Os marcadores mais importantes da actividade fibrinolítica são os níveis do inibidor do activador do plasminogénio 1 (PAI-1) e do activador do plasminogénio tecidual (tPA), razão pela qual têm sido usados para

avaliar o efeito das estatinas na fibrinólise (Krysiak et al., 2003). Indivíduos com actividade plasmática aumentada de PAI-1 têm maior risco para doença cardiovascular, como DAC, enfarte agudo do miocárdio (EAM), reestenose pós-angioplastia coronária e doença vascular periférica (Nordt et al., 2000). O antigénio tPA está associado a risco de EM e AVC (Ridker et al., 1993,1994).

Estudos *in vitro* revelaram que a atorvastatina, a cerivastatina, a fluvastatina, a lovastatina e a simvastatina, mas não a pravastatina, diminuíram a produção de PAI-1 em alguns tipos de células endoteliais e de músculo liso, em células humanas, mas também aumentaram a produção de tPA em células musculares lisas (Wiesbauer et al., 2002). Noutro estudo, a fluvastatina não alterou os níveis de PAI-1 no endotélio coronário (Mueck et al., 2001). Assim, parece poder ser excluído que as estatinas têm efeitos diferentes nas células endoteliais de diferentes vasos sanguíneos. As concentrações das estatinas usadas nestes estudos *in vitro* foram na maioria dos casos superiores às concentrações plasmáticas de pacientes tratados com estes fármacos. O efei-

to das estatinas nas PAI-1 e tPA parece ser clinicamente relevante, no entanto o mecanismo das alterações induzidas pelas estatinas na sua síntese ainda não é conhecido (Krysiak et al., 2003).

Ao interpretar estudos em humanos devemos ter em atenção vários factores. Os estudos clínicos acerca do papel das estatinas na regulação da fibrinólise não são tão esclarecedores como os estudos *in vitro*, havendo vários factores que podem influenciar os resultados dos estudos clínicos acerca do efeito das estatinas sobre os níveis e a actividade do PAI-1 e tPA. As diferenças entre os estudos ou o facto de que os marcadores periféricos circulantes da fibrinólise não serem bons marcadores da fibrinólise local podem ser responsáveis pelos resultados frustrantes ou contraditórios observados nos estudos clínicos (Krysiak et al., 2003).

Os efeitos das estatinas na fibrinólise podem ser alterados por vários factores como citocinas [como a interleucina-1 (IL-1) e o factor de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )], factores de crescimento [como o factor de crescimento transformador  $\beta$ 1 (TGF-1 $\beta$ )] e hormonas (nomeadamente a actividade do sistema renina-angiotensina). Para além disso, os níveis de PAI-1 também estão relacionados com os níveis de triglicédeos, LDL e glicose oxidados no plasma, resistência à insulina e obesidade (Isaacsohn et al., 1994; Juhan-Vague et al., 2000; Tsikouris et al., 2002; Seljeflot et al., 2002). A morfologia da placa aterosclerótica também pode ter impacto nos resultados clínicos. Estudos *in vitro* revelaram que os efeitos da atorvastatina na síntese do PAI-1 só foram observados nos estádios iniciais

da diferenciação monócitos/macrófagos (Lopez et al., 2001). Um estudo com pravastatina produziu efeitos semelhantes no PAI-1 e tPA, tanto em mulheres como em homens (Dangas et al., 1999). O género parece ter pouca importância apesar da associação bem documentada entre estrogénios e o sistema fibronolítico (Tsikouris et al., 2002).

Quanto ao tipo de estatinas, um estudo mostrou que a atorvastatina produziu um efeito mais forte no antigénio do tPA e na sua actividade do que a simvastatina (Seljeflot et al., 2002a; 2002b); no entanto, outros dados mostraram que a substituição de simvastatina por atorvastatina em pacientes com hipercolesterolemia primária não afectou os níveis plasmáticos de PAI-1, o que sugere que ambos os fármacos produzem efeitos semelhantes (Ito MK, 2001). Todavia, mais dados parecem ser necessários para avaliar de forma mais cabal esta questão.

A dose de estatinas administrada também parece influenciar os resultados obtidos. Foi documentado que eram necessários 40 mg/dia de pravastatina para produzir efeito na actividade do antigénio do tPA e PAI-1 (20 mg/dia não eram suficientes) (Krysiak et al., 2003). Também a duração do tratamento pode influenciar os efeitos clínicos das estatinas nos marcadores da fibronólise. Estudos *in vitro* mostraram que as estatinas afectavam a produção de tPA e PAI-1 dependendo do tempo (Krysiak et al., 2003). Em estudos clínicos que apresentavam tratamentos de curto período, o efeito das estatinas no tPA e PAI-1 foi pequeno. Por exemplo, a simvastatina administrada durante 8 semanas diminuía os níveis de anti-



