

LUCIANE CRUZ LOPES ARAUJO

H **N** **SO₂CH₃**
ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS
DO NIMESULIDE E DO AAS SOBRE A
AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA, TEMPO DE
SANGRAMENTO E PRODUÇÃO DE TXA₂
EM VOLUNTÁRIOS SADIOS.



Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de concentração Farmacologia e Terapêutica.

LUCIANE CRUZ LOPES ARAUJO

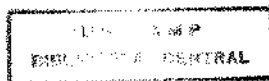
**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS
DO NIMESULIDE E DO AAS SOBRE: A
AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA, TEMPO DE
SANGRAMENTO E PRODUÇÃO DE TXA₂
EM VOLUNTÁRIOS SADIOS.**

*Este exemplar
foi devidamente
corrigido conforme
resoluções da CCPG
036/83. 12/06/97
Thales M. Rocha*

Tese apresentada à
Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da
Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção
do grau de Doutor em
Ciências, área de
concentração Farmacologia
e Terapêutica.

Orientador Prof. Dr. Thales
Rocha de Mattos-Filho -
FOP- UNICAMP

Piracicaba-SP
1997



97081920

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
V.	A15e
E.	
TELADO DO	31 821
PROC.	281/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/04/97
N.º CPD	

CM-00099460-8

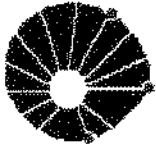
Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

A15e	<p>Araújo, Luciane Cruz Lopes.</p> <p>Estudo comparativo dos efeitos do nimesulide e AAS sobre a agregação plaquetária, tempo de sangramento e produção de TXA₂ em voluntários sadios / Luciane Cruz Lopes Araújo. - Piracicaba : [s.n.], 1997.</p> <p>161f. : il.</p> <p>Orientador : Thales Rocha de Mattos Filho.</p> <p>Tese (doutoramento) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Sangue - Distúrbios. 2. Agentes antiinflamatórios. I. Mattos Filho, Thales Rocha de. II. Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">19.CDD - 615.1</p>
------	--

Índices para o Catálogo Sistemático

1. Farmacologia

615.1



UNICAMP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Doutorado**, em sessão pública realizada em 06/02/96, considerou o candidato aprovado.

1. Thales Rocha de Mattos Filho Thales R. Mattos

2. Eduardo Dias de Andrade Eduardo Dias de Andrade

3. Celso Paulino da Costa Celso Paulino da Costa

4. Alba Regina Monteiro Souza Brito Alba Regina Monteiro Souza Brito

5. Gilberto de Nucci Gilberto de Nucci

A essa loucura maravilhosa da expectativa do sobrenatural: ~~DEUS~~

Aos meus pais
ONDINA e FRANCISCO
por vivenciarem comigo mais esta etapa
de crescimento.

Ao pai dos meus filhos, CARLOS, que racionalmente compreendeu e
humanamente não aceitou minhas ausências...

Aos meus filhos
MATHEUS e ISABELLA
que impacientemente respeitaram
minhas ausências.

A todos os pós-graduandos que transcendem os limites
dos sonhos e sono....

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos-Filho pelo incentivo, pela confiança depositada, pelos desafios e pela orientação segura deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gilberto De Nucci, pela sabedoria científica, pelo apoio, pela confiança depositada, pela tolerância e por ter possibilitado a realização deste trabalho em seu laboratório.

Ao Prof. Edson Antunes e ao Prof. Luis Donato pelas valiosas contribuições, pelo incentivo, pela confiança, tolerância, pelas discussões científicas, pela incondicional disposição, pelo carinho e amizade.

A Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza-Britto pela amizade, pelo carinho, liberdade concedida, pela constante orientação, apoio e incentivo científico, por ter possibilitado meu crescimento, pelos desafios e pela indução daquele grau de loucura necessários para aceitá-los.

Aos professores da área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, Eduardo Dias Andrade, Maria Cristina Volpato, Francisco C. Groppo, Pedro L. Rosalem, José Ranalli pelo incentivo e amizade.

Às professoras Claudia A. Pazianoto e Raquel Rizzo pela amizade, dedicação e realização dos exames bioquímicos e hematológicos de triagem dos voluntários.

- À colega Sisi pela amizade, carinho, orientação e colaboração nos ensaios *in vitro* deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- À colega Sisi pela amizade, carinho, orientação e colaboração nos ensaios *in vitro* deste trabalho.
- Ao Prof. Ms. Adalmir Elias Duak e Profa. Ms. Maria Imaculada de Lima Motelbelo, pela orientação na realização das análises estatísticas.
- Em especial ao Prof. Francisco C. Groppo pela orientação na utilização de softwares.
- Aos colegas Dora, Marta, Heloisa, Soraia, Kleber, Rodrigo, Rogério, Renato, Aldete, Elen, Marcelo, Heidi, Simone e Romilson pela amizade e incentivo indispensáveis ao longo desta tese.
- Aos técnicos e bolsistas Cristina, Débora, Patrícia, Elaine, Ricardo, Márcio, Toninho pelo auxílio aos voluntários e na coleta das amostras de sangue .
- Ao bolsista Oscar Ramos pela colaboração no resumo inglês e pelo auxílio incondicional na computação gráfica da tese.
- Às secretárias Maria das Dores Ponciano, da Farmacologia FCM-UNICAMP, Ana Maria Cossa de Arruda Oliveira, do CPG, Maria Elisa dos Santos, da área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, pela eficiência, amizade e dedicação.
- A UNIMEP, especialmente a Darci pelo auxílio incondicional e pela possibilidade de utilização do laboratório para execução de um dos ensaios deste trabalho. Aos colegas e chefes Rosa, Silvio, Manoel, Leno, Yoko pela amizade, incentivo e respeito.
- A USF, especialmente à Comissão de Ética que contribuiu com sugestões para realização dos ensaios *ex vivo* e *in vivo*. Ao Diretor Prof. Sérgio L. Martin Nardy pelo apoio e confiança depositada, e à Prof. Dra. Estera Finkelfarb pelo carinho, amizade e tolerância.
- Aos monitores e bolsistas, Juliana, Carla, Oscar, Sandro, Sônia pelo respeito, pela amizade e compreensão nos momentos que não pude acompanhá-los de perto.
- À CAPES, pelo apoio financeiro (Bolsa de Estudo) prestado, que foi de suma importância na elaboração deste trabalho.
- Ao Laboratório ASTA MEDICA, na pessoa do Gerente industrial Siegfried Preskorn pelo envio do sal puro do nimesulide.
- Aos voluntários que participaram das várias etapas desta tese, pois sem sua valiosa colaboração os estudos não se realizariam. Eterna gratidão!
- *À CARLOS que da sua maneira colaborou e acompanhou a laboriosa execução deste trabalho.*

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	P-1
Lista de figuras	3
Lista de tabelas	4
Lista de substâncias	6
RESUMO	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1. Nimesulide: a perspectiva de um antiinflamatório ideal?	11
2.2. Efeito do AAS sobre a agregação plaquetária e o tempo de sangramento	22
2.3. Plaquetas e hemostasia	28
3. PROPOSIÇÃO	44
4. MATERIAL E MÉTODO	45
4.1 Caracterização das amostras	45
4.2 Efeito do nimesulide e do AAS, <i>in vitro</i> , sobre a agregação plaquetária e determinação da produção de TXA ₂ .	46
4.3 Efeito do nimesulide e do AAS, <i>ex vivo</i> , sobre a agregação plaquetária e determinação da produção de TXA ₂	49
4.4 Estudo comparativo <i>in vivo</i> do tempo de sangramento em voluntários sadios submetidos a tratamento com NMSL e AAS	51
4.5 Análise Estatística	53
5. RESULTADOS	54
5.1 Efeito do NMSL e do AAS sobre a agregação plaquetária e a produção de TXA ₂ , <i>in vitro</i>	54
5.1.1. Estudo da agregação plaquetária <i>in vitro</i>	54
5.1.2. Influência do TXA ₂ no efeito antiagregante plaquetário do NMSL E AAS	64
5.2. Efeito do NMSL e do AAS na agregação plaquetária e produção de TXA ₂ em voluntários sadios, <i>ex vivo</i>	69
5.3. Prolongamento do Tempo de Sangramento após tratamento com NMSL e AAS	71
6. - DISCUSSÃO	78
7- CONCLUSÕES	88
ANEXOS	89
SUMMARY	140
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

LISTA DE ABREVIATURAS

μ g	micrograma
μ M	micromolar
AA	ácido araquidônico
AAS	ácido acetilsalicílico
AC	adenilciclase
ADP	difosfato de adenosina
ADR	adrenalina
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
Apud	em
ATP	trifosfato de adenosina
Ca ⁺⁺	íons cálcio
COL	colágeno
COX	ciclooxigenase
COX-1	ciclooxigenase tipo 1
COX-2	ciclooxigenase tipo 2
DAG	diacilglicerol
DAGlipase	diacilglicerol lipase
EDTA	ácido etileno diamino
epm	erro padrão da média
et al.	e outros (abreviatura de 'et alii')
etc	e as demais coisas (abreviatura de 'et cetera')
FCDP	fator de crescimento plaquetário
FP4	fator plaquetário 4
GMP	monofosfato de guanosina
GMPc	monofosfato de guanosina cíclica
GP	glicoproteína
GPIa	glicoproteína tipo Ia
GPIb	glicoproteína tipo Ib
GPIV	glicoproteína tipo IV
GTPase	guanosina trifosfatase
IgG	imunoglobulina G
INDO	indometacina
LTB ₄	leucotrieno B ₄
Kg	quilograma
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
NADPH-oxidase	difosfato de adenosina oxidase
ng	nanograma
NMSL	nimesulide
NO	óxido nítrico

NSAIDs	drogas antiinflamatórias não esteroidais
OH ⁻	oxidrila
O ₂ ⁻	ânion superóxido
PAF	fator ativador plaquetário
PDE	fosfodiesterase
PDEIV	fosfodiesterase tipo IV
PGs	prostaglandinas
PGG ₂ E PGH ₂	endoperóxidos cíclicos
PGI ₂	prostaciclina
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PL	fosfolipase
PLA ₂	fosfolipase A2
PLC	fosfolipase C
PMA	acetato miristato forbol
PMNs	leucócitos polimorfonucleares
p.o	<i>per os</i> (pela boca = via oral)
PPP	plasma pobre em plaquetas
PRP	plasma rico em plaqueta
RIA	radioimunoensaio
ROO ⁻	peróxido
rpm	rotações por minuto
TS	tempo de sangramento
TXA ₂	tromboxano A ₂
TXB ₂	tromboxano B ₂
\bar{x}	média aritmética

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Pag. Título

1	12	Estrutura química do nimesulide
2	55	Curva dose-resposta do efeito antiagregante do nimesulide
3	57	Curva dose-resposta do efeito antiagregante do ácido acetilsalicílico
4	59	Efeito do tempo de incubação sobre a ação inibitória do nimesulide na agregação
5	61	Traçado ilustrativo mostrando o efeito inibitório do NMSL sobre a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico, variação imposta pelo tempo de incubação.
6	63	Traçado ilustrativo comparando o efeito inibitório do NMSL e do AAS induzida pelos cinco agonistas.
7	66	Efeito do nimesulide sobre a produção de TXA ₂
8	68	Efeito do ácido acetilsalicílico sobre a produção de TXA ₂
9	74	Variação do tempo de sangramento após administração oral de nimesulide e ácido acetilsalicílico
10	75	Perfil da curva do tempo de sangramento (seg) antes e após o tratamento com NMSL entre os voluntários dos sexo masculino e feminino.
11	76	Perfil da curva do tempo de sangramento (seg) antes e após o tratamento com AAS entre os voluntários dos sexo masculino e feminino.

LISTA DE TABELAS

Tab	Pag.	Título
1	101	% de inibição da agregação induzida pelos agonistas utilizados, em PRP, pré incubado (20 min.) com nimesulide em diferentes concentrações.
1.1-1.5	119	Tabelas dos valores individuais de % de agregação plaquetária induzida pelos diversos agonistas e pré-incubado com NMSL.
2	102	% inibição da agregação induzida pelos agonistas utilizados, em PRP, pré incubado (20 min.) com ácido acetilsalicílico em diferentes concentrações.
2.1-2.5	122	Tabelas dos valores individuais de % de agregação plaquetária induzida pelos diversos agonistas e pré-incubado com AAS.
3	103	% inibição da agregação induzida pelos agonistas utilizados, em PRP, pré incubado com nimesulide (IC_{50}), variação imposta pelo tempo de incubação.
3.1-3.5	124	Tabela dos valores individuais da % agregação induzida pelos diversos agonistas, variação imposta pelo tempo de incubação com NMSL.
4	62	IC_{50} do nimesulide e do ácido acetilsalicílico na agregação plaquetária <i>in vitro</i>
5	65	Produção de TXA_2 em PRP, basal, antes e após a incubação prévia (20 min) com indometacina acrescida dos agonistas.
5.1-5.2	126	Tabelas dos valores individuais da produção de TXA_2 em PRP, basal, antes e após a incubação com indometacina.
6	104	Produção de TXA_2 em PRP, antes e após incubação prévia (20min) com nimesulide e adição dos cinco agonistas plaquetários.
6.1-6.5	128	Tabelas dos valores individuais da produção de TXA_2 em PRP, após incubação prévia com NMSL.
7	105	Produção de TXA_2 em PRP, antes e após incubação prévia (20min) com ácido acetilsalicílico e adição dos cinco agonistas plaquetários.
7.1-7.5	130	Tabelas dos valores individuais da produção de TXA_2 em PRP, após incubação prévia com AAS.
8	70	Efeito do tratamento oral com nimesulide e ácido acetilsalicílico na agregação plaquetária(%) nos tempos 0, 2 e 4h após.

Tab	Pag.	Título
8.1-8.2	132	Tabelas dos valores individuais da % de agregação antes e após tratamento dos voluntários com NMSL
9	70	Efeito do tratamento oral do nimesulide e ácido acetilsalicílico sobre a produção de TXA ₂ nos tempos 0, 2 e 4h após.
9.1-9.2	133	Tabelas dos valores individuais da % de agregação antes e após tratamento dos voluntários com AAS.
10	73	Efeito do nimesulide e do ácido acetilsalicílico sobre o tempo de sangramento e porcentagem de variação nos voluntários sadios.
10.1-10.6	134	Tabelas dos valores individuais do tempo de sangramento antes e após os tratamentos com NMSL e AAS
11.1-11.2	106	Teste de homogeneidade de variâncias para os voluntários, sem distinção de sexo antes e após os tratamentos com NMSL e AAS
12.1-12.4	108	Teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários, segundo o sexo, antes e após tratamento com NMSL e AAS
12.5-12.16	112	Teste de homogeneidade de variâncias entre os sexos antes e após os tratamentos com NMSL e AAS nos diversos períodos de observação
13	77	Efeito do nimesulide e do ácido acetilsalicílico sobre o tempo de sangramento, variação imposta pelo sexo e período de observação.
13.1-13.6	137	Tabelas dos valores individuais do tempo de sangramento, segundo o sexo antes e após os tratamentos com NMSL e AAS

LISTA DE SUBSTÂNCIAS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
Ácido acético	Merck Germany
Ácido acetilsalicílico	ASPIRIN® - BAYER
Adrenalina	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Anti-TXB ₂	J. Salmon (Wellcome Res. Lab. Reino Unido) - doação
Azida sódica	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Bicarbonato de sódio	Merck (Alemanha)
Carvão ativado	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Citrato sódico	Merck Germany
Cloreto de potássio	Merck (Alemanha)
Cloreto de sódio	Merck (Germany)
Colágeno	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Dextran	Sigma (St Louis, EUA)
Difosfato de adenosina	Sigma Chemical Company St. Louis, Mo, EUA)
EDTA	Sigma Chemical Company (St Louis, Mo, EUA)
Etanol	Merck (Alemanha)
Fator de agregação plaquetário	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Gelatina	Aldrich Chemical Co Ltd (St Louis, Mo, EUA)
Glicose	Merck (Germany)
Indometacina	Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, EUA)
Nimesulide	NISULID® - LABOFARMA
POPOP	Koch-Light Laboratories Ltd (Reino
PPO	Sigma Chemical Company (St Louis, EUA)
Simplat II R ®	Organon Teknica Corporation, USA
Soro anti-TXB ₂	Dr. J. A. Salmon (Weilcome Res. Lab., Beckenhan, GB)
Sulfato de magnésio	Merck (Germany)
Tolueno	Labsynth Produtos para Lab. LTDA (diadema, SP, BR)
TRIS	Sigma Chemical Company (St Louis, Mo, EUA)
Triton X-100	Nuclear (SP, BR)
3H-Tromboxano B ₂	Amersham (Bucks, GB)
5,6,8,9,11,12,14,15,(N)-[3h]-TXB ₂ (atividade específica 140Ci/mmol)	Amersham International (Bucks, Reino Unido)
TXB ₂	Sigma (St louis, EUA)

RESUMO

O efeito terapêutico dos antiinflamatórios não esteroidais (NSAIDs) vem acompanhado de efeitos indesejáveis relacionados à irritação gástrica, alterações de hemostasia, entre outros. Nimesulide (NMSL) é um NSAID que apresenta mecanismo de ação bastante peculiar. Estudos recentes mostram que o NMSL apresenta pouca atividade sobre a COX-1. O objetivo deste estudo foi verificar se o NMSL altera a função plaquetária e o tempo de sangramento (TS) o que, em odontologia, seria desvantajoso, podendo induzir um sangramento excessivo e, conseqüentemente, uma interferência negativa nos processos de reparação tecidual. Para tanto, a função plaquetária foi avaliada *in vitro*; *ex vivo* e *in vivo*. Amostras de sangue de voluntários sadios foram coletadas, em citrato de sódio 3.8%, para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi incubado com NMSL (0.01 μ M a 1000 μ M) ou AAS (0.1 μ M a 100 μ M) por 20 min a 37°C sobre constante agitação. A IC₅₀ para o efeito antiagregante plaquetário do NMSL e do AAS foi determinada após a adição de ADP (1 μ M), ácido araquidônico (AA 1mM), fator ativador plaquetário (PAF 1-3 μ M), colágeno (COL 2.5 - 5.0 μ g/ml) e adrenalina (ADR 10 μ M). A formação de TXA₂ após adição dos agonistas ao PRP foi determinada por radioimunoensaio. Nos estudos *ex vivo*, voluntários sadios foram selecionados e divididos em 2 grupos, tratados com NMSL (cp 100mg, n=4) ou com AAS (cp 100mg, n=3). Amostras de sangue foram coletadas antes e após 2 e 4h do tratamento, seguindo os procedimentos do estudo *in vitro* quanto a verificação da agregação plaquetária e determinação da produção de TXA₂. *IN VIVO*, foram utilizadas as mesmas doses das drogas, seguida da determinação do TS utilizando SIMPLATE - II R®, antes e após 2, 4, 8, 24h e 7 dias. Verificou-se que o NMSL é menos potente que o AAS para inibir a agregação plaquetária *in vitro*, induzida por ADP, COL, ADR e AA, exceção feita ao PAF. Seu efeito é concentração e tempo dependentes. A produção de TXA₂ foi inibida pelo NMSL (>30 μ M) em concentrações superiores a do AAS (>3 μ M) nos estudos *in vitro*. No entanto, a inibição de mais de 80% da produção de TXA₂ só foi alcançada em concentrações superiores à 100 μ M. NMSL não interferiu com a agregação plaquetária no ensaio *ex vivo*, inibindo entretanto, significativamente (p<0.05) a produção de TXA₂ induzida por PAF. NMSL prolongou o TS (em média 56%) nos períodos 4h e 8h em proporções menores que o AAS (em média 160%); este, por sua vez interferindo nos tempos 2h, 4h, 8h e 24h. Concluiu-se que NMSL é menos potente que o AAS quanto a inibição da COX-1 plaquetária. No entanto, outros mecanismos podem estar envolvidos, dada a especificidade de ação desta droga para inibir os efeitos mediados pelo PAF, como por exemplo, a interferência com a fosfodiesterase plaquetária.

Palavras-Chave:

1) Nimesulide 2) Ácido acetilsalicílico 3) Plaqueta 4) Tempo de sangramento

1 - INTRODUÇÃO

O tratamento de processos inflamatórios agudos na cavidade bucal é de interesse prático, pois, tal condição patológica apresenta manifestação aguda caracterizada pelo rápido desenvolvimento de dor, edema e limitação da deglutição, fonação e mastigação. Nestes casos, o tratamento com NSAIDs por um curto período de tempo pode ser justificado, especialmente por estas drogas exibirem efeito analgésico decorrente da ação antiinflamatória, atenuando o edema e a limitação da função do sistema mastigatório.

Freqüentemente, o efeito terapêutico aparece ao lado de efeitos adversos desfavoráveis e, algumas vezes, severos. O uso de NSAIDs tem sido associado a problemas de tolerabilidade, que são inerentes à sua capacidade intrínseca de inibição de síntese de prostaglandinas (PGs).

Estão bem documentados as lesões gástricas promovidas pelo grupo dos NSAIDs (KELLY¹¹⁴, 1956; LAPORTE, et al.¹²⁷, 1991; GABRIEL et al.⁸⁰, 1991; ; HENRY & ROBERTSON¹⁰⁰, 1993), bem como lesões renais (EMKEY⁷¹, 1983), alteração de parâmetros de hemostasia (O'BRIEN¹⁶⁶, 1968; NADELL et al.¹⁵⁷, 1974; McINTYRE et al.¹⁴¹, 1978; MIELKE¹⁴³, 1982; SAMRA et al.¹⁹⁵, 1991), manifestação de hiperreatividade brônquica em pacientes susceptíveis (WOJNAR et al.²³¹, 1980) além de reações pseudoalérgicas, comumente referidas como idiosincrasias, principalmente ao ácido acetilsalicílico (SETTIPANE²⁰⁰, 1983), entre outras.

Desde 1945 quando SINGER²⁰² descreveu pela primeira vez o aparecimento de hemorragia em pacientes que haviam recebido AAS após tonsilectomia, a literatura vem registrando um número crescente de trabalhos abordando anormalidades na hemostasia por alterações qualitativas da função plaquetária provocadas pelo uso dos NSAIDs (SANFORD et al.¹⁹⁶, 1990).

Estas alterações tornam-se indesejáveis, principalmente quando o tratamento instituído se faz em pacientes que apresentam distúrbios

hemostáticos. O tratamento realizado profilaticamente em intervenções cirúrgicas ou no período pós-cirúrgico, também se ressentem destas manifestações adversas, uma vez que, o sangramento é evidente e pronunciado quando da utilização de algum componente deste grupo, prejudicando, deste modo, a cicatrização e o restabelecimento da área lesada (O'BRIEN et al.¹⁶⁷, 1970; LAWRENCE et al.¹²⁸, 1994).

Assim, em um esforço para superar estas limitações, compostos antiinflamatórios exibindo outros modos de ação vem sendo intensivamente investigados nos últimos anos.

O nimesulide (2-fenoxi-4-nitro-metanosulfonânilide) foi selecionado de um número vasto de compostos sulfonânilides, por suas notáveis propriedades antiinflamatórias, analgésicas e antipiréticas, em vários estudos farmacológicos (SWINGLE & MOORE²⁰⁵, 1974; GRANT et al.⁸⁹, 1975; SWINGLE et al.²⁰⁶, 1976; RAINSFORD¹⁸¹, 1977). A estrutura química desta molécula contém um grupo funcional sulfonânilide que parece ser determinante para a eficácia e segurança na resposta inflamatória (VIGDHAL & TUKEY²²¹, 1977; RUFER et al.¹⁹², 1982).

Atualmente, esta droga vem sendo bastante empregado no tratamento de ampla variedade de processos inflamatórios das vias aéreas (otorrinolaringologia), osteoarticulares e vasculares, ginecologia e odontostomatologia (WEISSENBACH²²⁷, 1981; REINER & MAGNI¹⁸², 1982; PAIS & ROSTERO¹⁷⁰, 1983; REINER et al.¹⁸³, 1984; MILVIO¹⁴⁹, 1984; MILVIO¹⁵⁰, 1985; FINGUERRA et al.⁷⁵, 1986; WARD & BROGDEN²²³, 1988; BISCARINI et al.²⁷, 1988; BUCCI et al.³⁹, 1990).

A farmacologia clínica e seu potencial terapêutico vem sendo extensivamente investigado (BERGER et al.¹⁹, 1986; BÖTTCHER et al.³⁶, 1987; WARD & BROGDEN²²³, 1988) e o que mais chama a atenção para esta droga é a baixa incidência de efeitos adversos (TOFANETTI et al.²¹¹, 1989; MARINI et al.¹³⁶, 1990).

O mecanismo pelo qual o nimesulide exerce seu efeito antiinflamatório, no homem, ainda não está totalmente elucidado, visto que tem sido demonstrado que esta droga pode atuar em diferentes estágios da reação inflamatória. De fato, inibe a síntese de PGs (VIGDHAL & TUKEY²²¹,

1977), reduz geração de ânion superóxido em neutrófilos ativados (CAPSONI et al.⁴⁵, 1987; BEVILACQUA et al.²⁴, 1988); atua diretamente como "scavengers" sobre o ácido hipocloroso, gerado pela via mieloperoxidase durante o processo fagocítico (DALLEGRI et al.^{64,65}, 1990, 1992); exibe efeito inibitório sobre fosfodiesterase tipo IV (BEVILACQUA²², 1991); comporta-se como inibidor não competitivo da histamina liberada 'in vivo' (BERTI et al.^{21,22}, 1991) e *in vitro* (MARINO et al.¹³⁶, 1992); apresenta atividade antioxidante direta sobre vários radicais livres como hidroxilas, superóxido e peróxido de hidrogênio (MAFFEI-FACINO et al.¹³², 1993) e interfere com receptores de adenosina na membrana de leucócitos polimorfonucleares (CAPECCHI et al.⁴⁴, 1993), além de inibir seletivamente a COX-2 em incubados de leucócitos (VAGO et al.²¹⁴, 1995), entre outros efeitos.

Assim, pode-se perceber que a nível bioquímico, o mecanismo de ação antiinflamatório do nimesulide envolve interferências com produção/ação de outros mediadores que não PGs, tais como enzimas, derivados tóxicos de oxigênio, fator ativador plaquetário e histamina, como vem mostrando os muitos trabalhos realizados, citados anteriormente.

No entanto, a literatura registra poucos estudos sobre a atividade antiagregante plaquetária do nimesulide. CESERANI et al.⁵⁴, (1993), realizou um ensaio inicial utilizando sangue de cobaios e observou que o nimesulide apresenta atividade antiagregante em doses mais baixas que aquelas requeridas para inibir a inflamação e a dor.

Portanto, diante da escassez de trabalhos clínicos, ou experimentais com sangue humano, ex-vivo, com objetivo de mostrar as possíveis interferências do nimesulide na hemostasia, propôs-se então estudar seus efeitos sobre alguns dos mecanismos deste processo biológico.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - NIMESULIDE: a perspectiva de um antiinflamatório ideal ?

Nimesulide é um antiinflamatório não esteroidal que também apresenta atividade antipirética e analgésica (SWINGLE et al.²⁰⁶, 1976; RAINSFORD¹⁶¹, 1977; TANAKA et al.²⁰⁸, 1992). Sua síntese foi descrita por MOORE & HARRINGTON¹⁵⁵, em 1974. Trata-se de um ácido fraco (pKa=6.5) e difere de outros NSAIDs por apresentar em sua estrutura química um grupo funcional sulfonanilide (fig.1).

A marcada atividade antiinflamatória foi estudada em vários modelos *in vivo* de inflamação tais como edema de pata induzido por carragenina (BÖTTCHER et al.³⁶, 1987), eritema por luz UV em pele de cobaio (SWINGLE & MOORE²⁰⁵, 1974) e artrite por adjuvante em ratos (BÖTTCHER et al.³⁶, 1987).

A validade terapêutica do nimesulide vem sendo provada clinicamente por extenso número de ensaios em pacientes com diferentes condições inflamatórias (GAMARSKI⁸¹, 1981, LEDERMAN & RUBSTEIN¹²⁹, 1982; MANTOVANI & Dal PRA¹³⁴, 1987; MONIACI et al.¹⁵⁴, 1988).

A razão para o desenvolvimento do nimesulide originou da observação de que os NSAIDs atuam principalmente através de inibição de síntese de prostaglandinas, o que muitas vezes está associado ao aparecimento de efeitos indesejáveis. De fato, a redução do nível de PGs é responsável não somente pela eficácia terapêutica, mas também, aos bem conhecidos efeitos adversos, especialmente desordens gastrointestinais e distúrbios de hemostasia (O'BRIEN et al.¹⁶⁷, 1970; HENRY & ROBERTSON¹⁰⁰, 1993).

Atualmente, verifica-se que o aparecimento de efeitos indesejáveis com o uso dos NSAIDs é muito variável dentro do próprio grupo. Com a identificação de uma isoforma induzível da cicloxigenase (COX-2) (XIE et al.²³³, 1991) pode-se demonstrar que compostos que inibem preferencialmente a COX-1 (constitutiva) promovem maiores efeitos adversos que aqueles que apresentam seletividade para COX-2 (VANE & BOTTING²¹⁶, 1995).

Para superar estas limitações, compostos antiinflamatórios que exibem modo de ação alternativos foram investigados, o que conduziu à caracterização do grupo dos metanosulfonâníde, uma nova classe de compostos com pobre efeito, *in vitro*, sobre o metabolismo do ácido araquidônico (VIGDHAL & TUKEY²²¹, 1975; SWINGLE et al.²⁰⁶, 1976,).

O mecanismo de ação do nimesulíde tem sido extensamente investigado e envolve interferências com a produção/ação de outros mediadores que não as PGs tais como enzimas, derivados tóxicos de oxigênio, fator ativador plaquetário (PAF) e histamina.

Porém, tendo em vista a complexidade do assunto pesquisado e a multiplicidade dos elementos envolvidos direta e/ou indiretamente no estudo dos mecanismos de ação antiinflamatória até agora propostos para o nimesulíde, a presente revisão faz um retrospecto da literatura sobre a influência do nimesulíde sobre os principais componentes sugeridos como parte da ação do mesmo: formação de prostanóides, metabólitos tóxicos de oxigênio, histamina e PAF.

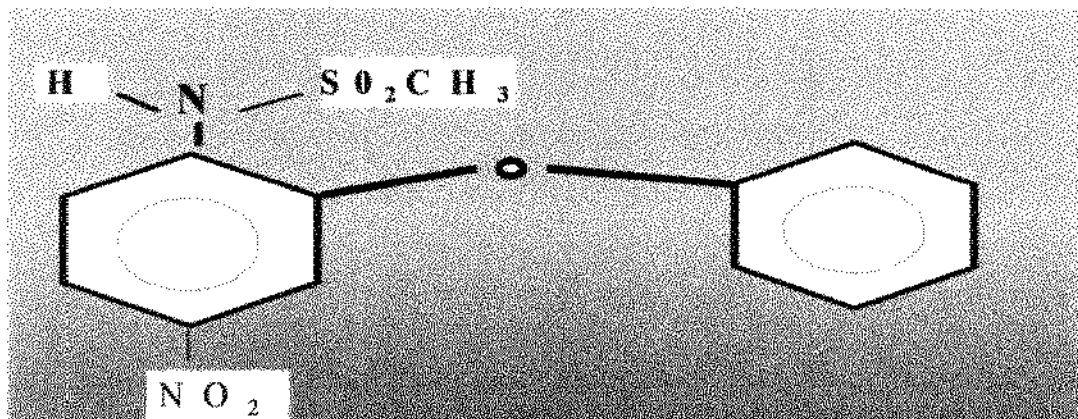


Figura 1 - Estrutura química do nimesulíde (4-nitro-2-fenoximetano sulfonâníde)

2.1.1 - EFEITO DO NIMESULÍDE SOBRE A FORMAÇÃO DE PROSTANÓIDES

Os estudos iniciais sobre o mecanismo de ação antiinflamatório do nimesulíde enfocaram a inibição de síntese de PGs.

VIGDALHL & TUKEY²²¹, (1975), em estudo comparativo para verificar a habilidade de alguns NSAIDs em inibir a COX, constatou que a indometacina foi cerca de 100x mais potente que o nimesulide *in vitro*.

No entanto, *in vivo*, a atividade antiinflamatória do nimesulide é comparável à indometacina. Isto poderia significar uma seletividade para a COX envolvida na inflamação (COX-2) ou alternativamente, que a inibição da COX, pelo menos no caso do nimesulide, não seja tão importante para a atividade antiinflamatória como muitos suspeitaram (SWINGLE et al.²⁰⁶, 1976).

Com o trabalho de RUFFER et al.¹⁹², (1982), novamente foi constatado a discrepância entre a relativa potência antiinflamatória *in vivo* e a pequena capacidade inibitória da COX *in vitro* pelo nimesulide.

CASCIARI et al.⁴⁸, (1984) verificaram que o nimesulide não inibiu a produção 6-keto-PGF_{1α} (produto da degradação de PGI₂) e TXB₂ em mucosa gástrica.

Estes resultados foram, em parte, confirmados por CARR et al.⁴⁷, (1986), onde os mesmos reafirmaram que o nimesulide exibia pronunciada dissociação entre o efeito antiinflamatório e a potência gastrointestinal tóxica. Com base em seus resultados, estes autores sugeriram que o nimesulide não tem capacidade de exercer atividade anti-prostaglandina quando o sistema enzimático da COX não está ativado.

BEVILACQUA et al.²⁴, (1988), sugeriram que a inibição da COX pelo nimesulide e compostos relacionados não é direta, mas mediada pela subtração dos co-fatores oxigenados (peróxidos lipídicos) do meio. O poderoso efeito do nimesulide sobre a produção de O₂⁻ pelos leucócitos polimorfonucleares (PMN) poderia ser a exploração de seu efeito secundário sobre a COX somente quando a mesma é ativada pelo O₂⁻ (cofatores).

Desta forma, os dados até então obtidos indicavam um mecanismo de ação antiinflamatória em adição a inibição de COX como, por exemplo, uma interferência sobre a ativação de leucócitos (PMN), ou alternativamente uma ativação metabólica da droga *in vivo*.

Teoricamente, uma droga que seqüestra radicais de oxigênio liberados por leucócitos, pode influenciar o metabolismo do ácido araquidônico em dois distintos sítios: 1) inibição da incorporação de oxigênio no endoperóxido PGG₂

causando inibição de síntese de prostaglandinas; 2) aumento da conversão de PGG_2 para PGH_2 pelo seqüestro do radical de oxigênio causando uma síntese estimulada de prostaglandinas a qual foi demonstrada *in vitro* por KUEHL¹²², em 1982.

Novamente com o trabalho de MAGNI¹³³, (1993), verificou-se que o nimesulide é um potente antiinflamatório com pequena ação sobre o metabolismo do ácido araquidônico em órgãos tais como estômago, rins e pulmões, normalmente afetados pelos NSAIDs. Assim, embora nimesulide possa inibir a formação de PGs em tecidos inflamados e normais, este efeito parece ser mais pronunciado em sítios inflamatórios.

Esta seletividade de ação pode ser explicada através dos trabalhos realizados recentemente, por dois grupos de pesquisadores, TAVARES et al.²⁰⁹, (1995) e VAGO et al.²¹⁴, (1995). Os resultados obtidos nestes estudos mostraram que o nimesulide, '*in vitro*', apresenta elevada seletividade sobre a atividade da COX-2, sem afetar a atividade da COX-1. Segundo VAGO et al.²¹⁴, (1995), a inibição da atividade da COX-2 ocorreu de modo concentração e tempo-dependentes.

TAVARES et al.²⁰⁹, (1995), por sua vez, verificaram que o nimesulide diferentemente inibiu a síntese de prostanóides em tecidos humanos tão bem quanto em ensaios *in vitro*, e foi menos potente que indometacina (INDO) sobre COX-1. Nimesulide reduziu o acúmulo de PGE_2 mais potentemente em incubados de leucócitos estimulados do que na mucosa gástrica. Em tecido gástrico, o nimesulide foi menos potente que INDO em aproximadamente 6-22 vezes. Nos ensaios '*in vitro*', nimesulide não inibiu a formação de PGE_2 pela COX-1, mas causou uma inibição de modo concentração-dependente na formação de PGE_2 pela COX-2.

Estes resultados explicam a relativa tolerabilidade do nimesulide em relação a mucosa gástrica, mas não justificam o desempenho do nimesulide como antiinflamatório '*in vivo*', visto que, outros efeitos tais com interferência em produtos oxigenados de leucócitos, histamina e PAF foram relatados em inúmeros outros trabalhos.

2.1.2 - EFEITOS DO NIMESULIDE SOBRE A FUNÇÃO LEUCOCITÁRIA E METABÓLITOS TÓXICOS DE OXIGÊNIO

Um aspecto histológico comum da inflamação aguda é o acúmulo de leucócitos PMN no sítio da reação (KUMAR et al.¹²³, 1994).

Leucócitos PMN e macrófagos formam um complexo sistema bioquímico, especializado na produção de moléculas quimicamente 'agressivas' e na síntese de radicais de oxigênio. Este sistema encontra-se inativo, sendo rapidamente ativado por vários tipos de estímulos, como produtos bacterianos, partículas opsonizadas, estresse, processo de injúria celular e mediadores da inflamação, como LTB₄ e fração do complemento C5 (WEISS²²⁶, 1989).

A estimulação destas células em tecidos inflamados é seguida pela liberação de várias substâncias inflamatórias tais como enzimas lisossomais (hidrolases ácidas e proteinases neutras), metabólitos do ácido araquidônico e derivados tóxicos de oxigênio. Cada um destes compostos tem sido considerado, em parte, responsável por alterações patológicas do sítio inflamatório (KUMAR et al.¹²³, 1994).

Muitos estudos vêm demonstrando que várias das características da inflamação podem, particularmente, ser mediadas através de radicais livres de oxigênio liberados de neutrófilos ativados (DELMAETRO⁶⁷, 1980 e FANTONE & WARD⁷¹, 1982).

Durante a estimulação de um fagócito (neutrófilos, eosinófilos e fagócitos mononucleares) ocorre uma alteração na maneira como utilizam o oxigênio: a taxa de captação de oxigênio aumenta bastante, e eles produzem grandes quantidades de ânions superóxido (O₂⁻) (BABIOR¹⁰, 1984).

Devido ao aumento brusco da captação de oxigênio, esta série de alterações é conhecida como "explosão respiratória" (HENSON & JOHNSTON¹⁰¹, 1987; WEISS²²⁶, 1989; ROSS¹⁸⁹, 1991).

Esta produção de radicais de oxigênio ao mesmo tempo apresenta um papel acelerador do processo inflamatório no sentido de expandir a lesão, agregar mais células e liberar mediadores para o local, como também apresenta um papel

no sentido de defesa, uma vez, que permite a formação de substâncias com atividade microbicida (MASON & CHIGNELL¹³⁸, 1982; GREENWALD⁹⁰, 1990).

Um radical livre é uma espécie química que possui um único elétron não pareado em uma órbita externa. O radical é extremamente reativo e instável, e entra em reações nas células com substâncias inorgânicas ou orgânicas principalmente moléculas básicas de membranas e ácidos nucleicos. Além disso, os radicais livres iniciam reações autocatalíticas pelas quais as moléculas com que reage são convertidas em radicais livres e assim propagam a cadeia de lesão (BAST et al.¹³, 1991).

A produção de ânions O_2^- e derivados oxigenados no sítio inflamatório pode resultar em destruição tecidual através de diferentes processos: a) citólise direta da célula; b) despolimerização do ácido hialurônico; c) inativação de inibidores séricos de proteases leucocíticas; d) geração de fatores quimiotáticos à qual aumenta a migração de PMN em direção à inflamação (KUMAR et al.¹²³, 1994).

Evidências sugerem que os ânions superóxido são capazes de destruir o EDRF (NO) e, portanto, o O_2^- tem um papel fundamental nos espasmos microvasculares (MONCADA et al.¹⁵², 1987).

Ânions superóxidos (CLELAND⁶¹, 1984) também foram implicados como geradores de peróxidos lipídicos, os quais são cofatores essenciais para a ativação da COX (LANDS & BYRNES¹²⁶, 1982). Assim, uma diminuição da taxa de produção de O_2^- pelos leucócitos PMN é seguida por uma redução da peroxidação dos lipídios da membrana plasmática e redução do metabolismo AA, um efeito bastante similar ao obtido pela administração de drogas inibidoras da prostaglandina sintetase (BEVILACQUA et al.²⁴, 1988).

Foi sugerido por RUFER et al.¹⁹², em 1982, que a atividade antiinflamatória dos compostos sulfonilídes poderia ser, em parte, explicada por esta propriedade de seqüestrar ('scavengers') radicais livres de oxigênio.

Desde então, pelo menos quatro grupos de pesquisadores independentes, se interessaram pelo assunto e vem demonstrando o efeito inibitório 'in vitro' do nimesulide na atividade oxidativa do neutrófilo (CAPSONI et al.⁴⁵, 1987; BEVILACQUA et al.²⁴, 1988; DALLEGRI et al.⁶⁴, 1990; ZIMMERLI et al.²³⁴, 1991).

Assim, a inibição da explosão respiratória do neutrófilo, à qual inicia a produção de metabólitos tóxicos de oxigênio, particularmente redução da geração

de ânions superóxido em neutrófilos ativados (CAPSONI et al.⁴⁵, 1987; BEVILACQUA et al.²⁴, 1988) e atuação direta como 'scavengers' sobre o ácido hipocloroso, gerado pela via mieloperoxidase durante o processo fagocítico (DALLEGRI et al.⁶⁴, 1990), vem sendo sugeridos como mecanismos adicionais da atividade antiinflamatória do nimesulide.

Entretanto, o efeito do nimesulide sobre a função dos PMNs parece ser muito complexo, visto que a droga é capaz de inibir a geração de ânion superóxido sem afetar a atividade fagocítica e a propriedade quimiotática. Vários mecanismos, a nível molecular, vem sendo propostos para explicar a atividade do nimesulide sobre a função do PMNs.