génio do PAI-1 apenas quando era acompanhada por terapia hormonal de substituição concomitante (Sbarouni et al., 2000). A lovastatina administrada durante 8 semanas diminuiu insignificativamente os níveis de antigénio tPA e PAI-1 (Zambrana et al., 1997). A fluvastatina administrada durante 4 ou 8 semanas e a pravastatina administrada durante 6 semanas não afectaram o PAI-1 nem o tPA (Ambrosi et al., 2000; Lin et al., 2000; Newby et al., 2002). Em estudos clínicos que apresentavam tratamentos de longo período, o efeito das estatinas no PAI-1 e tPA eram normalmente mais pronunciadas. Seis meses de tratamento com pravastatina reduziu os níveis de antigénio de PAI-1 e de tPA em pacientes com ou sem DAC (Dangas et al., 1999; Dangas et al., 2000). Vinte semanas de tratamento com fluvastatina diminuíram significativamente os níveis de antigénio tPA em pacientes com DAC e leve/moderada hipercolesterolemia (Bevilacqua et al., 1997). Vinte e quatro semanas de tratamento com lovastatina diminuíram significativamente os níveis de antigénio PAI-1 em doentes com hipercolesterolemia, com ou sem risco de apresentar DAC (Isaacsohn et al., 1994). Um ano de tratamento com atorvastatina ou simvastatina aumentou a actividade do tPA e diminuiu insignificativamente a actividade do PAI-1 em pacientes com DAC (Seljeflot et al., 2002a; 2002b). Se esta hipótese for verdadeira, as estatinas devem ser administradas por um período mínimo de tempo para se observar todo o seu efeito na prevenção primária e secundária de eventos coronários agudos (Krysiak et al., 2003).

Há variações circadianas na actividade do sistema fibrinolítico, uma vez que tanto os níveis de tPA como de PAI-1 mostram um ritmo circadiano. Os antigenios do PAI-1 e tPA alcançam os seus picos mais altos de manhã e os seus valores mais baixos à tarde. Por outro lado, a actividade do tPA é maior pela tarde e menor de manhã. Esta relação deve ser considerada, mas não há estudos que permitam tirar conclusões definitivas (Krysiak et al., 2003).

#### **Efeitos sobre outros agentes da fibrinólise**

Existem outros marcadores fibrinolíticos, como o índice da actividade fibrinolítica (FAI), os D-dímeros, o plasminogénio ou a  $\alpha$ 2-antiplasmina, que são possíveis factores de risco cardiovasculares; no entanto, muito menos é conhecido sobre a influência das estatinas nestes parâmetros (Krysiak et al., 2003). Em pacientes hiperlipidémicos com DAC, o FAI aumentou 136% depois de 3 meses de tratamento com 10 mg/dia de atorvastatina (Atalar et al., 2002). Em pacientes em diálise peritoneal, o FAI aumentou 30,6% após tratamento com 10 mg/dia de simvastatina (Malyszko et al., 2001).

Estudos relacionados com os níveis de D-dímeros apresentaram resultados pouco esclarecedores. Após a administração de simvastatina (40 mg/dia) durante 8 semanas os níveis de D-dímeros diminuíram 26,3% (Lin et al., 2000) e após a administração de pravastatina (10 mg/dia) durante 3 semanas diminuíram 50% (Wada et al., 1993). No entanto, noutros estudos a administração de esta-

tinhas provocou um aumento de aproximadamente 46% nos níveis de D-dímeros (Seljeflot et al., 2002). Existem ainda outros estudos nos quais as estatinas não tiveram efeito nos níveis de d-dímeros (Dangas et al., 1999; Joukhadar et al., 2001).

Estudos com lovastatina, atorvastatina e simvastatina não afectaram os níveis de plasminogénio nem de  $\alpha$ 2-antiplasmina (Mayer et al., 1992; Zambrana et al., 1997; Bo et al., 2001).

Os fracos efeitos das estatinas nalguns estudos podem ser explicados pelo facto do sangue periférico não ser um bom material para avaliar a fibrinólise local. Mesmo efeitos fortes das estatinas na fibrinólise podem não ser observados quando o sangue periférico é avaliado. No entanto, até pequenos efeitos das estatinas na fibrinólise podem produzir um efeito benéfico para prevenir a progressão da DAC e o desenvolvimento de eventos cardiovasculares agudos (Krysiak et al., 2003), merecendo por isso mais investigação para um esclarecimento mais cabal da sua real influência.

## CONCLUSÕES

As estatinas apresentam vários efeitos para além da diminuição dos níveis de colesterol. Estes efeitos incluem a melhoria da função endotelial, diminuição da inflamação vascular, inibição da proliferação de músculo liso ou imunomodulação. Há dados que sugerem que a maior parte destes efeitos são consequência da inibição da síntese de isoprenóides, que vão afectar várias vias de sinalização posteriores. Contudo,

permanece por elucidar cabalmente até que extensão é que estes efeitos pleiotrópicos contribuem para os benefícios clínicos da terapêutica com estatinas.

Vários autores descobriram que as estatinas produzem um efeito favorável em alguns parâmetros da coagulação e da fibrinólise que se pensam serem factores de risco para o desenvolvimento de DCV. A diminuição da formação de trombina, de várias reacções pró-coagulantes desta e da expressão do FT são maioritariamente atribuídas ao efeito das estatinas na inibição da isoprenilação das proteínas sinalizadoras. Ainda não é certo até que ponto é que estas propriedades das estatinas encontradas *in vitro* e/ou em modelos animais contribuem para a redução da mortalidade ou morbidade cardiovascular. Para além disso, ainda não é conhecido se todas as estatinas têm o mesmo mecanismo ou propriedades anticoagulantes. Estudos clínicos futuros podem ajudar a entender o impacto das estatinas nas reacções da cascata de coagulação e estabelecer o papel destas na prevenção e tratamento de trombose arterial em vasos ateroscleróticos e, possivelmente, na trombose venosa.

As estatinas parecem influenciar a coagulação e fibrinólise, ainda que os efeitos produzidos possam ser moderados. No entanto, dado que os distúrbios hemorreológicos têm um papel importante no desenvolvimento da aterosclerose e suas complicações, mesmo uma normalização parcial destes distúrbios pode produzir benefícios clínicos significativos, merecendo por uma melhor clarificação.