BEVILACQUA et al.²², (1991) verificaram em neutrófilos isolados de pacientes sadios que o nimesulide afeta a translocação da PKC do citosol para a membrana citoplasmática do PMN. A PKC, enzima citoplasmática cálcio-fosfolipídico-dependente quando ativada, por substâncias endógenas (diacilglicerídios) ou exógenas (acetado miristato forbol-PMA), sofre uma transformação metabólica (fosforilação) e adere à face interna da membrana plasmática dos PMN ativando a NADPH-oxidase. Esta última é responsável pela produção de radicais de oxigênio em leucócitos, sendo frequentemente encontrada na membrana citoplasmática e sua atividade é modulada pelo AMPc (MCPHAIL et al.¹⁴², 1984).

Dentro deste contexto, VERHOEVEN et al.²¹⁹, (1993) mostraram que nimesulide afeta a interação de NADPH-oxidase e seus cofatores na membrana citoplasmática do leucócito. Isto explica, ao menos em parte, o mecanismo pelo qual o nimesulide inibe a produção de radicais de oxigênio por todos os estímulos conhecidos.

MAFFEI-FACINO et al.¹³⁵, (1993) verificaram que o nimesulide e seus metabólitos apresentam atividade antioxidante direta sobre vários outros radicais livres (OH, RO, ROO). Os metabólitos hidroxilados M1 e M2 do nimesulide mostraram-se menos ativos como 'scavengers' de OH do que a droga original. Ao contrário, estes metabólitos fenólicos exibem máxima atividade 'scavenger' em modelos de peroxidação lipídica, onde predominam espécies reativas de oxigênio (RO, ROO). Estes achados sugerem que estes compostos interferem em distintos níveis da cadeia de reação e exercem, portanto, um efeito sinérgico na supressão

dos radicais responsáveis pela destruição celular durante o processo inflamatório, agudo e crônico. No entanto, o nimesulide exibe um efeito 'scavenger' OH *in vitro* em concentrações discretamente mais altas do que aquelas alcançadas no plasma ou no fluido sinovial.

CAPECCHI et al.⁴⁴, (1993) sugeriram que o efeito inibitório do nimesulide sobre a geração de radicais livres de PMNs talvez seja pela interferência direta com sistema receptor de adenosina sobre a membrana da célula. A adenosina (purina endógena) ao interagir com receptores (A1 e A2) de membrana nos PMN, é capaz de inibir sua função por um mecanismo que afeta a entrada de Ca^{+2} no interior da célula, de modo similar às drogas bloqueadoras de Ca^{+2} .

Recentemente, BEVILACQUA et al.²³, (1994) verificaram que o nimesulide inibe o metabolismo oxidativo de leucócitos PMN por interferir com a fosfodiesterase tipo IV (PDE IV) e, assim, elevar os níveis de AMPc.

É sabido que a inibição da explosão respiratória leucocitária, a redução na liberação de O_2^- (BECKER¹⁵, 1990) e mediadores inflamatórios, bem como, a inibição da quimiotaxia (HARVATH et al.⁹⁹, 1991) e degranulação podem ser alcançados pela administração de agentes que aumentem o AMPc leucocitário (NIELSON et al.¹⁶¹, 1990). Outras respostas fisiológicas pela elevação de AMPc em leucócitos polimorfonucleares incluem mobilização de Ca^{+2} (TECOMA et al.²¹⁰, 1986), metabolismo de fosfolipídio inositol, liberação de AA (TAKENAWA et al.²⁰⁷, 1986), colapso de microfilamentos e antagonismo da ação e organização induzidas por citocinas (NATHAN & SANCHEZ¹⁵⁸, 1990). Os níveis de AMPc em leucócitos polimorfonucleares são controlados pela AC (LAD et al.¹²⁶, 1984) e pela fosfodiesterase tipo IV (PDE IV), a principal enzima que degrada o AMPc nestas células (NIELSON et al.¹⁶¹, 1990).

A inibição da PDE IV eleva os níveis de AMPc citosólico que por sua vez, ativa a PKA, à qual fosforila um número de substratos promovendo a diminuição na liberação de O_2^- e a quimiotaxia provocada pelo nimesulide. Visto que AMPc e PDE são também importantes na regulação da produção de PAF em leucócitos PMNs (VERHOEVEN et al.¹²⁵, 1993) e em algumas das atividades dos basófilos, este mecanismo pode também explicar outras atividades relevantes da droga destacando-se, desta forma, um potencial clínico interessante como, por

exemplo a inibição da liberação de histamina em basófilos humanos (CASOLARO et al.¹²⁹, 1993) e do PAF em leucócitos PMN (VERHOEVEN et al.¹²⁵, 1993).

2.1.3 - EFEITO DO NIMESULIDE SOBRE O PAF

Outro importante aspecto da atividade do nimesulide repousa no efeito inibitório sobre a liberação de PAF, um potente mediador envolvido na amplificação da resposta inflamatória envolvendo leucócitos (BENVENISTE et al.¹⁷, 1972). A potente inibição da produção de PAF em basófilos humanos pelo nimesulide (VERHOEVEN et al.¹²⁵, 1993) pode, novamente, estar relacionado a inibição da PDE IV, já que metilxantinas e outros conhecidos inibidores da PDE IV também suprimem a liberação de PAF (ALONSO et al.⁵, 1982) e eicosanóides (PGD₂, leucotrienos C₄ e B₄), através da inibição de PLA₂ (UNDEM et al.²¹³, 1990).

VERHOEVEN et al.¹²⁵, (1993) verificaram a ação do nimesulide na liberação de PAF por neutrófilos ativados onde o nimesulide potently inibiu a síntese de PAF apresentando uma concentração inibitória 50% (IC₅₀) abaixo de 100µmol/L (aproximadamente 2x a concentração alcançada durante a terapia). Este estudo não indica o sítio de inibição da síntese de PAF, o qual poderia ser ou a nível de PLA₂ (responsável pela produção do precursor de PAF, a lisil-PAGF) ou a nível de acetil-transferase (catalisa a conversão de lisil-PaF em PAF).

Alguns estudos deveriam ser direcionados com objetivo de verificar se o nimesulide também inibe a síntese de PAF em outras células, já que este mediador participa de respostas alérgicas e ativação plaquetária (BRAQUET et al.³⁷, 1987)

2.1.4 - NIMESULIDE E A FUNÇÃO PLAQUETÁRIA

VIGDAHL & TUKEY²²¹, (1977) estudaram, pela primeira vez, a atividade do nimesulide sobre a agregação plaquetária *in vitro*. Utilizando amostras de sangue de voluntários sadios verificaram que o nimesulide inibiu, de modo concentração dependente, a agregação plaquetária induzida com 0.3mM de AA. A

IC₅₀ obtida para o NMSL foi de 8.5µM sendo mais potente que o AAS (IC₅₀ >1000µM).

Posteriormente, AUTERI et al.⁹, (1991), verificaram que a administração de NMSL (400mg/dia dividido em 2 doses) a pacientes em terapia de manutenção com warfarin, não modificou a atividade anticoagulante desta última, avaliado pelo tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial, tempo de sangramento e fibrinogênio. Porém, em alguns pacientes, os parâmetros hemocoagulantes tenderam a aumentar após a administração de NMSL, embora não tenham sido estatisticamente significantes. Este fenômeno não está claro, mas poderia ser devido a diferenças no metabolismo das duas drogas quando clinicamente combinadas.

Recentemente, CESERANI et al.⁵⁴, (1993) verificaram a atividade antiagregante do NMSL em ensaio *ex vivo* realizado em cobaias. NMSL consistentemente provou ser mais efetivo que ticlopidine e AAS na inibição da agregação plaquetária induzida por ADP, AA e Colágeno. A atividade do NMSL foi independente do agente agregante utilizado sendo melhor quando a droga foi administrada por 5 dias consecutivos. As doses que inibiram a agregação plaquetária após administrações repetidas foram mais baixas do que aquelas requeridas para inibir a inflamação e dor (VELO²¹⁸, 1991) e foram mais próximas às doses que inibem a febre.

ARAUJO & MATTOS-FILHO⁶, (1996) constataram que o nimesulide, em doses antiinflamatórias em ratos, não prolongou o tempo de sangramento acima dos valores de referência para a técnica empregada, embora os valores médios, após tratamento com nimesulide, tenham aumentado em 20% os valores basais, mostrando um perfil de interferência crescente até 72h, não sendo este efeito significativo em relação ao grupo controle. Neste estudo também foram avaliados a interferência do nimesulide sobre a contagem de plaquetas e tempo de coagulação e o mesmo pareceu não interferir com estes parâmetros.

A literatura, até o presente momento, não registra estudos sobre o mecanismo envolvido no efeito do nimesulide sobre a função qualitativa plaquetária, também não se verificou se no organismo humano este mecanismo se mantém em doses terapêuticas e quais são suas implicações no processo hemostático.

Dada a importância crescente que este fármaco vem assumindo nas várias especialidades médicas e odontológicas, bem como a forma de sua indicação clínica, é de grande interesse conhecer seus efeitos sobre valores de hemostasia e função plaquetária.

2.2 - EFEITO DO AAS SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E TEMPO DE SANGRAMENTO

O ácido acetilsalicílico (AAS) é, ao mesmo tempo, o mais antigo e o mais contemporâneo dos medicamentos. A salicina, extraída do salgueiro, e seu sal, o salicilato, já eram substâncias popularmente usadas contra a cefaléia e o reumatismo 3 mil anos antes de Cristo, na Mesopotâmia, berço da civilização. Em 1897, o químico Felix Hoffman sintetizou o ácido acetilsalicílico nos Laboratórios da Bayer, empresa alemã que patenteou o produto em 1899, chamando-o de Aspirina®, em homenagem a uma planta com propriedades semelhantes às do salgueiro: *spirea*. Nascia assim, um produto eficaz para a dor e a febre e também o medicamento mais econômico e universal da história.

Desde então, houve uma grande busca para o entendimento do mecanismo de ação do AAS. Destacam-se os trabalhos do inglês Jonh Vane e dos bioquímicos suecos, Sune Berstrom e Bengt I. Samuelsson (responsáveis pela elucidação da estrutura da prostaglandinas), que lhe valeram o Prêmio Nobel de medicina, em 1982. Os trabalhos foram conduzidos, no início da década de 1970, em um laboratório do Departamento de Farmacologia do Royal College of Surgeons da Inglaterra, em Londres, com pesquisadores chefiados por Jonh R. Vane (Ferreira⁷⁴, 1985).

Mais recentemente tem se tornado claro que além de inibir a COX o AAS e compostos relacionados, apresentam outros mecanismos de ação, tais como habilidade para romper interações nos limites da membrana celular (ABRAMSON & WEISSMANN¹, 1989; WEISSMANN²²⁶, 1991).

Talvez o aspecto mais persuasivo da hipótese de VANE foi a explicação dos efeitos colaterais observados clinicamente com o uso dos NSAIDs.

Um efeito que foi descoberto como colateral e indesejável em algumas situações quando do uso dos NSAIDs e, especialmente do AAS, é a interferência com a hemostasia. Pacientes que fizeram uso destas drogas podem sofrer, sangramentos (ou pequenas hemorragias) após extração dentária, cirurgias menores ou traumas (O'BRIEN¹⁶⁶, 1968; CLARK & FOUKE⁵⁹, 1976).

O AAS e os NSAIDs, de um modo geral, inibem a agregação plaquetária (MIELKE¹⁴⁴, 1982; RORAIUS et al.¹⁸⁶, 1989). Esta descoberta formou a base para o uso do AAS para prevenir acidentes vasculares cerebrais (AVC) e distúrbios tromboembólicos.

Nenhuma descoberta que tenha envolvido a hipótese de Vane tem tido maior impacto sobre a saúde pública quanto esta: milhões de pacientes de todo o mundo tomam AAS para tratar ou prevenir AVCs isquêmicos ou infartos atualmente.

O mecanismo de ação para o efeito do AAS sobre a função plaquetária não foi ainda inteiramente esclarecido.

Em 1970, AL-MOLDHRIRI et al.⁴, propuseram a primeira explicação para o mecanismo molecular da ação do AAS sobre plaquetas. ROTH et al.¹⁹¹, (1975), verificaram que o AAS acetila a COX plaquetária, em concentrações 10 - 100 vezes mais baixas que aquelas necessárias para acetilar outros tipos de proteínas, tais como albumina e hemoglobina (PINCKARD et al.¹⁷⁵, 1968; De FURIA et al.⁶⁶, 1974) e que o AAS pode inibir a enzima por atuar em um único sítio na molécula da COX. Posteriormente, ROTH & SIOK¹⁹⁰, (1978), verificaram que a acetilação da COX ocorre pela interação da molécula de AAS com um NH₂ terminal do aminoácido serina presente na enzima. Atualmente, sabe-se que o grupo acetil do AAS inibe a enzima por ligação covalente ao sítio ativo da COX, porção polipeptídica 72.000 mol (HACK et al.⁹¹, 1984). Esta inativação na plaqueta é irreversível. Em outras células, onde também ocorra esta atividade inibitória, a capacidade de sintetizar nova enzima (COX) leva à nova produção de PGs (CLARKE et al.⁶⁰, 1991).

A COX, por catalisar a conversão do AA em endoperóxidos cíclicos, é extremamente importante para a função plaquetária, uma vez que os endoperóxidos cíclicos podem induzir a agregação e a secreção, e ainda à formação de TXA₂, o mais potente indutor da agregação e secreção plaquetária apresentando também uma poderosa ação vasoconstritora (HAMBERG et al.⁹⁴, 1975).

Em células endoteliais a COX leva a formação de prostaciclina (PGI₂). Esta por sua vez, tem ação oposta a TXA₂, visto que é um inibidor da agregação e secreção plaquetária e promove ainda vasodilatação (MONCADA & KORBET¹⁵³, 1978; SCHAFER et al.¹⁹⁹, 1979 e MILLER & GORMAN¹⁴⁷, 1979).

Acredita-se que o balanço entre TXA_2 e PGI_2 deve ser mantido afim de permitir uma hemostasia normal. Embora ambos prostanóides sejam sensíveis à ação do AAS, o efeito inibitório sobre a produção de PGI_2 é menor ou dependente da dose (MASOTTI et al.¹³⁹, 1979; PRESTON et al.¹⁷⁶, 1981; FITZGERALD et al.⁷⁷, 1983).

Tem sido sugerido que a sensibilidade tecidual para a inibição da COX pelo AAS é altamente variável, e portanto, o AAS pode seletivamente alterar a capacidade para a síntese endógena de PGs. (BURCH et al.^{40,41}, 1978a e 1978b; JAFFE & WEKSLER¹⁰⁸, 1979).

Nos últimos anos, demonstrou-se que a acetilação da COX plaquetária e inibição da produção de TXA_2 são dose e tempo-dependentes (PARCIORETH & BLACK¹⁶⁹, 1980; CERLETTI et al.⁵³, 1986).

O efeito do AAS também já foi estudado em outros níveis. Verificou-se que o mesmo bloqueia a síntese de PGs plaquetárias e a reação de liberação, mas não influi significativamente na adesão e contração. Decorrente desses fatos, as plaquetas tratadas com AAS podem tornar-se viscosas e sofrer a primeira onda de agregação quando expostas aos vários agentes agregantes. Porém, não apresenta a segunda onda de agregação, pela dificuldade das plaquetas em secretar substâncias como ADP e produtos da síntese de PGs (WEISS et al.²²⁸, 1989; HOFFBRAND et al.¹⁰³, 1977).

O efeito do AAS na agregação secundária é mais aparente com a adrenalina do que com o ADP pois, com este último agente agregante, a produção da onda secundária dependerá de concentração adequada do ADP (ATAC et al.⁸, 1970).

Este efeito inibitório sobre a inibição da liberação plaquetária apresenta algumas características: a) inibição máxima é obtida em concentrações relativamente baixas ($<50\mu M$) de AAS *in vivo* ou *in vitro*; b) a inibição é permanente sobre a reação de liberação em plaquetas tratadas com AAS e este parâmetro é afetado pela meia vida plaquetária; c) a inibição é seletiva no sentido que o AAS parece ser mais efetivo em inibir a liberação induzida por alguns agentes (ADP e Colágeno) (O'BRIEN¹⁶⁶, 1968; ZUCKER & PETERSON²³⁶, 1968) que por outros (trombina) (ZUCKER & PETERSON²³⁶, 1968).

MARCUS¹³⁵, em 1969, já afirmava que os efeitos que o AAS promove sobre as plaquetas, podem ser devidos a alterações ocorridas na permeabilidade da membrana plaquetária desencadeadas por acetilação de certos elementos como proteínas receptoras na superfície da plaqueta.

Tendo em vista que as plaquetas *in vivo*, sob a ação do AAS, não agregam após exposição ao colágeno (KINLOUGH-RATHBONE et al.¹¹⁷, 1977), pois há uma certa dificuldade de interação do colágeno a seus receptores na superfície da membrana plaquetária, um tampão plaquetário bem formado, não ocorre. Com nenhuma consolidação do tampão hemostático não haverá nenhuma base na qual o coágulo de fibrina possa se formar e ser estável. Portanto, caso haja lesão no endotélio o sangramento se reiniciará.

Tais ações bioquímicas do AAS manifestam, clinicamente, alguns efeitos sobre a hemostasia em indivíduos normais (WEISS et al.²²⁵, 1968) e induzem prolongamentos severos no tempo de sangramento (TS) em hemofílicos (KANESHIRO et al.¹¹¹, 1969) e em pacientes portadores da doença de von Willebrand (GRALNICK et al.⁸⁶, 1986).

Segundo WEISS et al.²²⁵, (1968), quando ocorre prolongamento do TS em pacientes com taxas normais de fator anti-hemofílico globulinas (AHG, Fator VIII), este efeito passa a ser chamado de trombopatia.

A importância clínica das trombopatias é evidente nos tratamentos periodontais ou quando o paciente vai se submeter a cirurgias odontológicas, especialmente naqueles que apresentam história de distúrbios de hemostasia (tais como von Willebrand, hemofilia e outros) ou que estejam recebendo anticoagulantes (dicumarol, warfarin etc.). Nestes casos, marcadas elevações no TS e episódios hemorrágicos ocasionais ocorrem em pacientes que ingeriram AAS (CLARK & FOUKE⁵⁹, 1976).

A literatura registra vários estudos de prolongamentos do TS após a ingestão de AAS. BEAUMONT et al.¹⁴, (1956) foram os primeiros a demonstrar que o AAS prolonga o TS. WEISS et al.²²⁵, (1968), utilizando a técnica de IVY¹⁰⁸ (1935), mostraram que a média do TS em pacientes controles aumentou de 2.8 para 4.5 minutos após ingestão de AAS.

MIELKE et al.¹⁴⁶, (1969), demonstraram que a resposta do TS é completamente variável em indivíduos sob tratamento com AAS sendo que, em

algumas instâncias, o TS não é prolongado, ao passo que, em outras, há um prolongamento definido.

Em 1976, BICK & ADAMS²⁵, utilizando uma variação da técnica do 'template', mostraram que após a ingestão de AAS, a média do TS aumentou de 3.6 a 6.0 minutos, com limites normais entre 1.25 a 7.0 minutos.

MIELKE¹⁴⁵, (1983) comparando a influência da direção da incisão (horizontal ou vertical) e venostasia sobre o prolongamento do TS concluiu que, de acordo com a técnica empregada, a influência do AAS sobre o TS apresenta variações com a técnica empregada e, além disso, sugeriu que a ingestão de AAS produz modestos aumentos do TS em pacientes saudáveis e, portanto, não causa disfunções plaquetárias severas. Ainda em 1983, FITZGERALD et al.⁷⁷, verificaram que a inibição da agregação plaquetária sem interferência na produção de PGI₂ e prolongamento de TS é observada após doses de AAS inferiores a 50mg diárias em voluntários normais.

Visto que a COX plaquetária e a endotelial são igualmente sensíveis, *in vitro*, à inibição de doses únicas de AAS (HANLEY et al.⁹⁷, 1981) sugeriu-se que a seletividade biológica do AAS, para a formação de TXA₂ seria melhor explicada devido ao um efeito farmacocinético. Os achados de PEDERSEN & FITZGERALD¹⁷², (1984), relacionam diferenças bioquímicas do AAS e suas propriedades farmacocinéticas. Estes autores demonstraram que o AAS sofre hidrólise pré-sistêmica por esterases gastrintestinais, formando ácido salicílico, um inibidor fraco de COX. As plaquetas, passando através dos capilares intestinais durante a absorção do AAS, seriam expostas a altas concentrações de AAS, ainda não biotransformado. A administração de AAS, em baixas doses e de modo que seja gradualmente absorvida, poderia resultar em inibição cumulativa da COX plaquetária e permitir a biossíntese vascular de PGI₂ relativamente intacta, principalmente quando exposta ao ácido salicílico.

O mecanismo de seletividade da droga relacionado à dose pode ser explicado devido à diferença de sensibilidade *in vivo* da COX plaquetária e endotelial à acetilação pelo AAS, ou também pela irreversibilidade do bloqueio da COX plaquetária, oposta ao bloqueio reversível da mesma a nível de célula endotelial, formando as razões do uso do AAS em baixas doses. Talvez o mecanismo mais aceito explica pelo fato das plaquetas não possuírem núcleo e,

portanto, não sintetizam nova COX, ao passo que as células endoteliais sim (STEENING COMMITTEE OF THE PHYSICIAN'S HEALTHY STUDY RESEARCH GROUP²⁰⁴, 1989). Todas estas hipóteses visam uma inibição seletiva da síntese de TXA₂ plaquetário.