## REFERÊNCIAS

1. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, Shiomi M, Schoen FJ, Libby P. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation*. 2001; 103(2):276-83.
2. Ali FY, Armstrong PC, Dhanji AR, Tucker AT, Paul-Clark MJ, Mitchell JA, Warner TD. Antiplatelet actions of statins and fibrates are mediated by PPARs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29(5):706-11.
3. Ambrosi P, Aillaud MF, Habib G, Kreitmam B, Métras D, Luccioni R, Bouvenot G, Juhan-Vague I. Fluvastatin decreases soluble thrombomodulin in cardiac transplant recipients. *Thromb Haemost*. 2000; 83(1):46-8.
4. Aoki I, Aoki N, Kawano K, Shimoyama K, Maki A, Homori M, Yanagisawa A, Yamamoto M, Kawai Y, Ishikawa K. Platelet-dependent thrombin generation in patients with hyperlipidemia. *J Am Coll Cardiol*. 1997; 30(1):91-6.
5. Bevilacqua M, Bettica P, Milani M, Vago T, Rogolino A, Righini V, Santoli E, Norbiato G. Effect of fluvastatin on lipids and fibrinolysis in coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1997; 79(1):84-7.
6. Bhindi R, Ormerod O, Newton J, Banning AP, Testa L. Interaction between statins and clopidogrel: is there anything clinically relevant? *QJM*. 2008; 101(12):915-25.
7. Bo M, Bonino F, Neirotti M, Gottero M, Pernigotti L, Molaschi M, Fabris F. Hemorheologic and coagulative pattern in hypercholesterolemic subjects treated with lipid-lowering drugs. *Angiology*. 1991; 42(2):106-13.
8. Bo M, Nicoletto MT, Fiandra U, Mercadante G, Piliago T, Fabris F. Treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia: atorvastatin vs simvastatin. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2001; 11(1):17-24.
9. Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E, Di Febbo C, Nutini M, Fazio M, Falco A, Cuccurullo F, Davì G. Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in hypercholesterolemia: effects of statin therapy. *Circulation*. 2002; 106(4):399-402.
10. Cortellaro M, Cofrancesco E, Arbustini E, Rossi F, Negri A, Tremoli E, Gabrielli L, Camera M. Atorvastatin and thrombogenicity of the carotid atherosclerotic plaque: the ATROCAP study. *Thromb Haemost*. 2002; 88(1):41-7.
11. Dahlbäck B. Blood coagulation. *Lancet*. 2000; 355(9215):1627-32.
12. Dangas G, Badimon JJ, Smith DA, Unger AH, Levine D, Shao JH, Meraj P, Fier C, Fallon JT, Ambrose JA. Pravastatin therapy in hyperlipidemia: effects on thrombus formation and the systemic hemostatic profile. *J Am Coll Cardiol*. 1999; 33(5):1294-304.
13. Dangas G, Smith DA, Badimon JJ, Unger AH, Shao JH, Meraj P, Cohen AM, Levine D, Fallon JT, Ambrose JA. Gender differences in blood thrombogenicity in hyperlipidemic patients and response to pravastatin. *Am J Cardiol*. 1999; 84(6):639-43.
14. Dangas G, Smith DA, Unger AH, Shao JH, Meraj P, Fier C, Cohen AM, Fallon JT, Badimon JJ, Ambrose JA. Pravastatin: an antithrombotic effect independent of the cholesterol-lowering effect. *Thromb Haemost*. 2000; 83(5):688-92.
15. de Maat MP. Effects of diet, drugs, and genes on plasma fibrinogen levels. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 936:509-21.
16. Di Garbo V, Bono M, Di Raimondo D, De Simone R, Raneli G, Avellone G. Non lipid, dose-dependent effects of pravastatin treatment on hemostatic system and inflammatory response. *Eur J Clin Pharmacol*. 2000; 56(4):277-84.
17. Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Yamada A, Maruoka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, Takeshita A. Impaired coronary blood flow response to acetylcholine in patients with coronary risk factors and proximal atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1993; 91(1):29-37.
18. Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Lüscher TF. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation*. 2002; 105(15):1756-9.
19. Ferro D, Basili S, Alessandri C, Mantovani B, Cordova C, Violi F. Simvastatin reduces monocyte-tissue-factor expression type IIa hypercholesterolaemia. *Lancet*. 1997; 350(9086):1222.
20. Gensini GF, Comeglio M, Colella A. Classical risk factors and emerging elements in the risk profile for coronary artery disease. *Eur Heart J*. 1998; 19 Suppl A:A53-61.
21. Glynn RJ, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Ridker PM. A randomized trial of rosuvastatin in the prevention of venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2009; 360(18):1851-61.
22. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990; 343(6257):425-30.
23. Hansen JB, Huseby KR, Huseby NE, Sandset PM, Hanssen TA, Nordøy A. Effect of cholesterol lowering on intravascular pools of TFPI and its anticoagulant potential in type II hyperlipoproteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15(7):879-85.
24. Heinrich J, Assmann G. Fibrinogen and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Risk*. 1995; 2(3):197-205.
25. Hölschermann H, Hilgendorff A, Kemkes-Matthes B, Schönburg M, Bauer EP, Tillmanns H, Haberbosch W. Simvastatin attenuates vascular hypercoagulability in cardiac transplant recipients. *Transplantation*. 2000; 69(9):1830-6.
26. Isaacsohn JL, Setaro JF, Nicholas C, Davey JA, Diotalevi LJ, Christianson DS, Liskov E, Stein EA, Black HR. Effects of lovastatin therapy on plasminogen activator inhibitor-1 antigen levels. *Am J Cardiol*. 1994; 74(7):735-7.
27. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*. 2001; 292(5519):1160-4.
28. Ito MK, Talbert RL, Tsimikas S. Statin-associated pleiotropy: possible beneficial effects beyond cholesterol reduction. *Pharmacotherapy*. 2006; 26(7 Pt 2):85S-97S.
29. Ito MK. The effects of converting from simvastatin to atorvastatin on plasminogen activator inhibitor type-1. *J Clin Pharmacol*. 2001; 41(7):779-82.