Trabalhos recentes com AAS visando detectar alterações na hemostasia, com modificações de dose e esquemas de tratamento, foram realizados por vários grupos de pesquisadores e, apesar da variabilidade nas respostas, as alterações na hemostasia e na função plaquetária foram verificadas (FIORE et al.⁷⁶, 1990; RYAN & HAKENKAMP¹⁹³, 1990; SAMRA et al.¹⁹⁵, 1991).

Em 1990, FIORE et al.⁷⁶, verificaram que a média de aumento no TS após ingestão de doses únicas de AAS (325mg-3.900mg) ocorreu entre 4 a 12h independentemente da dose administrada, com retorno ao basal 48h após. Alguns dos pacientes tratados mostraram-se hiperresponsivos com prolongamentos acima da média (5.9 min) quando medidos 7h após administração de uma única dose de 325mg.

BOSE et al.³⁵, (1994) verificaram que a administração crônica de AAS em voluntários sadios nas doses de 50, 75 e 100mg promoveram reduções na adesividade plaquetária, prolongamentos no TS e não alteraram a contagem de plaquetas ou o tempo de coagulação.

O AAS também apresenta outros efeitos sobre a hemostasia como, por exemplo, interferir com a liberação do ativador do plasminogênio vascular induzido pela oclusão venosa e isto pode ser devido à inibição da produção de PGI₂ (VERSTRAETE & VERMYLEN²²⁰, 1989). Outro efeito também observado pelo AAS é a acetilação do fibrinogênio fator importante na agregação plaquetária (BJORNSSON et al.²⁸, 1989).

Muitos efeitos do AAS sobre a função plaquetária ainda estão sendo estabelecidos. As pesquisas estão avançando, principalmente após os trabalhos de XIE et al.²³³, (1991), que verificaram diferentes isoformas de COX, cada qual presente em um tipo celular e ativada por diferentes tipos de estímulo.

2.3 - PLAQUETAS E A HEMOSTASIA

Nos últimos 30 anos, o grande interesse sobre hemostasia e trombose levou a um rápido acúmulo de novas informações sobre os aspectos fundamentais da atividade plaquetária.

Nesta parte da revisão serão enfocados os mecanismos da hemostasia fisiológica direta ou indiretamente relacionados à atividade plaquetária e os processos que irão servir como base para o entendimento e discussão deste trabalho.

2.3.1 - MORFOLOGIA E FUNÇÃO PLAQUETÁRIA

Plaquetas ou trombócitos são fragmentos discóides de citoplasma de megacariócitos da medula, constituindo-se em elementos figurados do sangue que atuam como um dos fatores da hemostasia (WRIGHT²³², 1906).

Apresentam um diâmetro de 2μ e são envolvidas por uma membrana citoplasmática formada por duas camadas externas de 2 nm, constituídas por proteínas, e uma camada interna como camada bimolecular lipídica (fosfolípidios). Logo abaixo apresentam microtúbulos que acredita-se serem responsáveis pela manutenção de sua forma (ZUCKER²³⁵, 1980).

Sendo elementos anucleados, apresentam o DNA dissolvido no citoplasma e com pequena habilidade para sintetizar proteínas. Porém, demonstram intensa capacidade metabólica, realizada por enzimas do citoplasma e organelas como as mitocôndrias que produzem e armazenam a energia para a realização das suas funções plaquetárias (ZUCKER²³⁵, 1980).

A observação da ultraestrutura da plaqueta mostra ainda dois sistemas: sistema canalicular aberto e sistema tubular denso. O primeiro é formado por múltiplas invaginações que tem por finalidade colocar em contato o meio exterior da plaqueta com o meio interno. Por estes canais, durante a ativação plaquetária, dá-se a secreção de seus grânulos. O

sistema tubular denso, sem comunicação com o exterior, apresenta depósitos de cálcio e permite a síntese de PGs (ZUCKER²³⁵, 1980).

As plaquetas contém organelas distribuídas ao acaso e grânulos grandes de três tipos: densos, alfa e lisossomais (HOLMSEN & WEISS¹⁰⁵, 1979).

O conteúdo de cada grânulo indica em que estágio da ativação da plaqueta o mesmo será liberado. Assim, os grânulos densos contém adenosina 5'-difosfato (ADP), que pode iniciar a ativação plaquetária, e sua secreção induz à agregação. Estes grânulos contém ainda ATP, serotonina, íons cálcio (Ca^{+2}) e pirofosfato (HOLMSEN & WEISS¹⁰⁵, 1979).

Os grânulos alfa possuem proteínas vindas do plasma (fibrinogênio, FvW e fator V, albumina, IgG, fibronectina e cininogênio) além de proteínas e proteínas que são encontradas somente dentro destes grânulos como o fator de crescimento derivado de plaquetas (FCDP), que estimula a proliferação de células de origem mesenquimal, como a da musculatura lisa, e está envolvido na reparação do dano vascular; contém também fator plaquetário 4 (FP4) que apresenta a atividade neutralizante da heparina (VERSTRAETE & VERMYLEN²²⁰, 1989). Por último, os grânulos contém ainda a trombospondina que é uma das adesinas importante na adesão e agregação (KAO et al.¹¹², 1986), e a β -tromboglobulina, fatores que participam da cascata da coagulação (KAPLAN¹¹³, 1980).

Nos grânulos lisossomais encontram-se algumas hidrolases ácidas como a β -glucuronidase e β -galactosidase (HOLMSEN & WEISS¹⁰⁵, 1979).

Normalmente, as plaquetas possuem meia vida de circulação entre 7 a 10 dias, em número que varia de 200 a 400 mil/ μ l, quando então, são removidas ou por engolfamento realizado pelo sistema retículo endotelial ou incorporados a " plugs " (rolha ou tampão) plaquetários (HARKER⁹⁷, 1978).

As plaquetas sangüíneas são essenciais para hemostase normal, apresentando duas funções diferentes na interrupção de hemorragia: a hemostática e a tromboplástica. A função hemostática é realizada por

oclusão física das aberturas em vasos sangüíneos pela massa de plaquetas, ao passo que a função tromboplástica é feita pela participação de constituintes químicos das plaquetas (WILLIAMS et al.²²⁹, 1990).

2.3.2 - ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA E O FENÔMENO DE AGREGAÇÃO

Imediatamente após a lesão do vaso sangüíneo, as plaquetas aderem ao tecido conjuntivo estreitando a corrente sangüínea. Em poucos minutos, um tampão plaquetário se forma, ocluindo o vaso e cessando a perda sangüínea. No início, as plaquetas mantêm sua integridade celular que, posteriormente, devido à liberação e secreção de seus constituintes e à formação de fibrina, é substituída pelo trombo (ROSKAM et al.¹⁸⁸, 1959).

A resposta plaquetária, durante a ativação, pode ser reconhecida em vários eventos progressivos e superpostos: alteração da forma ("shape change"), adesão, agregação, formação de produtos lipídicos, secreção, elaboração de atividade coagulante e contração (ZUCKER²³⁵, 1980).

A forma discóide das plaquetas é desfavorável ao contato recíproco e ao desenvolvimento de força de coesão suficiente para induzir a agregação destas células. As plaquetas de forma discóide passam à forma esférica com muitos pseudópodos, segundos após a estimulação. Os grânulos se dirigem para o centro, circundados pelos microtúbulos que irão mais tarde permitir a expulsão do conteúdo destes grânulos ao meio extracelular. Estas alterações facilitam a adesão e a agregação (KINLOUGH-RATHBONE et al.¹¹⁸, 1983).

O processo de adesão plaquetária é decorrente da interação de glicoproteínas (GP) (GPIa, complexo GPIIb/IIIa e GPIV, GPIb ligada ao fator de von Willebrand) da superfície com elementos do tecido conectivo do subendotélio; colágeno tipo I e III e microfibrilas (JAFFE & DEYKIN¹⁰⁹, 1974; LEGRAND et al.¹³⁰, 1980; SHADLE et al.²⁰¹, 1984; NIEUWENHUIS et al.¹⁶², 1985; SANTORO¹⁹⁸, 1986).

Uma vez exposta ao colágeno e a trombina formada, inicia-se na plaqueta uma série de reações que levam à agregação, compreendendo desde o recrutamento de novas plaquetas que se ligam a estas formas ativadas, reações de liberação do ADP dos grânulos densos, até a secreção dos grânulos alfa e ativação do complexo de fosfolipases da membrana, levando à produção de tromboxano A₂ (TXA₂) e fator ativador plaquetário (PAF) (CASTILHO & BASTIDA⁵¹, 1988).

A agregação requer atividade do metabolismo plaquetário desencadeado por estimulação através de um ou mais agonistas específicos (WILLIAMS et al.²²⁹, 1990).

Em virtude da dificuldade da realização de estudos 'in vivo' sobre a agregação de plaquetas, a maioria dos estudos tem sido feita 'in vitro', utilizando-se plasma rico em plaquetas (PRP) preparado de sangue citratado. Este PRP é colocado em um fotômetro especial, denominado agregômetro. Neste aparelho o PRP é submetido ao agonista sob agitação e à temperatura de 37°C. À medida em que se formam os agregados, e a luz absorvida pela turvação passa em maior quantidade (COLLER⁶², 1979).

Imediatamente após a adição de um determinado agonista, ocorre uma diminuição temporária na transmissão de luz seguida por um aumento da transmitância de luz. O primeiro evento corresponde ao "shape change" e o segundo corresponde à agregação. São descritas duas ondas de agregação. A primeira onda, ou agregação primária, é uma consequência direta do estímulo do agonista; é reversível e não está associada à secreção plaquetária. A plaqueta ativada pode soltar-se, retomar sua forma discóide e perder toda a sua afinidade pelas demais plaquetas, de maneira que o agregado pode desfazer-se espontaneamente (COLLER⁶², 1979).

A retomada da plaqueta à sua forma discóide dependerá da intensidade da estimulação exercida pelo agente indutor. Se a estimulação for de intensidade e duração suficientemente grande, uma elevada quantidade de Ca⁺² será liberada do sistema tubular denso, a fosfolipase (PL) será ativada e desencadeará a liberação do AA, o qual se transformará em TXA₂ na plaqueta (VERSTRAETE & VERMYLEN²²⁰, 1989).

Portanto, para que haja desativação, é necessário que os íons Ca^{+2} que estavam livres sejam novamente armazenados, através de mecanismos dependentes de PGI_2 (BLOCKMANS et al.²⁹, 1995).

A segunda onda, ou agregação secundária, corresponde a formação de grandes e irreversíveis agregados acompanhados de secreção plaquetária de ADP e TXA_2 . Uma parte do TXA_2 deixa a plaqueta e induz a mobilização de cálcio em outras células, provocando um efeito em cascata. Além disso, o TXA_2 ao se ligar à superfície externa da membrana da plaqueta, em seu sítio receptor, provoca quase imediatamente a secreção do conteúdo dos grânulos intraplaquetários (COLMAN⁶³, 1986).

Diversos agonistas como ADP, trombina, colágeno, PAF, AA, adrenalina são capazes de se ligar às plaquetas e iniciar uma série de reações bioquímicas que levam à formação de agregados plaquetários e secreção granular (O'BRIEN¹⁶⁵, 1963; WILNER et al.²³⁰, 1968; CHESNEY et al.⁵⁶, 1982; ARMSTRONG et al.⁷, 1983).

Estes agonistas são classificados em fortes e fracos dependendo da capacidade destes em estimular a secreção de grânulos plaquetários na ausência ou somente na presença de agregação plaquetária, respectivamente (CHARO et al.⁵⁵, 1977).

A adenosina 5'-difosfato (ADP) foi o primeiro agonista plaquetário descrito (GAARDEN et al.⁷⁹, 1961) capaz de induzir agregação plaquetária *in vitro* (BORN³², 1962).

O ADP é confinado em três compartimentos: no citosol, ligado a F-actin e nos grânulos densos. Uma vez liberado de endotélio destruído ou outro tecido, ou secretado pelo estímulo prévio de plaquetas, induz agregação pela reação a receptores próprios externamente localizados na membrana plaquetária, em concentração micromolar (BORN & FEINBERG³³, 1975; COLMAN⁶³, 1986; JEFFERSON et al.¹¹⁰, 1988).

O ADP pode se ligar em pelo menos 2 e, possivelmente, 3 diferentes sítios funcionais: um envolvido na inibição de adenilciclase (AC) estimulado por prostaciclina (PGI_2) (BORN³², 1962); outro, envolvido no 'shape change' (ADLER & HANDIN², 1979) e o terceiro responsável pela exposição do receptor de fibrinogênio (BORN & FEINBERG³³, 1975;

JEFFERSON et al.¹¹⁰, 1988). Sua habilidade para induzir secreção depende da capacidade da plaqueta em sintetizar PGs sendo inibida por drogas como aspirina e indometacina (CHARO et al.⁵⁵, 1977).

Conforme a concentração empregada, a agregação plaquetária induzida por ADP pode ser reversível, ocorrendo em duas fases, ou irreversível (MACMILLAN¹³¹, 1966; MILLS et al.¹⁴⁸, 1968). A agregação primária induzida pelo ADP é sempre reversível. Quando a reação bifásica é observada, a segunda fase é acompanhada de liberação de ADP endógeno, serotonina e FP4 (NIEWIAROWSKI et al.¹⁶³, 1968). A ligação do ADP ao seu receptor também inicia a atividade da fosfolipase A₂ (PLA₂), levando a formação de TXA₂. A inibição da síntese de TXA₂ previne a onda de recrutamento (2ª onda) de agregação induzida pelo ADP, mas não a transformação interna inicial (1ª onda) (GERRARD & WHILE⁸³, 1978).

A agregação provocada por ADP é inibida pelo bloqueio da glicólise e da fosforilação oxidativa, mas não por bloqueio isolado de um desses (WILLIAN et al.²²⁹, 1990). A inibição também ocorre por ação de agonistas de adenosina e por diversos compostos que aumentem a concentração de AMPc na plaqueta (BORN³⁴, 1965).

A adrenalina (ADR), cuja a ação como agonista fraco foi descoberta por O'BRIEN¹⁶⁵, (1963) ativa as plaquetas por atuação em α_2 -adrenoceptores sobre a superfície das mesmas (GRANT & SCRUTTON⁸⁷, 1979). O número elevado de adrenoceptores- α_2 na superfície de uma mesma plaqueta (NEWMAN et al.¹⁶⁰, 1978) são acoplados ao monofosfato de guanosina (GMP) ligado à proteína G, que inibe a AC (KIM & NEUBIG¹¹⁶, 1987) produzindo diminuição da formação do AMPc plaquetário. A ADR, em um amplo intervalo de concentração, provoca agregação bifásica. A primeira onda é reversível e é mediada por ADP. A habilidade da ADR em iniciar a agregação primária na ausência de outros agonistas tal como ADP, permanece controversa (PEERSCHKE¹⁷³, 1982). A concentração de ADR necessária para produzir a agregação plaquetária *in vitro* é maior do que aquela normalmente encontrada na circulação. No entanto, a ADR potencializa a atividade de outros agonistas, *in vitro*, em concentrações bem abaixo daquelas necessárias para induzir agregação. Postula-se que a

função da ADR 'in vivo' seja exercer sinergismo com outros agonistas modulando, assim, a atividade da plaqueta (NEWMAN et al.¹⁶⁰, 1978). A segunda onda irreversível é mediada por e dependente da liberação de grânulos densos de ADP endógeno e da síntese de TXA₂. O AAS inibe a onda contrátil plaquetária e a agregação secundária à adrenalina (GERRARD & WHILE⁸³, 1978).

Exemplos de agonistas fortes são o colágeno e a trombina (WILNER et al.²³⁰, 1968; HOLSEM¹⁰⁴, 1972). O colágeno induz a uma onda simples de agregação e coincide com a secreção plaquetária a qual é mediada por produtos secretados pelas plaquetas (CHARO et al.⁵⁵, 1977). Portanto, plaquetas ligadas a colágeno fibrilar sintetizam e liberam endoperóxidos (PGG₂ e PGH₂), TXA₂ e secretam ADP, os quais servem como agonistas plaquetários (CHARO et al.⁵⁵, 1977). Em baixas concentrações de colágeno, a ativação plaquetária pode ser inibida por drogas tais como AAS que previnem a síntese de PGs (ROTH et al.¹⁹¹, 1975) e, em concentrações elevadas, ocorre ativação plaquetária mesmo na presença destas drogas, indicando que a ativação da agregação plaquetária induzida pelo colágeno pode também ocorrer por uma via independente da liberação de TXA₂ (CHARO et al.⁵⁵, 1977).

Os metabólitos do AA participam intensamente da ativação plaquetária. A interação entre o AA e as plaquetas foi inicialmente demonstrada em 1971 por SMITH & WILLIS²⁰³. O AA encontra-se esterificado na membrana da plaqueta e pode ser liberado pela clivagem de duas vias enzimáticas (BELL et al.¹⁶, 1979).

Após a estimulação plaquetária, o fosfatidilinositol é rapidamente clivado pela fosfolipase C (PLC) gerando o fosfato de inositol e diacilglicerol (DAG) (RITTENHOUSE-SIMMONS¹⁸⁴, 1979). O AA é então removido do DAG pela atividade da DAG-lipase e pela monoacilglicerol lipase (BELL et al.¹⁶, 1979). No entanto, a grande liberação do AA é derivada da fosfatidilcolina e do fosfatidiletanolamina através da ação da fosfolipase A₂ (PURDON & SMITH¹⁷⁸, 1985; BALLOU & CHEUNG¹², 1983).

O AA liberado é convertido pela COX em endoperóxidos (PGG₂ e PGH₂) e subseqüentemente a TXA₂ pela enzima tromboxano sintetase (HAMMARSTROM & FALARADEAU⁹⁵, 1977).

A TXA₂ e os endoperóxidos atuam como potentes agonistas plaquetários e vasoconstritores (HAMBERG et al.^{92,93}, 1974a,b). A TXA₂, uma vez se ligando a seu receptor, mobiliza cálcio de vários locais de armazenamento intracelulares e diminui o AMPc plaquetário provavelmente através da inibição da AC da membrana pelo cálcio mobilizado (GORMAN⁸⁵, 1979). Assim, o TXA₂ não é responsável pela ativação inicial das plaquetas, mas sim, pelo resultado dessa ativação.

Um receptor para PGH₂/TXA₂ foi identificado em preparações de membrana plaquetária, sugerindo que ambos agonistas atuariam no mesmo receptor explicando, desta forma, a ausência de efeito clínico dos inibidores de tromboxano sintetase (NEEDLEMAN et al.¹⁵⁹, 1977). A adição de AA às plaquetas leva à geração de TXA₂ pelo fornecimento de substrato para a COX. A agregação ao AA é assim inibida pelos inibidores da COX.

Em síntese, a agregação secundária induzida pelo ADP, ADR e colágeno (em baixas concentrações) requer a conversão do AA à TXA₂ sendo bloqueada pelos inibidores de COX e da tromboxano sintetase.

No entanto, a agregação plaquetária e a liberação do conteúdo de grânulos densos e alfa, não são apenas dependentes da síntese de TXA₂. Altas doses de trombina, ionóforos catiônicos bivalentes e colágenos concentrados podem induzir a fase secundária da agregação e a reação de liberação na presença de inibidores da síntese de TXA₂ (KINLOUGH-RATHBONE et al.¹¹⁷, 1977). A agregação e liberação independentes do AA podem envolver outros produtos da atividade da PLC tais como ácido fosfatídico. Estes produtos podem, *per si*, mobilizar o cálcio intracelular e desencadear a agregação e a liberação do AA por via independente (GERRARD & WHILE⁸³, 1978).

O acetil-gliceril-éter-fosforilcolina (PAF) é um lipídio biologicamente ativo, que não se encontra pré-formado ou armazenado. O termo fator ativador de plaqueta foi designado por BENVENISTE et al.¹⁷, (1972) para descrever a atividade biológica de uma substância liberada de

basófilos de coelhos sensibilizados e estimulados por antígenos específicos. O PAF induz agregação plaquetária e a reação de liberação dos grânulos densos e dos grânulos alfa, somente na presença de Ca^{++} e metabolismo energético, sendo independente do ADP e dos metabólitos do AA (BRAQUET et al.³⁷, 1987). Na plaqueta a liberação de PAF pode ser induzida por ação da trombina ou colágeno através da estimulação da PLA_2 que libera um precursor dos fosfolipídios derivados da fosfatidilcolina de membranas plaquetárias, o 2-liso-PAF. Este sofre uma acetilação pela acetil-transferase, dando origem ao PAF. Em plasma humano citratado, o PAF produz uma agregação bifásica, similar ao ADP e ADR; a segunda fase envolve a liberação de TXA_2 , e pode ser inibida através do uso de indometacina ou AAS. O PAF também é um importante mediador da resposta inflamatória e alérgica, e pode ser sintetizado por uma variedade de células que incluem neutrófilos, eosinófilos, mastócitos entre outras (HANASHAM⁹⁶, 1986).

CHIGNARD et al.⁵⁷, (1980) demonstraram que o PAF é liberado de plaquetas estimuladas com o ionóforo A23187, trombina, ou colágeno e sugerem que o PAF medeia a terceira via da agregação. O primeiro envolve o ADP e o segundo os endoperóxidos e TXA_2 . Isto foi proposto porque nem a produção e nem o efeito são bloqueados pela aspirina ou por seqüestradores de ADP. Atualmente, este termo terceira via foi abolido e verificou-se que o PAF pode se ligar a receptores acoplados à proteína G e PLC como os agonistas trombina e colágeno. Além disso, o PAF estimula a atividade da guanosina trifosfatase (GTPase) em membranas de plaquetas de forma dependente da dose (HWANG et al.¹⁰⁶, 1986).

Outros agonistas plaquetários tais como a serotonina e a trombina não foram abordados nesta revisão, pois não apresentaram relevância para os ensaios realizados nesta pesquisa.

2.3.3 - MECANISMOS DE TRANSDUÇÃO - MODULAÇÃO DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA

A combinação dos agonistas a sítios receptores específicos na superfície da membrana da plaqueta desencadeia a formação de substâncias intermediárias que causam sua ativação. Geralmente, estes receptores ativados interagem com proteínas de membrana que requerem GTP, as proteínas G (CASSEY & GILMAN⁵⁰, 1988). Estas enzimas atuam como transdutores entre certos receptores e enzimas efetoras ou canais iônicos (GILMAN⁸⁴, 1984).

A quebra dos fosfolípidos de inositol da membrana plaquetária, com produção de DAG e inositol solúvel 1,4,5-trifosfato (IP₃) é considerada o mecanismo chave de transdução extracelular de sinais informativos para dentro da célula com o propósito de desencadear a ativação plaquetária (BILLAH & LAPETINA²⁶, 1982).

A hidrólise de um fosfolípido de membrana o 4, 5 - bifosfato de fosfatidilinositol, pela enzima PLC, gera DAG e IP₃. Tanto o DAG quanto o IP₃ atuam como segundos mensageiros, sinergicamente produzindo respostas celulares da ativação plaquetária (BLOCKAMNS et al.²⁹, 1995).

O DAG ativa a enzima proteinaquinase C (PKC), a qual está envolvida com ambos agregação e secreção (KISHIMOTO et al.¹¹⁹, 1980).

O IP₃ age como ionóforo de cálcio, fazendo com que a concentração de Ca²⁺ se eleve dentro do citosol, tanto a partir do sistema tubular denso quanto a partir do exterior da plaqueta. Este acúmulo intracelular de Ca²⁺ pelo IP₃ pode ativar a PLA₂ e, por sua vez, estimular o metabolismo de AA induzindo a secreção plaquetária. Portanto, a secreção induzida por IP₃, mas não o aumento do Ca²⁺ citosólico é inibido pelo AAS (BRASS & JOSEPH³⁸, 1985).

A mobilização interna de Ca²⁺ é, provavelmente, o passo final da agregação e liberação plaquetária. Ligando-se à sua proteína carreadora, a calmodulina, forma um complexo que ativa quinases produzindo fosforilação da miosina plaquetária, desencadeando a contração e iniciando

a secreção. A elevação do Ca^{2+} intracelular livre também facilita a ativação de enzimas cálcio dependentes tais com a PKC e PLA_2 (BRASS & JOSEPH³⁸, 1985).

Assim, com todos estes mecanismo de transdução, a ativação plaquetária pode ser modulada em vários níveis, ou seja, como na interação do agonista à membrana plaquetária, na liberação de TXA_2 ou na translocação do Ca^{2+} . Entretanto, de modo geral, as respostas plaquetárias são inibidas pela elevação dos níveis intracelulares de AMPc (BLOCKMANS et al.²⁹, 1995).

O AMPc é formado pela ação da AC sobre a adenosina trifosfato (ATP) (GRANT & COLMAN⁸⁸, 1984). Aumentos na concentração de AMPc resultam de estimulação da AC por PGs, tais como, PGD_2 , PGE_1 e PGI_2 (MUSTARD et al.¹⁵⁶, 1980), de baixas concentrações de adenosina ou da inibição da fosfodiesterase responsável pela degradação do AMPc. Atualmente, aceita-se que os efeitos do AMPc devem-se, principalmente, à fosforilação de proteínas, particularmente a proteína quinase A (PKA), sendo esta a responsável indireta na diminuição da sensibilidade das plaquetas ao estímulo ativador (KROLL & SHAFER¹²¹, 1989). Sugere-se que possa estar envolvido a ativação de uma bomba de Ca^{2+} que reduz a concentração do mesmo no citosol plaquetário, inibindo assim a ativação plaquetária. Os efeitos do AMPc podem ser ainda demonstrados em vários pontos do metabolismo plaquetário. A elevação de AMPc inibe a geração de DAG e IP_3 , promove a inibição da PLC e inibição da ativação da miosina de cadeia leve, altera os receptores de FvW e fibrinogênio, e diminui a afinidade da trombina pelo seu sitio de ligação à plaqueta (FUJIMOTO et al.⁷⁸, 1982; FEINSTEIN et al.⁷², 1983).

O GMPc é outro segundo mensageiro capaz de inibir a agregação plaquetária. Este é formado pela atividade lítica da guanilato ciclase sobre o GTP (WALDMAN et al.²²², 1987). O mecanismo de inibição da agregação plaquetária pela elevação dos níveis de GMPc ainda não está bem esclarecido, mas tem sido sugerido que pode ocorrer pela inibição da PLC (WILLIAN al.²²⁹, 1990).

O óxido nítrico (NO) (PALMER et al.¹⁷¹, 1987, RADOMSKI et al.¹⁷⁹, 1987) é um potente inibidor da agregação plaquetária porque justamente ativa a guanilatocilase que por sua vez eleva os níveis de GMPc. Ressalta-se que o NO pode, muitas vezes, ser sintetizado pela própria plaqueta (RADOMSKI et al.¹⁸⁰, 1990).

2.3.4 - HEMOSTASIA PRIMÁRIA E ANORMALIDADES QUALITATIVAS NA FUNÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDAS POR DROGAS

Entende-se por hemostasia, um processo destinado a manter a integridade da árvore vascular, evitando e corrigindo as rupturas e as obstruções de seus segmentos. Envolve um grande número de interações complexas entre os componentes sangüíneos e a parede vascular (CASTILHO & BASTIDA⁵¹, 1988).

Segundo estes mesmos autores, pode-se subdividir a hemostasia em 4 fases: 1) vasoconstrição localizada a nível da área afetada; 2) formação de um agregado ou trombo de plaquetas sobre a superfície vascular lesada; 3) formação da fibrina que reforça o trombo plaquetário e 4) eliminação dos depósitos de fibrina-fibrinólise.

A hemostasia primária compreende a combinação de uma vasoconstrição reflexa e formação do 'plug' plaquetário.

A vasoconstrição inicial é o resultado de uma estimulação, por um mecanismo reflexo de terminações simpáticas (α -adrenérgicas), na musculatura lisa da parede do vaso (CLARCK et al.⁵⁸, 1989). Este fenômeno, que dura aproximadamente 30 seg, tem como finalidade obter a estase na circulação e assim favorecer a formação do trombo, o coágulo plaquetário. A vasoconstrição reflexa inicial, muito breve, é substituída por uma vasoconstrição secundária produzida provavelmente por adrenalina, serotonina (ZUCKER²³⁵, 1980), TXA₂ (HAMBERG et al.⁹⁴, 1975), e outras substâncias liberadas pelas plaquetas, uma vez que se acham aderidas no tecido conjuntivo subendotelial.

Esta vasoconstrição inicial, acrescida do fino, flexível e frouxo tampão plaquetário, faz com que o extravasamento de sangue se torne mais lento, e o tempo é ganho para a elaboração mais demorada do rijo e resistente reforço da rede de fibrina que, eventualmente, sela o defeito vascular (SANFORD et al.¹⁹⁶, 1990).

Na segunda fase da hemostasia o coágulo de fibrina, providencia um esqueleto para reorganizar o crescimento e desenvolvimento da célula endotelial e libera os produtos de digestão de fibrina. A ativação de plasminogênio estimula a angiogênese e renova a parede vascular, enquanto a fibrinólise e colagenase são responsáveis pela remoção dos fragmentos (CASTILHO & BASTIDA⁵¹, 1988).

Além de ocluírem mecanicamente as aberturas em vasos sangüíneos e liberarem substâncias químicas envolvidas com a coagulação, as plaquetas fornecem superfície que promove a interação de fatores de coagulação na geração de trombina, levando à formação de fibrina e coágulos (CASTILHO & BASTIDA⁵¹, 1988).

Atualmente, um importante papel tem sido atribuído às plaquetas, o de participação ativa na reparação celular através da secreção de determinadas substâncias, tal como o FCDP (VERSTRAETE & VERMYLEN²²⁰, 1989).

Embora uma cuidadosa distinção entre a hemostasia primária e a coagulação seja fracamente artificial, um teste para hemostasia primária é clinicamente utilizado no diagnóstico de desordens da hemostasia como um todo. A propriedade desejável deste teste é a capacidade de dar indicação da função plaquetária sem interferência do sistema de coagulação.

A função plaquetária pode ser avaliada laboratorialmente através de exames preliminares tais como tempo de sangramento, retração de coágulo e a contagem de plaquetas (WILLIAN et al.²²⁹, 1990).

A prova do tempo de sangramento (TS) é considerada como um dos melhores métodos para determinar a função plaquetária *in vivo*, (O'BRIEN¹⁶⁴, 1951). O TS é definido como o período de tempo que transcorre entre uma primeira incisão pequena até o momento em que se detém o fluxo sangüíneo. O TS mede a interação da plaqueta com a parede do vaso

sanguíneo e a subsequente formação do 'plug' hemostático; portanto, é um teste que mede os estágios iniciais da hemostasia (GERRARD et al.⁸², 1989)

O TS foi introduzido em 1910, por DUKE⁶⁸ onde o lóbulo da orelha era picado e o sangue absorvido com papel de filtro a cada 30 segundos até que o sangramento cessasse. É um teste de uso extenso e popular para explorar a hemostasia primária. O uso mais comum deste teste é como screening pré-operatório de desordens plaquetárias potencialmente perigosas. Porque cirurgias impõem maiores mudanças para hemostasia, as quais podem ser fatais em casos de deficiência hemostáticas, procede-se ao screening pré-operatório no reconhecimento de sangramentos severos. De fato, o risco de sangramento na presença de plaquetas alteradas não está relacionado com alterações dos testes de coagulação comumente utilizados tais como tempo de protrombina e tempo de tromboplastina ativado. Uma vez que o TS é prolongado em defeitos plaquetários congênitos ou adquiridos, este teste tem sido empregado por anos como screening para tendência hemorrágica. Porém, dúvidas acerca do real valor do TS, com respeito a sangramento em cirurgias, vem sendo levantadas por alguns autores (RODGERS & LEVIN¹⁸⁵, 1990).

No sentido de melhorar o teste de DUKE⁶⁸, modificações tem sido introduzidas, resultando em vários métodos de determinação do TS.

Em 1935, IVY¹⁰⁷ introduziu uma variação na qual uma pressão sangüínea (40mmHg) foi introduzida em volta do braço para preencher os capilares e limitar a variabilidade do tônus capilar. Uma picada realizada da mesma forma da técnica de DUKE⁶⁸ era feita no antebraço e o TS foi medido da primeira de três 'puncturas' que sangrava.

Nos anos subsequentes, muitos instrumentos foram desenvolvidos para produzir várias formas de 'puncturas' e incisões, na tentativa de aperfeiçoar esta técnica.

Em 1957, HJORT & STOMORKEN¹⁰² modificaram a técnica de IVY pela realização de incisões horizontais, ao invés de puncturas no antebraço. Mais tarde, BOCHGRERINK & WAALER³⁰, (1958), aumentaram a incisão e modificaram a técnica pela medida *in vivo* da adesividade plaquetária. A despeito destas variações, a melhora resultante no teste de

TS não foi tão grande para fornecer segurança de informação clínica, visto que o teste era de difícil reprodutibilidade e mostrava falta de padronização.

Em 1969, o TS 'Template' foi introduzido com objetivo de obter padronização e melhorar a reprodutibilidade do teste (MIELKE et al.¹⁴⁶, 1969). Uma incisão de comprimento constante (9 mm) e profundidade (1 mm) era realizada no antebraço. Esta incisão foi menos dolorida e mostrou ser rapidamente reproduzida (MIELKE¹⁴³, 1978). Posteriormente, uma variação desta técnica foi planejada sendo que, ao invés de uma incisão, passou-se a utilizar um tipo de guilhotina de punctura, de 5 mm de comprimento e 1 mm de profundidade (KUMAR et al.¹²⁴, 1978).

Neste trabalho de padronização da técnica do 'template' MIELKE et al.¹⁴⁶, (1969), verificou que uma única incisão, propriamente realizada, é adequada para determinar o TS, não necessitando de 2 ou 3 incisões como propunha a técnica anterior de IVY.

Em 1978, MIELKE¹⁴³ em seu estudo concluiu que a direção da incisão (vertical ou horizontal) e o uso de venostasia influenciava significativamente o perfil do TS, deixando claro que quando o TS é estudado, a técnica utilizada deve ser muito bem caracterizada.

No final de 1978, uma nova técnica foi introduzida, o SIMPLATE II por BABSON & BABSON¹¹. Dispositivos estéreis foram desenhados para realizar incisões uniformes para a prova do TS. As incisões preconizadas são de 5 mm de comprimento e 1 mm de profundidade realizadas em duplicatas com lâminas retráteis. Este tipo de técnica aumentou a reprodutibilidade do método, garantindo padronização dos resultados, com desvios menores, fornecendo maior segurança no diagnóstico clínico

Os distúrbios da hemostase relacionados a anormalidades plaquetárias podem ser de ordem quantitativa ou qualitativa. O primeiro pode ser causado por produção deficiente do número de plaquetas ou por aumento de sua destruição. Já as anormalidades qualitativas, quando não são hereditárias, podem ser adquiridas por ação de drogas (WILLIAN et al.²²⁹, 1990).

A listagem de drogas que afetam a função plaquetária é longa e seus mecanismos de ação são diversos (SANFORD et al.¹⁹⁶, 1990).

Por inúmeras razões e por causa de uso universal, incluindo terapêutica racional de supressão do consumo de plaquetas em distúrbios tromboembólicos, AAS é certamente a mais importante e comum causa de défices funcionais plaquetários.

AAS e NSAID inibem a atividade da COX, resultando em alteração da função plaquetária e, portanto, potencialmente aumentam o TS.

O AAS (KITCHEN et al.¹²⁰, 1982; FERRASIS et al.⁷³, 1988; WATSON et al.¹⁸⁶, 1990) e, em menor extensão, os NSAID (RORAIUS et al.¹⁸⁶, 1989) podem causar aumento do sangramento em cirurgias de artéria coronária 'bypass', urológica, gerais e ginecológica, e por extrapolação é geralmente recomendado que estas drogas sejam interrompidas antes de procedimentos cirúrgicos.

O método do TS 'Template' e posteriormente o 'Simplate', são métodos reprodutíveis de monitoramento da diminuição da função plaquetária induzida pelo AAS (HARKER & SLICHER⁹⁸, 1972; MIELKE¹⁴⁴, 1982).

Visto que as alterações da função plaquetária pelo AAS, tem sido realizadas e confirmadas por inúmeros trabalhos, esta droga foi utilizada como padrão comparativo nos ensaios realizados com nimesulide nesta pesquisa.

3 - PROPOSIÇÃO

Este trabalho se propõe a investigar:

1. a influência do nimesulide sobre a agregação plaquetária *in vitro*;
2. a atividade do nimesulide sobre a agregação plaquetária e tempo de sangramento em voluntários sadios;
3. o efeito do nimesulide sobre a produção de TXA₂ em estudo *in vitro* e *ex vivo*;
4. comparar os efeitos obtidos após a administração do nimesulide com aqueles obtidos em paralelo com AAS em doses equipotentes.

4 - MATERIAL E MÉTODO

4.1 - CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os critérios de exclusão de pacientes foram :

- voluntários cujos resultados prévios do hemograma e coagulograma estivessem alterados;
- voluntários que apresentassem qualquer patologia ou estivessem realizando tratamento farmacológico ou radiológico;
- voluntários com história atual ou progressiva de úlcera péptica ou hemorragia gastrointestinal;
- voluntários asmáticos, com disfunção renal ou hepática;
- aqueles que apresentassem história de idiosincrasia ou resposta alérgica ou intolerância conhecida a antiinflamatórios;
- voluntários com doenças infecciosas ou de risco;
- mulheres que estivessem fazendo uso de anovulatórios.

Os voluntários receberam todas as informações básicas referentes ao experimento por meio de um documento (ANEXO1), em duas vias (voluntário e pesquisador) denominado " Informação e Consentimento Pós-informação para Pesquisa Clínica" (RESOLUÇÃO 01/88 DO CNS/MS - BRASIL,1988) (ORBAN & GOTTLIEB¹⁶⁶, 1979; modelo adaptado de ROSALEM¹⁸⁷, 1991). Este documento de consentimento era entregue aos pesquisadores para a realização dos ensaios clínicos, após a assinatura do mesmo.

Além disto, foram coletadas de cada paciente informações sobre idade, sexo, altura e peso corporal, bem como dia do ciclo menstrual, entre outras informações em um questionário próprio (ANEXO 2), o qual serviu de subsídio para caracterizar a amostra populacional envolvida no estudo.

O protocolo clínico foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas de Bragança Paulista-USF (ANEXO 3).

Os resultados dos hemogramas e coagulogramas de cada paciente, realizados no dia anterior aos experimentos, bem como os termos de consentimento

assinados, foram encadernados, servindo como documento comprobatório dos ensaios clínicos efetuados.

4.2- EFEITO DO NIMESULIDE E DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO, *IN VITRO*, SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E A PRODUÇÃO DE TXA₂

4.2.1 - AMOSTRA:

Foram selecionados 25 voluntários sadios, de ambos os sexos, sendo 16 homens e 09 mulheres, com peso variando entre 55 a 90 Kg (média \pm sd= 68.7 \pm 11.3 Kg), e dentro dos 15% do peso corporal ideal*, idades compreendidas entre 21 e 45 anos (média \pm sd= 28.1 \pm 1.3 anos) e alturas entre 155 a 185cm (média \pm sd= 168 \pm 7.1 cm).

Uma vez sendo aprovado pelos critérios protocolares e devidamente informados e acordados sobre o experimento a ser realizado, os mesmos passaram a compor a amostra. A estes voluntários não foi solicitado a assinatura do termo de consentimento, pois os mesmos só se comportaram como doadores de amostras sanguíneas, sem ingerir qualquer medicamento. Estes pacientes são voluntários credenciados junto à Farmacologia - FCM-UNICAMP que, uma vez por mês, são solicitados a doarem amostras sanguíneas para a realização dos ensaios realizados neste depto., mediante normalidade dos exames bioquímicos e hemogramas, passando a compor a amostra controle de um dado ensaio, conforme os critérios protocolares de cada experimento.

4.2.2 - OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Após jejum de 8 h, o sangue foi coletado em citrato de sódio 3.8% (9:1 v/v), utilizando-se, para tanto, butterfly No. 21 na veia cubital média de cada um dos voluntários. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação do

* Conforme Tabela de Pesos e Medidas estabelecidas pela Metropolitan Life Insure Company - USA, 1983.

sangue total a 200g à temperatura de 19-20°C por 15 minutos. O sangue remanescente foi novamente centrifugado a 2000g, à mesma temperatura, por mais 15 minutos, obtendo-se assim o plasma pobre em plaquetas (PPP).

4.2.3 - PREPARAÇÃO DAS DROGAS

O Nimesulide (R 805; 4-nitro-2phenoximethanosulfonanilide) foi doado pela LABOFARMA como substância pura (sal). Este composto foi dissolvido em solução alcoólica (1:3), solução mãe (50 mM) e a partir da mesma as concentrações seguintes foram diluídas em água destilada 10, 20 e 30 vezes.

Indometacina, substância pura (SAL - SIGMA) foi preparada em solução aquosa de NaHCO₃ a 5%.

O AAS (ASPISIN® - FARMASA) foi diluído em álcool (1:3) solução mãe (200 mM) e a partir da mesma as concentrações seguintes foram obtidas através de diluição 10 a 20x em H₂O destilada.

4.2.4 - MEDIDA DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

A agregação foi realizada em amostras de PRP (500 µl) sob agitação contínua (900 rpm), a 37°C em agregômetro (Payton Scientific Instruments, Inc., Buffalo, NY). O aparelho foi calibrado para 0% (usando PRP) e 100% (usando o PPP). Nos experimentos utilizou-se de 5-10 µl dos agentes agregantes em diferentes concentrações e a agregação foi monitorada por pelo menos 5 minutos (BORN³², 1962).

Os agentes agregantes utilizados foram: ADP (1µM); Adrenalina (ADR) (10µM); Ácido Araquidônico (AA)(1mM), PAF (1-3µM) e Colágeno (COL) (2.5 - 10µg/ml). No caso do PAF e COL utilizou-se a dose que promoveu agregação plaquetária máxima para a amostra em questão, dentro do intervalo estabelecido, respectivamente para estes agonistas.