30. Jones SP, Teshima Y, Akao M, Marbán E. Simvastatin attenuates oxidant-induced mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2003; 93(8):697-9.
31. Joukhadar C, Klein N, Prinz M, Schrolnberger C, Vukovich T, Wolzt M, Schmetterer L, Dorner GT. Similar effects of atorvastatin, simvastatin and pravastatin on thrombogenic and inflammatory parameters in patients with hypercholesterolemia. *Thromb Haemost.* 2001; 85(1):47-51.
32. Juhan-Vague I, Alessi MC, Morange PE. Hypofibrinolysis and increased PAI-1 are linked to atherothrombosis via insulin resistance and obesity. *Ann Med.* 2000; 32 Suppl 1:78-84.
33. Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study. *JAMA.* 1987; 258(9):1183-6.
34. Krysiak R, Okopień B, Herman Z. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on coagulation and fibrinolysis processes. *Drugs.* 2003; 63(17):1821-54.
35. LaRosa JC, He J, Vupputuri S. Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA.* 1999;282(24):2340-6.
36. Laufs U, Fata VL, Liao JK. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1997; 272(50):31725-9.
37. Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Böhm M, Dirmagl U, Endres M. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke.* 2000; 31(10):2442-9.
38. Lin TH, Huang CH, Voon WC, Yen HW, Lai HM, Liang HY, Lu YH, Lee KT, Lee CS, Lai WT, Sheu SH. The effect of fluvastatin on fibrinolytic factors in patients with hypercholesterolemia. *Kaohsiung J Med Sci.* 2000; 16(12):600-6.
39. Lopez S, Peiretti F, Bonardo B, Deprez-Beauclair P, Laouenan H, Juhan-Vague I, Nalbone G. Effect of atorvastatin on plasminogen activator inhibitor type-I synthesis in human monocytes/macrophages. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001; 37(6):762-8.
40. Małyżko J, Małyżko JS, Hryzko T, Myśliwiec M. Effects of long-term treatment with simvastatin on some hemostatic parameters in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Am J Nephrol.* 2001; 21(5):373-7.
41. Mayer J, Eller T, Brauer P, Solleder EM, Schäfer RM, Keller F, Kochsiek K. Effects of long-term treatment with lovastatin on the clotting system and blood platelets. *Ann Hematol.* 1992; 64(4):196-201.
42. Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, Haines AP, Stirling Y, Imeson JD, Thompson SG. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet.* 1986; 2(8506):533-7.
43. Miida T, Hirayama S, Nakamura Y. Cholesterol-independent effects of statins and new therapeutic targets: ischemic stroke and dementia. *J Atheroscler Thromb.* 2004;11(5):253-64.
44. Minami T, Sugiyama A, Wu SQ, Abid R, Kodama T, Aird WC. Thrombin and phenotypic modulation of the endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(1):41-53.
45. Mitropoulos KA, Armitage JM, Collins R, Meade TW, Reeves BE, Wallendszus KR, Wilson SS, Lawson A, Peto R. Randomized placebo-controlled study of the effects of simvastatin on haemostatic variables, lipoproteins and free fatty acids. The Oxford Cholesterol Study Group. *Eur Heart J.* 1997; 18(2):235-41.
46. Morrissey JH. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost.* 2001; 86(1):66-74.
47. Mueck AO, Seeger H, Deuringer FU, Wallwiener D. Effect of an estrogen/statin combination on biochemical markers of endothelial function in human coronary artery cell cultures. *Menopause.* 2001; 8(3):216-21.
48. Musiał J, Undas A, Undas R, Brozek J, Szczeklik A. Treatment with simvastatin and low-dose aspirin depresses thrombin generation in patients with coronary heart disease and borderline-high cholesterol levels. *Thromb Haemost.* 2001; 85(2):221-5.
49. Newby DE, Witherow FN, Wright RA, Bloomfield P, Ludlam CA, Boon NA, Fox KA, Webb DJ. Hypercholesterolaemia and lipid lowering treatment do not affect the acute endogenous fibrinolytic capacity in vivo. *Heart.* 2002; 87(1):48-53.
50. Nordt TK, Bode C. Impaired endogenous fibrinolysis in diabetes mellitus: mechanisms and therapeutic approaches. *Semin Thromb Hemost.* 2000; 26(5):495-501.
51. Pasternak RC, Smith SC Jr, Bairey-Merz CN, Grundy SM, Cleeman JI, Lenfant C; American College of Cardiology; American Heart Association; National Heart, Lung and Blood Institute. ACC/AHA/NHLBI clinical advisory on the use and safety of statins. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40(3):567-72.
52. Pritchard KA Jr, Groszek L, Smalley DM, Sessa WC, Wu M, Villalon P, Wolin MS, Stemerman MB. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res.* 1995; 77(3):510-8.
53. Puccetti L, Bruni F, Bova G, Cercignani M, Palazzuoli A, Console E, Auteri A, Pasqui AL. Effect of diet and treatment with statins on platelet-dependent thrombin generation in hypercholesterolemic subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2001; 11(6):378-87.
54. Puccetti L, Bruni F, Di Renzo M, Bova G, Cercignani M, Iadanza A, Auteri A, Pasqui AL. Hypercoagulable state in hypercholesterolemic subjects assessed by platelet-dependent thrombin generation: in vitro effect of cerivastatin. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 1999; 3(5):197-204.
55. Ridker PM, Hennekens CH, Stampfer MJ, Manson JE, Vaughan DE. Prospective study of endogenous tissue plasminogen activator and risk of stroke. *Lancet.* 1994; 343(8903):940-3.
56. Ridker PM, Vaughan DE, Stampfer MJ, Manson JE, Hennekens CH. Endogenous tissue-type plasminogen activator and risk of myocardial infarction. *Lancet.* 1993; 341(8854):1165-8.
57. Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. *JAMA.* 1998; 279(20):1643-50.

58. Sbarouni E, Melissari E, Kyriakides ZS, Kremastinos DT. Effects of simvastatin or hormone replacement therapy, or both, on fibrinogen, factor VII, and plasminogen activator inhibitor levels in postmenopausal women with proven coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2000; 86(1):80-3.
59. Seljeflot I, Tonstad S, Hjermmann I, Arnesen H. Improved fibrinolysis after 1-year treatment with HMG CoA reductase inhibitors in patients with coronary heart disease. *Thromb Res.* 2002; 105(4):285-90.
60. Seljeflot I, Tonstad S, Hjermmann I, Arnesen H. Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and atorvastatin in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 2002; 162(1):179-85.
61. Song JC, White CM. Do HMG-CoA reductase inhibitors affect fibrinogen? *Ann Pharmacother.* 2001; 35(2):236-41.
62. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21(11):1712-9.
63. Tsikouris JP, Suarez JA, Meyerrose GE. Plasminogen activator inhibitor-1: physiologic role, regulation, and the influence of common pharmacologic agents. *J Clin Pharmacol.* 2002; 42(11):1187-99.
64. Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Statins and blood coagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(2):287-94.
65. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 1997; 11(18):2295-322.
66. Wada H, Mori Y, Kaneko T, Wakita Y, Nakase T, Minamikawa K, Ohiwa M, Tamaki S, Tanigawa M, Kageyama S, et al. Elevated plasma levels of vascular endothelial cell markers in patients with hypercholesterolemia. *Am J Hematol.* 1993; 44(2):112-6.
67. Wang CY, Liu PY, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med.* 2008;14(1):37-44.
68. Wassmann S, Faul A, Hennen B, Scheller B, Böhm M, Nickenig G. Rapid effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition on coronary endothelial function. *Circ Res.* 2003; 93(9):e98-103.
69. Wassmann S, Laufs U, Bäumer AT, Müller K, Konkol C, Sauer H, Böhm M, Nickenig G. Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharmacol.* 2001; 59(3):646-54.
70. Wiesbauer F, Kaun C, Zorn G, Maurer G, Huber K, Wojta J. HMG CoA reductase inhibitors affect the fibrinolytic system of human vascular cells in vitro: a comparative study using different statins. *Br J Pharmacol.* 2002; 135(1):284-92.
71. Zambrana JL, Velasco F, Castro P, Concha M, Vallés F, Montilla P, Jimenez-Perepérez JA, López-Miranda J, Pérez-Jiménez F. Comparison of bezafibrate versus lovastatin for lowering plasma insulin, fibrinogen, and plasminogen activator inhibitor-1 concentrations in hyperlipemic heart transplant patients. *Am J Cardiol.* 1997; 80(7):836-40.
72. Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins. – Basic research and clinical perspectives -. *Circ J.* 2010;74(5):818-26.
73. Zhou Q, Liao JK. Statins and cardiovascular diseases: from cholesterol lowering to pleiotropy. *Curr Pharm Des.* 2009;15(5):467-78.

## GHRELIN PROTECTS MUSCULOCUTANEOUS TISSUE FROM ISCHEMIC NECROSIS BY IMPROVING MICROVASCULAR PERFUSION

Rezaeian F, Wettstein R, Scheuer C, Bäumker K, Bächle A, Vollmar B, Menger MD, Harder Y<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**Introduction:** Persistent ischemia in musculocutaneous tissue may lead to wound-breakdown and necrosis. The objective of this experimental study was to analyse, whether the gastric peptide ghrelin prevents musculocutaneous tissue from necrosis and to elucidate underlying mechanisms. **Method:** Thirty-two C57BL/6 mice equipped with a dorsal skinfold chamber containing ischemic musculocutaneous tissue were allocated to 4 groups: 1. Ghrelin; 2. N( $\Omega$ )-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME); 3. Ghrelin & L-NAME; 4. Control. Microcirculation, inflammation, angiogenesis and tissue survival were assessed by fluorescence microscopy, inducible and endothelial nitric oxide synthase (iNOS, eNOS), vascular endothelial growth factor (VEGF) as well as nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) by Western blot analysis. **Results:** Ghrelin-treated animals showed an increased expression of iNOS and eNOS in critically perfused tissue when compared to controls. This was associated with arteriolar dilation,