As curvas dose-resposta de nimesulide e do AAS foram construídas a partir de doses de 0.01µM até 1000µM e 0.1µM a 300µM, respectivamente, com incubação prévia de 20 minutos antes da adição do agente agregante.

A curva tempo-resposta do nimesulide foi construída com uma dose capaz de inibir 50% da agregação plaquetária, obtida no experimento. Os tempos de incubação estudados foram 30seg., 1, 3, 10, 20 e 30 min.

4.2.5 - DETERMINAÇÃO DE TXA₂

A concentração de TXA₂ foi analisada por radioimunoensaio (RIA) através de seu produto de degradação, TXB₂ (SALMON¹⁹⁴, 1978).

Para a determinação de TXB₂ liberado, as amostras de plaquetas agregadas com os agentes agregantes citados acima e após obtenção de agregação máxima, foram transferidas imediatamente para eppendorffs e centrifugadas (centrifugue 5412, eppendorf Geratebau, Germany) por 3 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e mantido em freezer (-20°C) até o momento da dosagem. Como controle da produção de TXB₂, algumas amostras foram incubadas com indometacina (10µM) por 20 minutos.

Anti-soros provenientes de coelho foram diluídos (1:1000 - 1:2000) em tampão Tris (50 mM, pH 7.4) contendo gelatina (0.2%) e azida sódica (NaN₃; 0.1%). Aliquotas de 0.1ml dos anti-soros foram misturadas com os padrões ou amostras em tubos de ensaio (10 x 75 mm). O TXB₂ marcado (³H) diluído em tampão Tris-gelatina (0.1ml contendo aproximadamente 10.000 dpm), foi imediatamente adicionado e o volume total da reação completado para 0.4 ml com tampão Tris. O período de incubação foi de 18 - 48 h a 4°C. Para remover o material não ligado da mistura, foi adicionada uma mistura de carvão e dextran (0.2 ml de tampão contendo 4 mg de carvão e 0.8 mg de dextran) a cada tubo, sendo estes, em seguida, agitados por 10 segundos. Os tubos permaneceram imersos em camada de gelo durante 10 min, após o que foram centrifugados a 2000 g durante 15 min em centrífuga refrigerada (Herme, Z36OK). O sobrenadante contendo o complexo antígeno-anticorpo foi coletado e a ele foram adicionados 4.5 ml do líquido de cintilação (PPO 0.4g + POPOP 4.0g + Triton X 333 ml + tolueno qsp 1000 ml). A contagem de cintilação das amostras foi determinada em um espectofotômetro de cintilação líquida (Beckman LS-150). A eficiência da contagem foi confirmada usando-se um padrão externo.

4.3 - EFEITO DO NIMESULIDE E DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO, EX VIVO, SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E A PRODUÇÃO DE TXA₂.

4.3.1 - AMOSTRA

Foram selecionados 06 voluntários sadios, do sexo masculino, com peso variando entre 70 a 90 Kg (média \pm sd=75 \pm 5Kg) e dentro dos 15% do peso corporal ideal, idades variando entre 22 e 30 anos (média \pm sd= 25 \pm 1.1 anos) e altura variando entre 175 a 185cm (média \pm sd= 175 \pm 9.8 cm).

Após os exames prévios (hemograma e coagulograma) e a anamnese não sendo excluído por nenhum item dos critérios protocolares, os mesmos foram então incluídos como amostra desta fase da pesquisa.

4.3.2 - CARACTERIZAÇÃO DAS FASES A QUAL O VOLUNTÁRIO FOI SUBMETIDO

Inicialmente os voluntários foram divididos em pacientes que receberam a droga A e voluntários que receberam a droga B, que significaram tratamento com NMSL e tratamento com AAS.

O experimento foi conduzido duplamente cego, de forma que nem os pesquisadores nem os voluntários souberam ao longo das etapas qual foi o grupo tratado com 100 mg NMSL e aquele tratado com 100mg de AAS, descartando, desta forma a tendenciosidade. Esta informação foi guardada pelo orientador.

Sete dias antes do voluntário participar do início da experimentação o mesmo compareceu ao laboratório para assinar o termo de consentimento anteriormente citado.

* Conforme Tabela de Pesos e Medidas estabelecidas pela Metropolitan Life Insure Company - USA, 1983.

Como o experimento não pode ser realizado inteiramente em um dia, a execução foi alternada ou seja, por dia foram coletadas amostras daqueles que ingeriram a droga A e daqueles que ingeriram a droga B.

4.3.3 - PREPARAÇÃO E ORIENTAÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

No momento em que o voluntário passou a integrar a amostra o mesmo foi instruído para que dez dias antes de vir participar da etapa sorteada não ingerisse qualquer medicamento. Além disto, o mesmo deveria estar em jejum de 8h e com água "ad libitum". Como também seria dosado nitrito e nitrato, a água que o mesmo ingeriu no período foi deionizada e na véspera o mesmo foi avisado para não ingerir alimentos embutidos, que são ricos em nitritos. A água deionizada foi fornecida a cada voluntário em frascos apropriados.

4.3.4- O PROTOCOLO PARA EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO

De cada voluntário foram coletados 20 ml de sangue em tubo de ensaio contendo citrato de sódio 3.8% (9:1 v/v), utilizando-se, para tanto, butterfly N° 21 na veia cubital média. Esta primeira coleta compreende o valor basal para a % de agregação plaquetária e produção de TXA₂, isto é, os valores aqui obtidos foram utilizados como controle. Em seguida, o mesmo recebeu um envelope com a droga A ou B dependendo do sorteio prévio realizado, e na frente do pesquisador ingeriu-a com 1 copo de água destilada. Foram aguardados os tempos 2h e 4h após esta administração e novamente em cada um destes períodos, o sangue (20ml) foi coletado em tubo de ensaio contendo citrato de sódio 3.8% na proporção (1:9 v/v). Foram coletados mais 10ml de sangue sem anticoagulante para a dosagem de nitrito e nitrato no soro de cada uma dos voluntários. Esta dosagem não foi acrescentada nesta tese, porém como este protocolo foi feito conjuntamente, considerou-se necessário citar que o voluntário havia sido submetido a este tipo de procedimento.

As amostras de sangue citratado foram submetidas a centrifugação conforme descrito no item 4.2.2 para obtenção do PRP e do PPP sendo posteriormente submetidas a medida da agregação plaquetária (item 4.2.4) e a determinação de TXA_2 foi feita por RIA (item 4.2.5)

4.3.6 - DROGAS UTILIZADAS

NIMESULIDE (NISULID[®]) : foi administrado na forma de comprimidos orais de 100mg para cada voluntário.

ÁCIDO ACETILSALICÍLICO (ASPIRINA[®]) : foi administrado na forma de comprimidos de 100mg para cada voluntário.

Estas preparações foram escolhidas em função de seu uso clínico. No caso do NMSL utiliza-se no máximo 2 comprimidos de 100mg de NMSL ao dia na clínica odontológica. O AAS é utilizado na forma de comprimidos de 100mg diários em pacientes com distúrbios tromboembólicos.

4.4 - EFEITO DO NIMESULIDE E DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO SOBRE O TEMPO DE SANGRAMENTO. MEDIDA *IN VIVO*.

4.4.1 - AMOSTRA

Foram selecionados 17 voluntários sadios, sendo 08 do sexo feminino e 09 do sexo masculino, com peso variando entre 55 a 78Kg (média \pm epm= 62.2 \pm 1.8 Kg) e dentro dos 15% do peso corporal ideal*, com altura entre 155 a 180cm (média \pm epm=167.8 \pm .2.1cm) e idades entre 19 a 40 anos (25.3 \pm 1.3 anos).

Foram seguidos os critérios de inclusão e exclusão protocolares de pacientes relacionados no item 4.1.1. para compor esta amostra.

* Conforme Tabela de Pesos e Medidas estabelecidas pela Metropolitan Life Insure Company - USA, 1983.

4.4.2 - CARACTERIZAÇÃO DAS FASES À QUAL O VOLUNTÁRIO FOI SUBMETIDO

O experimento foi conduzido duplamente cego, como nos anteriores.

Sete dias antes do voluntário participar do início da experimentação o mesmo compareceu ao laboratório para assinar o documento anteriormente citado.

Inicialmente os voluntários foram divididos em pacientes que receberam a droga X e pacientes que receberam a droga Y, que significaram tratamento com NMSL e tratamento com a droga AAS, porém no momento de sua execução nem o pesquisador nem o paciente souberam o que X ou Y representavam respectivamente.

A execução foi alternada ou seja, por semana foram coletadas amostras daqueles que ingeriram a droga X e daqueles que ingeriram a droga Y. Decorridos 20 dias após a primeira fase da pesquisa, os voluntários participaram da troca de fase, isto é, o voluntário que participou tomando a droga X passou a administração da droga Y e vice-versa, caracterizando estudo duplo-cego rotacional (cross-over).

4.4.3- PREPARAÇÃO E ORIENTAÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

Utilizou-se o mesmo procedimento citado em 4.3.3.

4.4.4 - DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE SANGRAMENTO (TS)

Foi solicitado que o voluntário sentasse com o braço na posição supina, na mesma altura do coração sobre um suporte firme, com a superfície volar exposta.

Para a determinação do TS foi utilizado o braço do qual não havia sido coletado o sangue. Em uma área da parte muscular do antebraço, distante da fossa antecubital, evitando veias superficiais, cicatrizes e contusões a determinação do

Tempo de Sangramento (TS) foi realizada, com um dispositivo denominado Simplate® (ORGANON TEKNIKA). Um manguito de esfigmomanômetro com pressão de 40 mmHg foi colocado na parte superior do braço no qual estava sendo realizado o TS. A anti-sepsia foi realizada com álcool 70% e o dispositivo foi acionado. Neste momento foi disparado o cronômetro e de 30 em 30 segundos o sangue foi limpo com papel de filtro tomando-se o cuidado de não encostar nas bordas do corte para não alterar o tampão plaquetário. Continuou-se absorvendo o sangue a cada 30 segundos, até que não houvesse mancha de sangue no papel de filtro. Neste momento o cronômetro foi parado, registrando-se o tempo decorrido, o qual representou o TS. O TS foi realizado antes da administração do medicamento e 2, 4, 8, 24h e 7 dias após o tratamento.

4.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias (E.P.M) e o N indica o número de experimentos realizados.

A avaliação estatística dos resultados foi realizada empregando-se análise de variância (ANOVA) de uma via, com nível crítico igual ou menor a 0.05 para rejeição de nulidade. Na presença de significância na ANOVA, procedeu-se à análise de contraste entre as médias aplicando-se o teste a *posteriori* 't' Student pareado, Teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações e Teste de Dunnett's para comparação com grupo controle.

A homogeneidade de variância (homocedasticidade) foi verificada através do teste de Bartlett. Para as variáveis em que o teste apontou evidências de heterocedasticidade, a análise empregada foi ANOVA WELCH.

Para as medidas em % da agregação plaquetária foi utilizado o teste não paramétrico de WILCOXON e KRUSKAL-WALLIS.

Para a realização dos cálculos estatísticos foi utilizado o programa JUMP (JMP) versão 3.1.4, Copyright © 1989-1995, SAS Institute Inc. Licença No. 40-2301 for Windows®.

5 - RESULTADOS

5.1 - EFEITO DO NMSL E DO AAS SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E A PRODUÇÃO DE TXA₂, *IN VITRO*

5.1.1 - ESTUDO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA *IN VITRO*

A figura 2 mostra a relação da concentração de NMSL, incubação prévia (20min), e a % de inibição da agregação plaquetária com a adição dos agonistas ADP(1 μ M), ADR(10 μ M), Col (2.5-5.0 μ g/ml), PAF(1-3 μ M) e AA(1mM). O NMSL inibiu de modo concentração-dependente, a agregação plaquetária induzida pelos cinco agonistas. Esta inibição ocorreu em intervalos de concentrações diferentes para os vários agonistas. A concentração de 1000 μ M de NMSL praticamente inibiu 100% da agregação induzida por AA, ADR, PAF e COL (WILCOXON/KRUSKAL-WALLIS: AA $\chi^2_{(4)}=22.35$ p<0.0002; ADR $\chi^2_{(6)}=29.21$ p<0.0001; COL $\chi^2_{(6)}=23.97$ p<0.0005); mas, só foi capaz de inibir 57,2 \pm 5.0% (WILCOXON/KRUSKAL-WALLIS: $\chi^2_{(4)}=17.7$ p<0.0014) a agregação induzida por ADP. Foi constatado também que na concentração de 0.003 μ M houve inibição de 42.9 \pm 19.3% (WILCOXON/KRUSKAL-WALLIS: $\chi^2_{(10)}=40.57$ p<0.0000) da agregação induzida pelo PAF, sendo este o único agonista cujo efeito foi inibido nesta concentração. Os valores médios bem como o epm foram colocados na tabela 1 do anexo 4. Os valores individuais obtidos da amostra (25 voluntários) encontram-se no anexo 5 (Tab. 1.1 a 1.5).

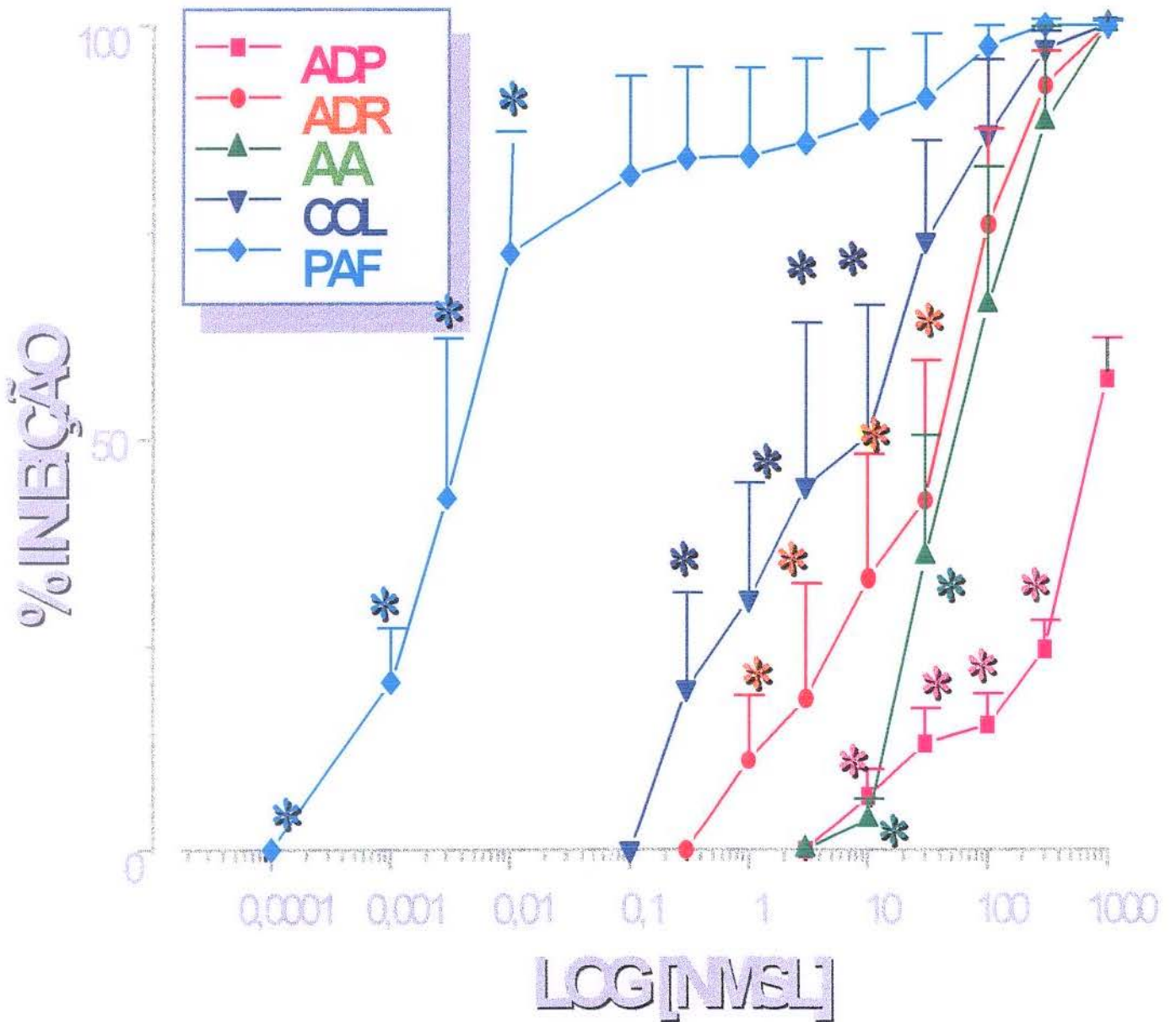


Figura 2 - A pré-incubação (20min) do PRP com nimesulide (NMSL - 0.0001-1000 μM) inibe de forma dose-dependente a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico (AA -1μM); ADP (1μM); adrenalina (ADR-10 μM); fator ativador plaquetário (PAF -1-3μM) e colágeno (Col 2.5-5.0 mg/ml). As barras verticais representam o erro padrão das médias (n=7-9).

A figura 3 ilustra os dados obtidos na tabela 2 (ANEXO 4), onde constatou-se que o AAS, incubação prévia (20min) também inibiu, de modo concentração-dependente, a agregação plaquetária induzida pelos cinco agonistas utilizados. Pode-se observar que a inibição de 100% da agregação foi alcançada em doses iguais ou superiores a 100 μ M para o ADR, ADP e PAF (WILCOXON/KRUSKAL-WALLIS: ADR $\chi^2_{(6)}=24.2$ $p<0.0005$; ADP $\chi^2_{(6)}=27.98$ $p<0.001$; PAF $\chi^2_{(6)}=26.79$ $p<0.0002$). Para os agonistas AA e COL a inibição de 100% (WILCOXON/KRUSKAL-WALLIS: AA $\chi^2_{(6)}=18.34$ $p<0.0054$ e COL $\chi^2_{(6)} = 15.22$ $p<0.0094$), da agregação ocorreu em concentrações iguais ou superiores a 30 μ M e 10 μ M, respectivamente. Nota-se que os perfis de inibição dos agonistas entre si, são muito semelhantes. Os valores individuais obtidos da amostra (25 voluntários) encontram-se no anexo 5 (Tab. 2.1 a 2.5).

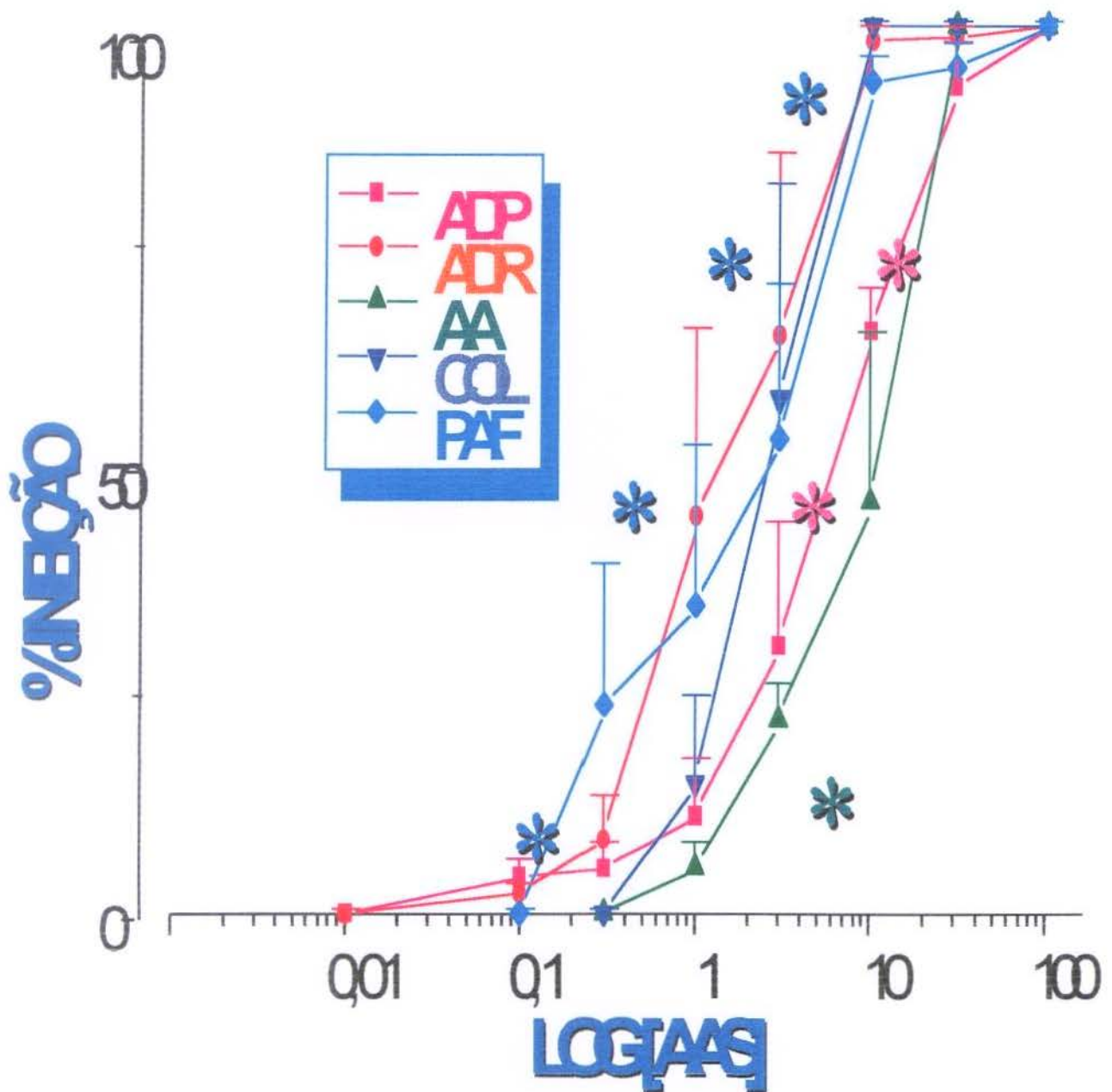


Figura 3 - A pré-incubação (20min) do PRP com ácido acetilsalicílico (AAS) (1-100μM) inibe de forma dose-dependente a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico (AA -1μM); ADP (1μM); adrenalina (ADR-10μM); fator ativador plaquetário (PAF -1-3μM) e colágeno (Col 2.5-5.0mg/ml). Cada ponto da curva representa a média de 3-5 experimentos. As barras verticais representam o erro padrão das médias.