increased arteriolar perfusion and a sustained functional capillary density (FCD). Ghrelin further upregulated NF- $\kappa$ B and VEGF, and induced angiogenesis. Finally, ghrelin reduced microvascular leukocyte-endothelial cell interactions, apoptosis and overall tissue necrosis ( $p < 0.05$  vs. Control). Inhibition of nitric oxide by L-NAME did not affect the anti-inflammatory and angiogenic action of ghrelin, but completely blunted the ghrelin-induced tissue protection by abrogating the arteriolar dilation, the improved capillary perfusion and the increased tissue survival. **Conclusions:** Ghrelin prevents critically perfused tissue from ischemic necrosis. Tissue protection is the result of a NOS-mediated improvement of the microcirculation, but not due to induction of angiogenesis or attenuation of inflammation. This might represent a promising, non-invasive and clinically applicable approach to protect musculocutaneous tissue from ischemia [**Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2011 Dec 9.;Epub ahead of print] PMID:22159999

---

<sup>1</sup> Klinikum Rechts der Isar, Technische Universität München.

## PRÉMIO NOBEL DA MEDICINA /2011

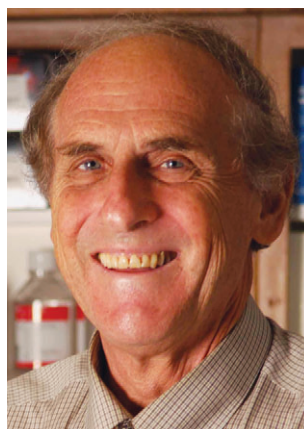
Foram galardoados com o Prémio Nobel de 2011 os seguintes cientistas: *Bruce Beutler* (EUA), *Jules Hoffmann* (Luxemburgo) *Ralph Steinman* (Canadá).



Bruce Beutler



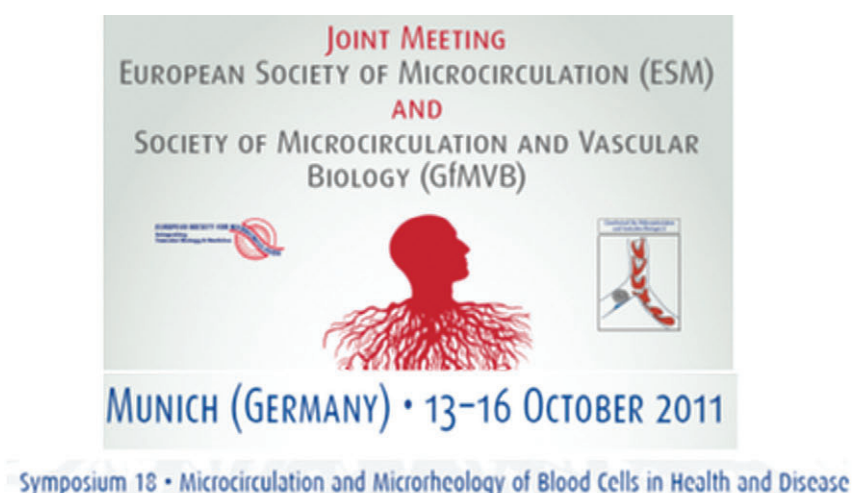
Jules Hoffmann



Ralph Steinman

Os dois primeiros contribuíram para “descobertas sobre a activação da imunidade inata”, enquanto Steinman (falecido a 30 de Setembro por doença cancerosa) participou no estudo das “células dendríticas e respectiva acção na imunidade adaptável”. Admite-se que aqueles cientistas revolucionaram o modo de interpretar o sistema imunitário, ao evidenciarem mecanismos de activação com potencial efeito na clínica das doenças contagiosas e da imunoterapia de prevenção. Enquanto Beutler e Hoffman trabalharam nas proteínas receptoras de reconhecimento de microorganismos, com repercussão na resposta imunitária do organismo, Ralph Steinman (que sobreviveu durante quatro anos ao cancro graças a terapia por si desenvolvida) investigou sobre o efeito das células dendríticas do sistema imunitário, ao activar a regulação da imunidade adaptável.

**PARTICIPAÇÃO NACIONAL EM REUNIÕES  
CIENTÍFICAS E CONGRESSOS INTERNACIONAIS**



**“Modulation of Erythrocyte ATP level by  
PKC and Band 3 Phosphorylation Degree”**

**Carlota Saldanha**



**MODULATION OF ERYTHROCYTE ATP LEVEL BY PKC  
AND BAND 3 PHOSPHORYLATION DEGREE**

S De Oliveira, J Pedro Almeida, C Saldanha  
*Unidade de Biologia Microvascular e Inflamação, Instituto de Medicina Molecular, Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, 1649-028 Lisboa Portugal*

Erythrocyte adenosine triphosphate (ATP) is utilised for active ion transport, protein phosphorylation, cyclic AMP production, and exportation to regulate local vascular resistance in the microcirculation. The physiological stimuli for ATP release by red blood cells (RBCs) are shear stress and low oxygen content. Deoxygenated and oxygenated haemoglobin are respectively bound and unbound to N terminal domain of RBC membrane band 3 in a way dependent of its phosphotylation degree. Protein tyrosine kinase (PTK) and protein tyrosine phosphatase (PTP) (i) interferes with the band 3



phosphorylation degree and are (ii) inhibited and activated respectively by protein kinase C (PKC). Chelerythrine (Che) is an ATP competitive inhibitor of PKC and a negative modulator of erythrocyte deformability.