O efeito do NMSL sobre a agregação plaquetária induzida pelos agonistas citados foi também tempo-dependente, isto é, o aumento do período prévio de incubação (30s → 30min) promoveu maior inibição da agregação (Fig.4). As médias e o epm estão alocados na tabela 3 do anexo 4. Verificou-se que a incubação de NMSL por 30 seg. inibiu significativamente $62.5 \pm 5.0\%$ (WILCOXON/KRUSKAL-WALLIS: $\chi^2_{(5)}=21.04$ $p<0.0008$) da agregação plaquetária induzida pelo PAF e $42.3 \pm 14.9\%$ (WILCOXON/KRUSKAL-WALLIS: $\chi^2_{(5)}=15.99$ $p<0.006$) daquela induzida por ADR. No entanto, a incubação de 30 min. com NMSL não foi capaz de inibir 50% da agregação induzida por ADP ($36.5 \pm 5.6\%$ - WILCOXON/KRUSKAL-WALLIS: $\chi^2_{(5)}=13.40$ $p<0.01$); entretanto, somente neste mesmo período de incubação foi observada inibição da agregação induzida por AA em mais de 50% ($85.0 \pm 14.9\%$ - WILCOXON/KRUSKAL-WALLIS: $\chi^2_{(5)}=24.6$ $p<0.0002$). A agregação induzida pelo COL ($77.2 \pm 14.5\%$) foi inibida em mais de 50% a partir da incubação de 10min. (WILCOXON/KRUSKAL-WALLIS: $\chi^2_{(5)}=21.03$ $p<0.0008$). No anexo 5, estão alocados os valores individuais da amostra para a variação do tempo de incubação (Tab. 3.1 a 3.5).

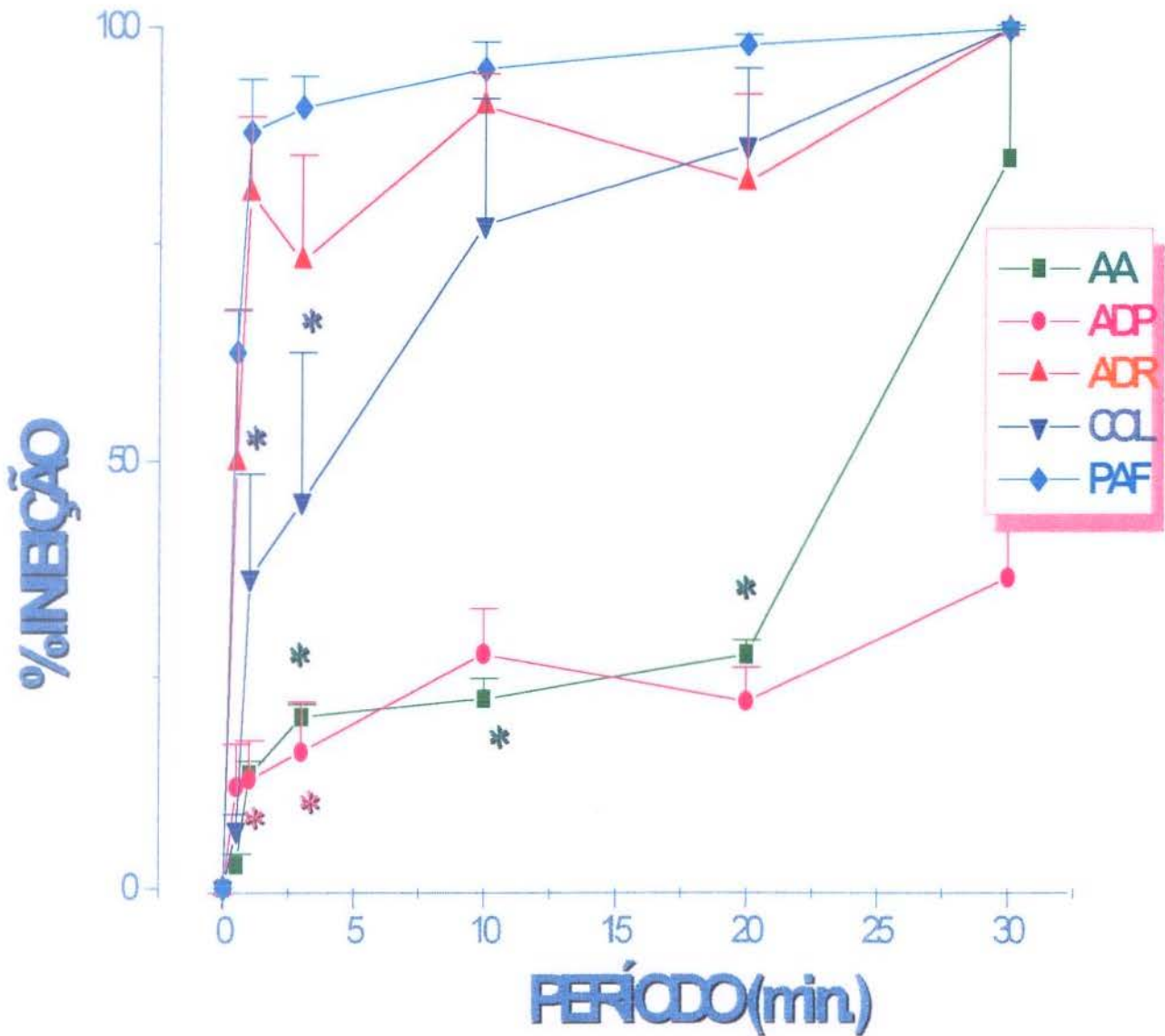


Figura 4 - Efeito do tempo de incubação (30s →30min.) sobre a ação inibitória do nimesulide (IC_{50}) na agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico (AA-1mM); adrenalina (ADR -10 μ M); ADP (1 μ M); colágeno (Col - 2.5-5.0 μ g/ml). Cada ponto da curva representa a média de 7-9 experimentos. As barras verticais indicam o erro padrão da média.

A figura 5 ilustra os traçados do efeito antiagregante do NMSL em relação a variação do tempo de incubação.

Os valores de IC_{50} (concentração inibitória 50%) obtidos para o NMSL foram em média 8 a 96 vezes mais elevados que aqueles requeridos pelo AAS com os agonistas ADP, ADR, AA e COL. No entanto, constatou-se que a IC_{50} do NMSL ($0.02 \pm 0.001 \mu M$) foi cerca de 180 vezes menor que a IC_{50} do AAS (3.6 ± 1.1) quando o agonista utilizado foi o PAF (Tab.4).

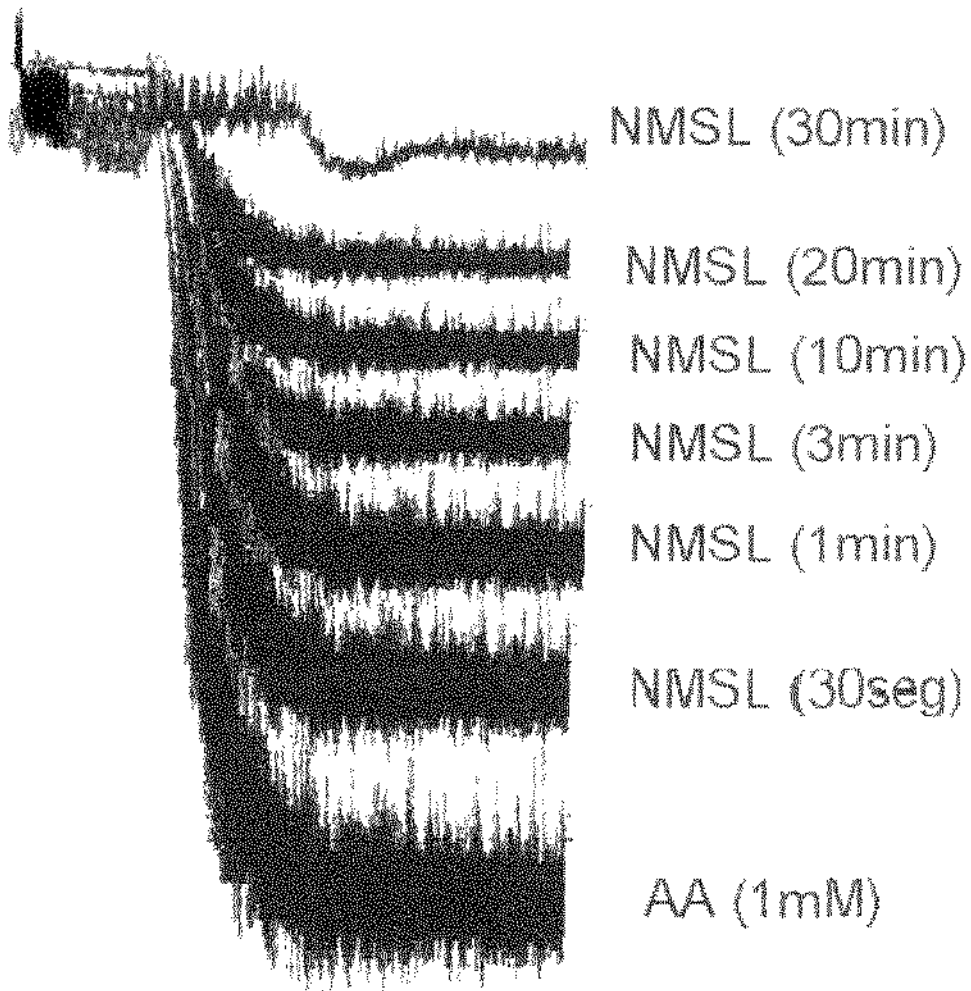


Figura 5 - Traçado ilustrativo mostrando o efeito inibitório do NMSL sobre a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico (AA 1mM), variação imposta pelo tempo de incubação.

Tabela 4 - IC₅₀ (concentração inibitória 50%) do nimesulide (NMSL) e do Ácido Acetilsalicílico (AAS) na agregação plaquetária *in vitro*, induzida por ADP, adrenalina (ADR), ácido araquidônico (AA) colágeno (COL) e fator ativador plaquetário (PAF). Os resultados são as médias ± erro padrão das médias.

AGONISTA	NMSL		AAS	
	IC ₅₀ (μM)	N	IC ₅₀ (μM)	N
ADP(1μM)	625.0 ± 47.8***	05	6.5 ± 1.2***	05
ADR(10μM)	79.0 ± 23.7**	07	3.1 ± 1.1**	05
AA(1mM)	72.4 ± 24.7*	07	8.2 ± 3.4*	05
COL(2.5-10μg/ml)	24.1 ± 10.7*	07	3.0 ± 1.1*	05
PAF(1-3μM)	0.02 ± 0.001**	05	3.6 ± 1.1**	05

TESTE t-Student *** p<0.001; **p<0.01; *p<0.05

A pré-incubação (20min) do PRP com NMSL produziu um traçado inibitório de agregação muito semelhante àquele encontrado para o AAS, isto é, ambos aboliram a segunda onda de agregação dos vários agonistas estudados (Fig 6).

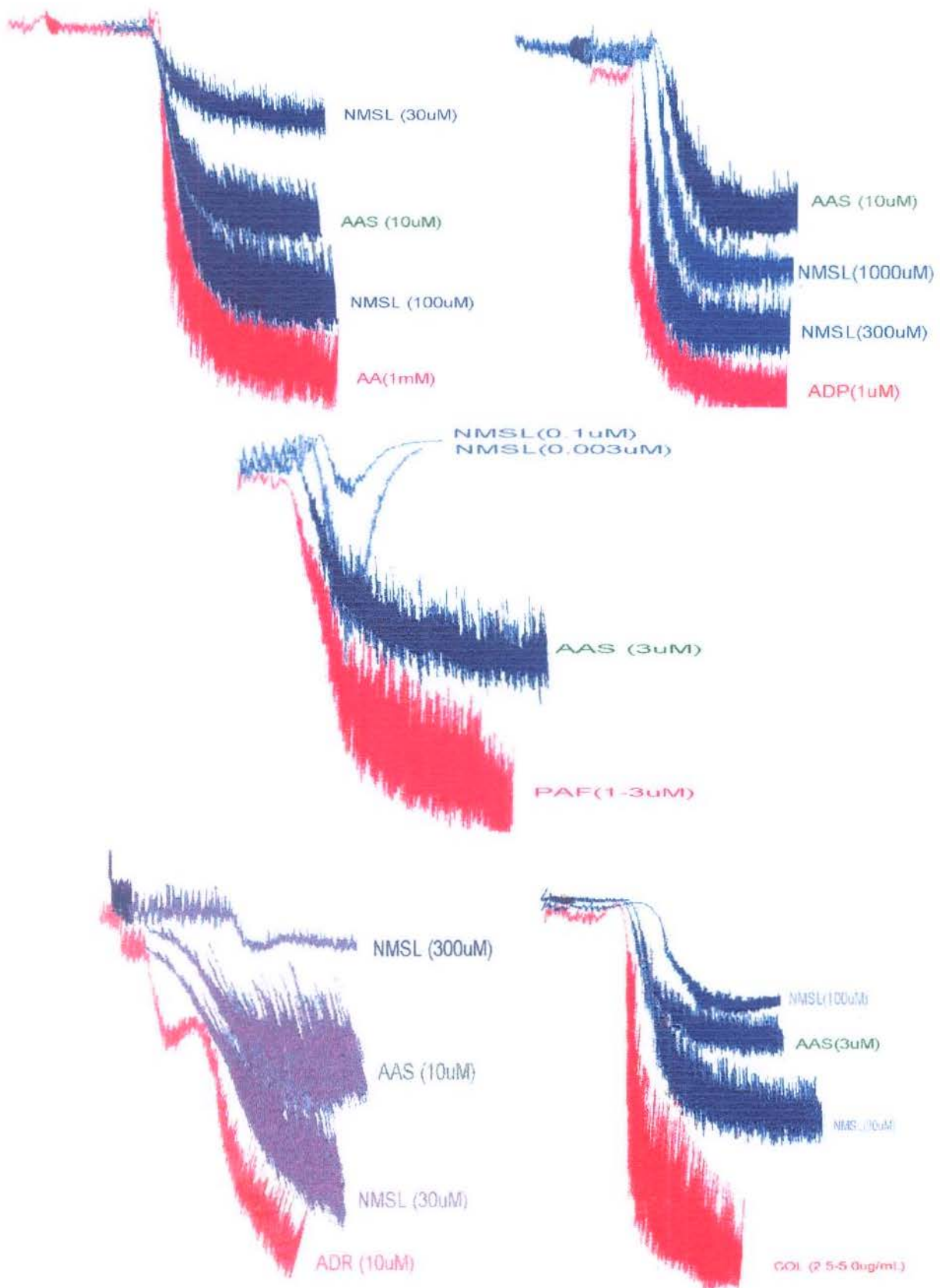


Figura 6- Traçado ilustrativo comparando o efeito inibitório do NMSL e do AAS sobre a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico (AA 1mM); ADP (1 μ M); fator ativador plaquetário (PAF - 1-3 μ M); colágeno (COL 2.5 - 5.0 μ g/ml) e adrenalina (ADR - 10 μ M). O NMSL (0.0001-1000 μ M) e o AAS (0.1 - 100 μ M) foram pré-incubados (20 min) com PRP.

5.1.2 - INFLUÊNCIA DO TXA₂ NO EFEITO ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIO DO NMSL E AAS

A medida da inibição da produção de TXA₂ foi utilizada para verificar o envolvimento deste prostanóide no efeito antiagregante plaquetário do NMSL e do AAS. Os níveis de TXA₂ no PRP incubado com NMSL (20min) foram determinados por RIA e comparados ao tratamento deste PRP com AAS (inibidor clássico de COX). A indometacina (INDO - 10 μ M -IC₅₀) foi utilizada como padrão positivo da inibição de síntese de TXA₂ (Tab. 5).

Conforme mostrado na tabela 5 e ilustrado nas figuras 7 e 8, verificou-se que a agregação máxima induzida pelos cinco agonistas foi acompanhada de elevação significativa ($p < 0.01$) da produção de TXA₂, ADP (21.7 ± 2.8 ng/ml, $n=6$); ADR (25.7 ± 2.9 ng/ml, $n=10$); AA (63.1 ± 7.3 ng/ml, $n=8$); COL (32.0 ± 4.2 ng/ml, $n=6$) e PAF (20.6 ± 2.2 ng/ml, $n=8$) quando comparada aos níveis basais (3.0 ± 0.6 , $n=20$) na ausência do estímulo agregante. Os valores individuais da amostra (25 voluntários) estão alocados no anexo 5 (Tab. 5.1).

A incubação prévia (20min) com INDO (10 μ M) reduziu significativamente ($p < 0.01$) a produção de TXA₂ após acréscimo dos agonistas utilizados ADP (0.35 ± 0.07 ng/ml, $n=6$); ADR (5.3 ± 1.2 ng/ml, $n=10$); AA (17.9 ± 9.7 ng/ml, $n=8$); COL (5.0 ± 1.3 ng/ml, $n=10$) e PAF (4.6 ± 1.2 ng/ml, $n=8$), conforme mostra a tabela 5. Os valores individuais da amostra para este parâmetro estão alocados no anexo 5 (Tab. 5.2).

TABELA 5 - Efeito inibitório da indometacina (INDO - 10 μ M) sobre a liberação de TXA₂ (ng/ml) induzida pela adrenalina (ADR - 10 μ M), ADP (1 μ M), ácido araquidônico (AA-1mM), colágeno (COL 2.5 - 5.0 μ g/ml) e PAF (1-3 μ M) em PRP. A INDO foi pré-incubada com o PRP por 20 min. antes da adição dos agentes agregantes. Os resultados estão representados como médias \pm erro padrão das médias de 6-10 experimentos.

AGENTE AGREGANTE	TXA ₂ (ng/ml)		N
	ANTES	INDO	
ADP	21.7 \pm 2.8	0.35 \pm 0.07*	06
ADR	25.7 \pm 2.9	5.3 \pm 1.2*	10
AA	63.1 \pm 7.3	17.9 \pm 9.7*	08
COL	32.0 \pm 4.2	5.0 \pm 1.33*	06/10
PAF	20.6 \pm 2.2	4.6 \pm 1.2*	08
BASAL	3.0 \pm 0.6*	----	20

ANOVA: ADP $F_{(2,31)} = 20.81$ $p < 0.0000$; ADR $F_{(2,37)} = 63.74$ $p < 0.0000$; AA $F_{(2,33)} = 40.37$ $p < 0.0000$; Col $F_{(2,33)} = 82.43$ $p < 0.0000$; PAF $F_{(2,33)} = 65.55$ $p < 0.0000$.

Teste Tukey-Kramer: * $p < 0.01$ quando comparados aos valores do agonista na ausência da INDO (antes).

- Valores individuais da amostra (25 voluntários), ver anexo 5 (Tab. 5.1 e 5.2)

A incubação prévia (20min) do PRP com NMSL (10-300 μ M) (Fig. 7) diminuiu a produção de TXA₂ de modo concentração-dependente para todos os agonistas utilizados. Esta diminuição foi seletiva uma vez que houve maior efetividade para a inibição da liberação induzida pelo PAF do que pelo AA e ADR (ANOVA: ADP $F_{(5,15)} = 20.7$ $p < 0.002$; ADR $F_{(7,37)} = 9.18$ $p < 0.0000$; AA $F_{(5,25)} = 25.14$ $p < 0.0000$; COL $F_{(5,28)} = 7.83$ $p < 0.0000$; PAF $F_{(10,30)} = 12.07$ $p < 0.0000$). A diminuição significativa ($p < 0.01$) da produção de TXA₂ foi alcançada com concentrações de NMSL de 0.01 μ M para o PAF (7.8 \pm 3.1ng/ml, n=3), 30 μ M para COL (12.2 \pm 6.1 ng/ml, n=5) e ADP (8.3 \pm 0.9 ng/ml, n=3); e 100 μ M para AA (5.98 \pm 0.43ng/ml, n=5) e ADR (1.65 \pm 0.47ng/ml, n=6). Estes resultados indicaram uma redução percentual de 62.1%, 55.3%, 61.7%, 90.5% e 93.5%, respectivamente, em relação aos valores do agonista na ausência da droga, tabela 6 (ANEXO 4). Os valores individuais da amostra estão apresentados no anexo 5 (Tab.6.1 a 6.5).