The influence of Che in absence and presence of inhibitors of PTK and PTP in RBCs metabolism namely, 2,3BPG, ATP, glucose, oxygen haemoglobin affinity (P50), and nitric oxide efflux and its derivatives molecules such as GSNO, nitrites, nitrates and peroxyxynitrites will be present. While RBCs metabolites levels takes more time to be altered by PKC enzyme activity, the cation content inhibition, the NO efflux and its derivatives molecules are more rapidly changed, like as the erythrocyte deformability decreased. The activity of PKC is increase in presence of adenylate cyclase inhibition as well as in presence of guanylate cyclase inhibitor.

The effects of band 3 phosphorylation modulators together with PKC inhibition on RBCs anaerobic metabolism and NO metabolites are present and discussed.

## **INFLUENCE OF FIBRINOGEN ON ERYTHROCYTE NITRIC OXIDE EFFLUX INDUCED BY ACETYLCHOLINE**

C Saldanha, T Freitas, J P Almeida

*Institute of Biochemistry, Institute of Molecular Medicine,*

*Faculty of Medicine University of Lisbon*

*E-mail: carlotasaldanha@fm.ul.pt.*

### **Abstract**

Acetylcholine (ACh) is an endogenous compound present in blood circulation. We have reported that when erythrocytes are incubated with ACh there is an efflux of nitric oxide (NO), an increase of the deformability, of nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), and nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) concentrations, and decreased in erythrocyte aggregation. The erythrocyte NO mobilization and its efflux are dependent of the acetylcholinesterase-ACh enzyme complex, the G $\alpha$ i protein and of the protein band 3 phosphorylation degree. Fibrinogen is an acute phase protein that contributes to erythrocyte aggregation. When this protein is at physiological concentrations, it decrease the erythrocyte NO efflux.

**Aims** – The aim of the present study was to evaluate the effect of high fibrinogen concentrations on erythrocyte deformability, NO mobilization and its metabolites in presence of ACh.

**Main Methods** – NO was evaluated by amperometric method, nitrite, nitrate and S-nitrosoglutathione (GSNO) were measured using the spectrophotometric Griess reaction and erythrocyte deformability was determined using the Rheodyn SSD laser diffractometer.

**Key findings** – When high concentrations of fibrinogen and ACh 10-5M are present in the blood samples from healthy humans, the levels of ( $\text{NO}_2^-$ )

nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), GSNO and erythrocyte deformability increase, however, without significant changes in NO efflux

**Significance** – These results suggested that in inflammatory situations where both ACh and fibrinogen are presented the ability of erythrocytes to NO delivery might be compromised. However, at capillaries the erythrocyte deformability surpasses erythrocyte aggregation and as a consequence the effect of fibrinogen will be minor and the NO delivery to endothelial cell may be maintained.

**Third International Symposium on Non-neuronal Acetylcholine 2011** August 24-26 2011 University of Groningen, Groningen The Netherlands



**Influence of fibrinogen on erythrocyte nitric oxide efflux induced by acetylcholine**



J. Pedro Almeida, T. Freitas Santos, Carlota Saldanha

Institute of Biochemistry, Institute of Molecular Medicine (IMM), University of

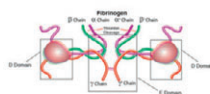
Lisbon Medical School, Santa Maria Hospital, Lisbon – Portugal

E-mail: carlotasaldanha@fm.ul.pt

**Introduction**

Fibrinogen is a plasma protein, with function in inflammation, hemostasis and hemorheology.

Fibrinogen binds to erythrocyte CD47



**Effects of ACh on erythrocyte deformability and nitric oxide (NO)**

Representative Fluorescence Microscopy Digital Images of DAF-2T Loading Erythrocyte Suspensions in Absence of Effectors (Control), Presence of L-Arginine  $10^{-6}\text{M}$  and Presence of Acetylcholine  $10^{-6}\text{M}$

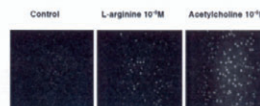
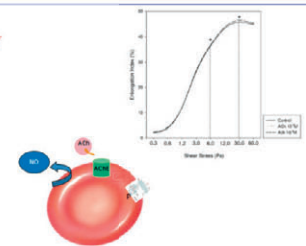


Table 1 - Fluorescence Intensity Values (mean  $\pm$  SD) of DAF-2T Obtained in Erythrocyte Suspensions in Absence of Effectors (Control), Presence of L-Arginine  $10^{-6}\text{M}$ , in Presence of Acetylcholine  $10^{-6}\text{M}$ , and in Presence of L-Arginine  $10^{-6}\text{M}$  plus Acetylcholine  $10^{-6}\text{M}$

Erythrocyte Suspensions (Effectors)	Fluorescence Intensity (mean $\pm$ SD)
Control	1.29 $\pm$ 0.49
L-Arginine $10^{-6}\text{M}$	1.12 $\pm$ 0.47
Acetylcholine $10^{-6}\text{M}$	1.35 $\pm$ 0.37
L-Arginine $10^{-6}\text{M}$ + Acetylcholine $10^{-6}\text{M}$	1.84 $\pm$ 0.46



Signal transduction induced by ACh and mediated by AChE, Gi protein, Band 3 Protein Phosphorylation and NO

**Aim** The aim of the present study was to evaluate the effect of high fibrinogen concentrations on erythrocyte NO mobilization and metabolites in presence of ACh.

**Methods**

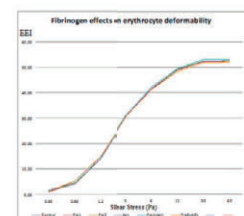
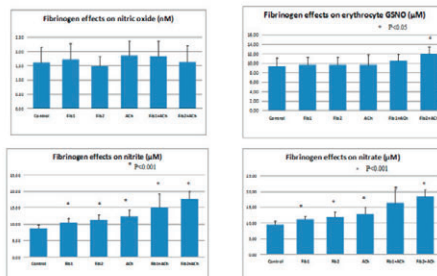
**Methods:** NO were determined by amperometric method, nitrite, nitrate and S-nitrosoglutathione (GSNO) were measured using the spectrophotometric Griess reaction and peroxyxynitrite by DCF-DA spectrofluorescence. Erythrocyte deformability (EE) was determined using the Rheodyn SSD Laser Diffractometer. Plasma fibrinogen concentrations were evaluated using the Fibrimeter Dade Eehring BF TII based in the Clot-based technology.

**Experimental design:** Aliquots of blood samples were incubated in the presence of acetylcholine  $10\mu\text{M}$  without or with fibrinogen adding

**Statistical analysis:** Data are expressed as means  $\pm$  SD. Student's paired t-tests were used Statistical analysis was conducted using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, 16.0 version. One-way ANOVA and paired t-tests were applied to assess statistical significance amongst samples. Statistical significance was set at a  $p < 0.05$  level

**Results**

[Fib1]=450mg/dL  
[Fib2]=510mg/dL



**Conclusions**

When high concentrations of fibrinogen and ACh  $10\mu\text{M}$  are present in the blood samples from healthy humans, the levels of GSNO, nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) increase, however, without significant changes in NO efflux, peroxyxynitrite or deformability.

**References**

Europ J Appl Toxicol 2004; 24: 419-427  
Clin Hemorrh Microc 2008; 40: 207-227  
Clin Hemorrh Microc 2001; 25: 153-163  
J Mem Biol 2009; 228: 89-97

**Acknowledgments**

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

## ELEIÇÕES DA SPHM (BIÊNIO 2012-2014)

Ocorreram no dia 12 de Dezembro do corrente ano as eleições para os Órgãos Sociais da SPHM. Concorreu a lista A, aprovada por unanimidade. Os pormenores sobre este acontecimento serão disponibilizados no próximo número do Boletim, em 2012.

---

*A SPHM e o Boletim  
desejam a todos os associados e amigos  
um excelente ano de 2012*

---

### CONVITE

A Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação (SPHM) aceita para publicação no seu BOLETIM artigos de curta extensão. O Boletim é editado quatro vezes por ano em formato de papel e electrónico (www.hemorreologia.com), sendo distribuído gratuitamente a individualidades e instituições científicas e culturais.

### INSTRUÇÕES

1. Todos os textos enviados para publicação estão sujeitos a apreciação editorial e aprovação. A decisão é baseada no mérito científico e cultural dos trabalhos.
2. São aceites somente os trabalhos preparados em versão óptica (*PDF* ou *Microsoft Word*).
3. Os textos devem ser redigidos em Português ou Inglês.
4. Os manuscritos com o pedido de publicação devem ser enviados por *e-mail* ao Editor (carlotasaldanha@fm.ul.pt).
  - Comunicações Originais (artigos curtos) – Os textos serão considerado para publicação rápida, com a seguinte estrutura: Sumário (50-70 palavras), Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusões. O(s) autor(es) são estimulados a englobar em conjunto os resultados, discussão e conclusões.  
(Extensão máxima do texto: 5 a 6 páginas a um espaço (letra de corpo 11), incluindo figuras tabelas e quadros (e respectivas legendas), agradecimentos e até 30 referências bibliográficas).
  - Artigos de Revisão – O BOLETIM terá a maior satisfação em acolher curtas revisões sobre assuntos de particular interesse, no âmbito da Hemorreologia, Microcirculação ou assuntos de âmbito médico ou de outras áreas científicas afins, que sejam submetidos directamente para publicação ou mediante convite especial do Editor.  
(Extensão máxima do texto: 8 a 10 páginas (letra de corpo 11) incluindo figuras, tabelas, quadros, fotos (e respectivas legendas), agradecimentos e até 60 referências bibliográficas).

### INVITATION

The Portuguese Society on Hemorrheology and Microcirculation (Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação, SPHM) is pleased to welcome short papers for publication in its BOLETIM. This publication, in paper and online (www.hemorreologia.com), is distributed four times a year free of charge to the members of the Society.

### INSTRUCTIONS

1. All submitted manuscripts are subjected to editorial review and approval. The decision to publish is dependent on the scientific and cultural merit of the papers.
2. Only contributions prepared and submitted as optic version (*PDF* or *Microsoft Word*), will be accepted.
3. Texts must be written in Portuguese or in English.
4. All scientific contributions, including manuscript submission and further correspondence should be addressed by *email* to the Editor (carlotasaldanha@fm.ul.pt).
  - Original Communications – Manuscripts may be considered for rapid processing as short communications. All manuscripts should be arranged in the following sections: Abstract (50-70 words), Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References. The author(s) may combine some of the sections normally included in a full paper, namely the results, discussion and conclusions.  
(Maximum communication length – 5-6 single spaced typed pages, including figures, tables, legends, acknowledgments and up to 30 references).
  - Short Reviews – The BOLETIM will publish reviews on subjects of particular interest in its field, either following a special invitation or a submission by the author, and in the latter case only after approval by an Editorial Board member. Further information can be obtained from the editor.  
(Maximum review length – 8-10 full pages, including figures, tables, photos, legends, acknowledgments and up to 60 references)