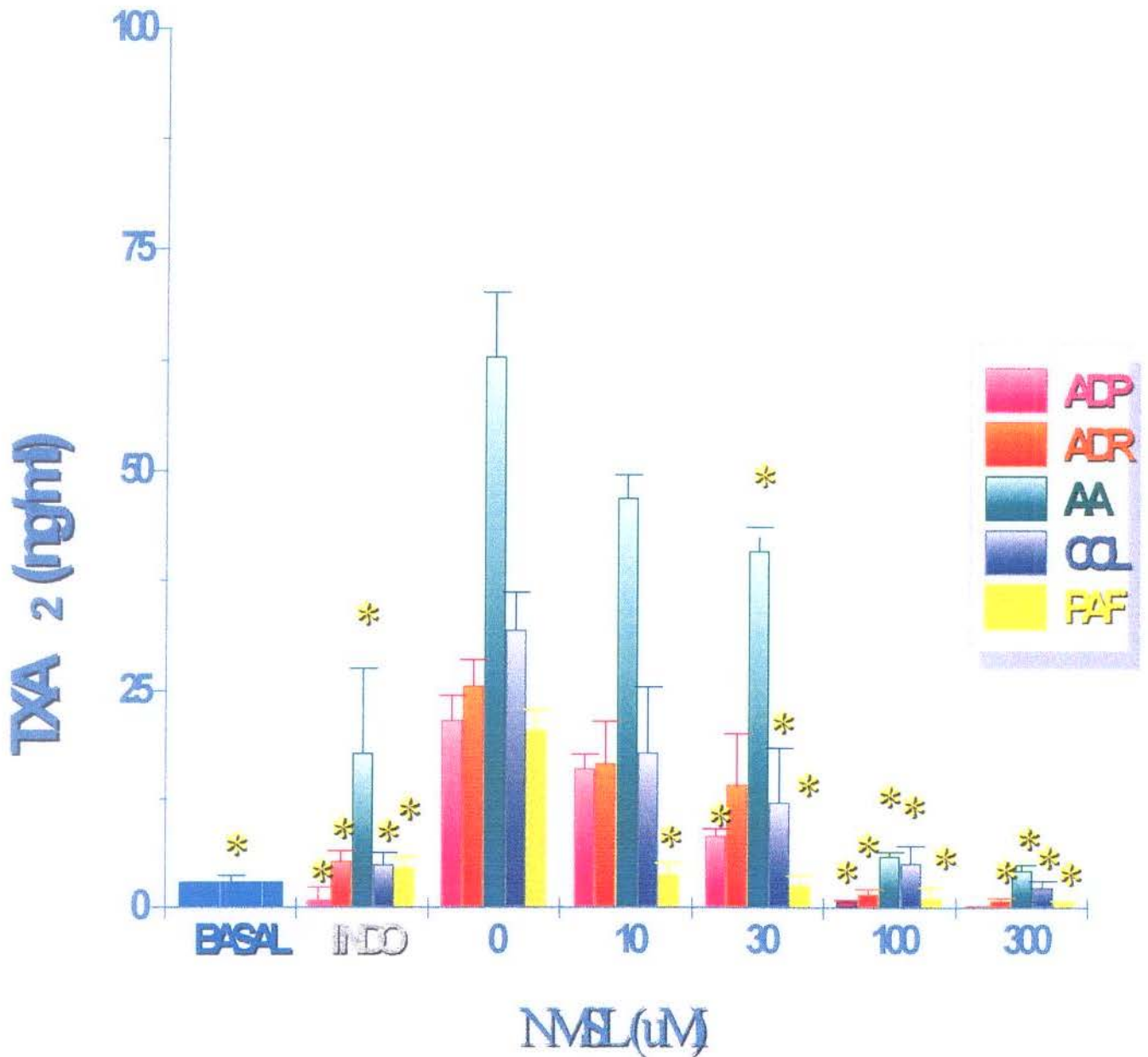


Figura 7 - Efeito do nimesulide (NMSL, 10-300 μ M), incubação prévia de 20 min., sobre a produção de tromboxano (TXA₂) em PRP induzida pela adrenalina (ADR - 1 μ M) , ácido araquidônico (AA - 1 μ M), colágeno (Col - 2,5 - 5,0 μ g/ml) e fator de ativação plaquetária (PAF - 1-3 μ M), em PRP. A indometacina (INDO - 10 μ M) foi utilizada como padrão da inibição da produção de TXA₂. Cada coluna representa a média de 3-20 experimentos. As barras verticais indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam nível de significância de *p<0.01 (Teste Tukey Kramer) comparação feita com os valores do agonista na ausência do NMSL (0).

De modo similar, a inibição da produção de TXA_2 pelo AAS ($0.1-100\mu\text{M}$) foi também dependente da concentração não importando o agonista utilizado (Fig. 8). Os valores médios e o epm estão colocados no anexo 4, tabela 7. A produção de TXA_2 foi inibida significativamente ($p < 0.01$) após o acréscimo do agonista PAF (5.7 ± 0.6) na concentração de $1.0\mu\text{M}$ de AAS enquanto ADR ($5.9 \pm 1.3\text{ng/ml}$, $n=4$); COL ($15.4 \pm 2.9\text{ng/ml}$, $n=4$) na concentração de $3\mu\text{M}$ e, finalmente, ADP ($1.0 \pm 0.5\text{ng/ml}$, $n=3$) e AA ($21.1 \pm 4.7\text{ng/ml}$, $n=3$) foram inibidos na concentração de $10\mu\text{M}$. A redução percentual da produção de TXA_2 foi de 72.3% (PAF), 51.9% (COL), 77.0% (ADR), 95.4% (ADP) e 66.5% (AA). Os valores individuais da amostra estão apresentados no anexo 5 (Tab. 7.1 a 7.5).

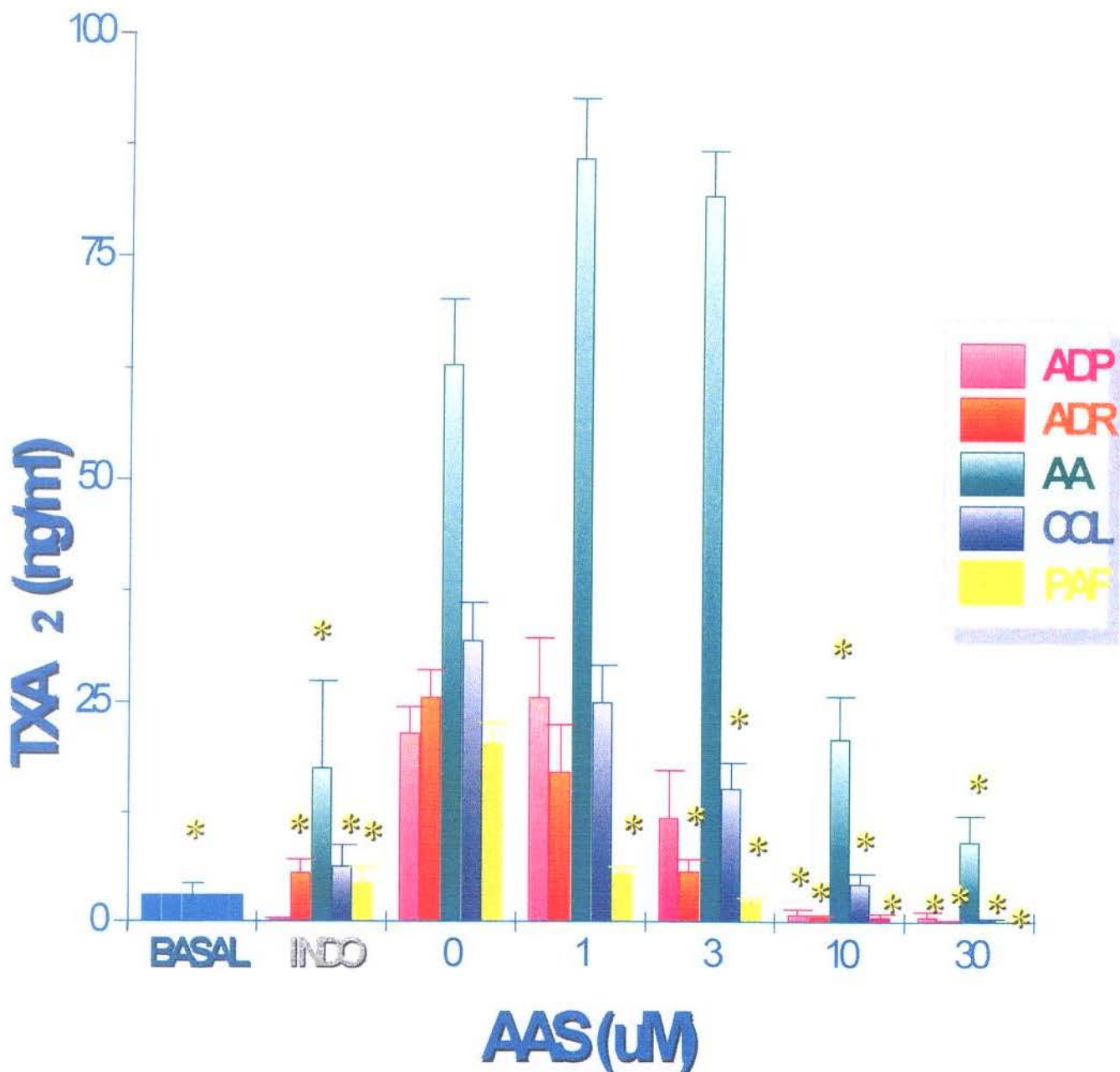


Figura 8 - Efeito do ácido acetilsalicílico (AAS, 1-100µM) incubação prévia por 20 min., sobre a produção de TXA₂ induzida pela adrenalina (ADR - 1µM), ácido araquidônico (AA - 1µM), colágeno (COL - 2,5 - 5,0µg/ml), fator de ativação plaquetária (PAF - 1-3µM), em PRP. A indometacina (INDO - 10µM) foi utilizada como droga padrão de inibição da produção de TXA₂. Cada coluna representa a média de 3-4 experimentos. As barras verticais indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam nível de significância de *p<0.01 (Teste Tukey-Kramer) comparação feita com os valores do agonista na ausência do AAS.

5.2 - EFEITO DO NMSL E DO AAS NA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E PRODUÇÃO DE TXA₂ EM VOLUNTÁRIOS SADIOS, EX VIVO

Com a administração de NMSL (100mg, p.o) não foi observada inibição estatisticamente significativa da agregação plaquetária em nenhum dos tempos estudados, com quaisquer dos agonistas testados (Tab. 8). Os valores individuais da amostra estão apresentados no anexo 5 (Tab. 8.1).

No entanto, a administração de AAS (100mg, p.o) promoveu reduções significativas ($p < 0.01$) na agregação induzida pelos mesmos agentes. Na agregação induzida pelo ADP, a inibição foi de 45.5% e 48.8 % para os tempos de 2h e 4h respectivamente. Com o AA, 25.8% de inibição foi observada 4h após o tratamento. A agregação induzida por ADR não foi inibida significativamente pelo AAS. Quando o PAF foi o agente agregante empregado, a inibição foi de 27.1%, observado 2h após o tratamento (Tab. 8). Os valores individuais da amostra estão apresentados no anexo 5 (Tab. 8.2).

Constatou-se que o NMSL causou redução estatisticamente significativa ($p < 0.01$) na produção de TXA₂ induzida pelo PAF (Tab. 9). A adição de PAF ao PRP promoveu liberação de 47.0 ± 6.8 ng/ml de TXA₂ sendo que após a administração de NMSL, este valor foi reduzido em 89.3% e 66.8% nos tempos de 2h (5.02 ± 2.5 ng/ml) e 4h (15.6 ± 7.1 ng/ml), respectivamente (Tab.9). Os valores individuais da amostra estão apresentados no anexo 5 (Tab. 9.1).

O tratamento com AAS promoveu reduções significativas ($p < 0.01$) na produção de TXA₂ como observado na tabela 9. A produção de TXA₂ foi inibida em 98.9% e 100% e ainda 95.7% e 100% quando os agentes agregantes foram ADP e PAF, nos tempos estudados, respectivamente. Já a adição de AA e ADR promoveram inibição de 45.8% e 95.7% respectivamente, somente após 2h, retornando ao valor basal após 4h. Os valores individuais da amostra estão apresentados no anexo 5 (Tab. 9.2).

Tabela 8 - Efeito do nimesulide (NMSL - 100mg) e do ácido acetilsalicílico (AAS-100mg), experimento *ex vivo*, sobre a agregação plaquetária (%) induzida pela adrenalina (ADR - 10µM), ADP(1µM); ácido araquidônico (AA - 1mM); colágeno (COL 2.5-5.0µg/ml) e fator ativador plaquetário (PAF - 1-3µM), em PRP. Os valores expressos são as médias ± erro padrão da média de 3 experimentos para cada agonista.

AGENTE AGREGANTE	PERIODO (h)					
	NMSL (100mg)			AAS(100mg)		
	0	2	4	0	2	4
ADP	72.6 ± 5.9	76.6 ± 4.5	72.2 ± 2.1	74.5 ± 3.2	40.6 ± 2.6*	38.1 ± 8.9*
AA	86.4 ± 3.7	82.0 ± 4.6	75.2 ± 2.1	85.5 ± 4.8	81.5 ± 2.1	63.4 ± 2.6*
ADR	74.0 ± 9.9	75.0 ± 4.5	70.6 ± 2.6	78.3 ± 3.4	50.9 ± 9.6	44.1 ± 11.8
PAF	86.4 ± 3.7	63.6 ± 16.6	73.2 ± 12.7	80.3 ± 0.9	58.5 ± 6.1*	77.3 ± 1.5

WILCOXON/
KRUSKAL-WALLIS AA $\chi^2_{(2)}=1.57$ p>0.05
ADR $\chi^2_{(2)}=0.81$ p>0.05
ADP $\chi^2_{(2)}=0.64$ p>0.05
PAF $\chi^2_{(2)}=0.70$ p>0.05

WILCOXON/
KRUSKAL-WALLIS: AA $\chi^2_{(2)}=5.8$ p<0.05
ADR $\chi^2_{(5)}=5.6$ p<0.05
ADP $\chi^2_{(2)}=5.6$ p<0.05
PAF $\chi^2_{(2)}=6.2$ p<0.05

Valores da amostra (07 voluntários), ver anexo 5 (Tab. 8.1 e 8.2)

Tabela 9 - Efeito do nimesulide (NMSL - 100mg) e do ácido acetilsalicílico (AAS-100mg), experimento *ex vivo*, sobre a produção de TXA₂ induzida pela adrenalina (ADR - 10µM), ADP(1µM); ácido araquidônico (AA - 1mM); colágeno (COL 2.5-5.0µg/ml) e fator ativador plaquetário (PAF - 1-3µM), em PRP. Os valores expressos são as médias ± erro padrão da média de 3-4 experimentos para cada agonista.

AGENTE AGREGANTE	PERIODO (h)					
	NMSL (100mg)			AAS(100mg)		
	0	2	4	0	2	4
ADP	28.6 ± 10.7	12.4 ± 6.4	7.9 ± 2.4	47.4 ± 9.0	0.5 ± 0.3***	0.0***
AA	240.3 ± 41.6	183.3 ± 5.6	123 ± 30.0	157.3 ± 13.8	85.3 ± 7.2*	170 ± 21.0
ADR	36.1 ± 1.0	33.5 ± 1.1	24.1 ± 12.1	18.7 ± 2.8	4.5 ± 0.3**	14.0 ± 2.4
PAF	47.0 ± 6.8	5.02 ± 2.5**	15.6 ± 7.1*	55.3 ± 0.8	2.4 ± 0.05***	0.0***

ANOVA F(3,6) - ADP = 2.2 p>0.05 ANOVA F_(2,6) - ADP =9633.7 p<0.0000
 - ADR = 0.09 p>0.05 - ADR =32.3 p<0.0006
 - AA = 3.9 p>0.05 - AA =330.4 p<0.0000
 - PAF = 13.9 p<0.005 - PAF =3750.7 p<0.0000

Teste de TUKEY-KRAMER - * p<0.01; **p<0.001 *** p<0.0001 quando comparados ao tempo 0h
 Valores da amostra (07 voluntários), ver anexo 5 (Tab. 9.1 e 9.2)

5.3 - PROLONGAMENTO DO TEMPO DE SANGRAMENTO APÓS TRATAMENTO COM NMSL E AAS

Utilizando a técnica do SIMPLATE II-R as médias do tempo de sangramento (TS) para os dois grupos de sujeitos experimentais antes da intervenção farmacológica foram 398.7 ± 34.5 e 353.0 ± 37.04 (Tab.10). Os valores individuais da amostra estão apresentados no anexo 5 (Tab.10.1 a 10.6).

Foi realizado teste de homogeneidade de variâncias, para os voluntários sem distinção de sexo, estes dados estão alocados nas tabelas 11.1 e 11.2 do anexo 4.

A administração de NMSL (cp. 100mg, via oral) promoveu aumento significativo ($p < 0.01$) dos valores médios do TS após 4h (670.2 ± 89.5 , $n=10$) e 8h (577.5 ± 35.7 , $n=4$) em relação aos valores basais (398.7 ± 34.5 , $n=12$) significando 68.1% e 44.8% de elevação, respectivamente. O TS foi restaurado após 24h (491.5 ± 20.7 , $n=10$), (Fig. 9; Tab.10).

O tratamento com AAS (cp.100mg, via oral) elevou significativamente ($p < 0.01$) os valores médios basais do TS de 353 ± 37.04 ($n=8$) para 942.9 ± 140.5 ($n=10$); 873.7 ± 130.1 ($n=8$); 990.0 ± 143.5 ($n=5$) e 887.2 ± 104.9 ($n=8$), após 2h, 4h, 8h e 24h, significando aumentos percentuais de 167.1%, 147.5%; 180.4% e 151.3%, respectivamente. O TS foi restaurado após 7 dias (Fig. 9, Tab. 10).

Como os valores de referência para esta técnica estão entre 138 a 570 seg (BABSON & BABSON, 1987), nota-se que o aumento significativo dos valores médios após os tratamentos, corresponderam a prolongamentos no TS pois ultrapassaram os valores de referência. Verificou-se que o tratamento com NMSL prolongou o TS em 17.6% e 1.3% e o AAS prolongou em 65.4%, 53.2%, 73.7%, 55.6% em relação aos valores de referência.

Portanto, pode-se observar que o prolongamento do TS promovido pelo AAS foi estatisticamente diferente ($p < 0.01$) ao do NMSL nos tempos 2h e 24h.

Pequenas alterações entre os sexos não foram estatisticamente significantes nos períodos estudados, para ambos os tratamentos (Fig. 10 e 11).

Foi também realizado o teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários segundo o sexo, estes dados estão alocados nas tabelas 12.1 a 12.16 do anexo 4.

O tratamento dos voluntários do sexo feminino, com NMSL elevou os valores médios de 314 ± 52.5 ($n=5$), para 594.2 ± 145.9 ($n=4$), após 4h significando um aumento percentual de 89.2%. Nos voluntários do sexo masculino, a elevação nos valores médios do TS (720.8 ± 119.2 , $n=6$) não foi significativa em relação ao basal (459.1 ± 31.1 , $n=7$) (Tab. 13, Fig 10). Cabe ressaltar que nos tempos 4h (ambos os sexos) e após 8h (sexo feminino), os valores médios do TS foram maiores que os valores de referência para esta técnica (BABSON & BABSON, 1987), indicando prolongamento do TS nestes períodos. Os valores individuais da amostra estão no anexo 5 (Tab. 13.1 a 13.6).

O tratamento com AAS (Tab. 13, Fig. 11) prolongou o TS dos voluntários do sexo feminino após 2h (1029.5 ± 272.05 , $n=4$) em relação ao basal (383.5 ± 68.7 , $n=4$), significando um aumento percentual de 168.3%. A tendência a elevação dos valores médios do TS nos voluntários do sexo masculino tratados com AAS não foi significativa em relação ao basal (322.5 ± 32.7 , $n=4$). Visto que nos períodos 2h, 4h, 8h e 24h após o tratamento, os valores médios foram maiores que os de referência para esta técnica, constatou-se então o prolongamento do TS nestes períodos. Os valores individuais estão apresentados no anexo 5 (Tab. 13.1 a 13.6)

TABELA 10 - Efeito do nimesulide (NMSL-100mg) e do ácido acetilsalicílico (AAS-100mg) sobre o Tempo de Sangramento (seg) (média ± erro padrão da média) e porcentagem de variação nos voluntários saudáveis, em reação aos períodos de tempo estudados.

	BASAL 0h	2h	4h	8h	24h	7dias
NMSL	398.7 ± 34.5 (n=12)	427.5 ± 34.1 (n=11) 7.2%	670.2 ± 89.5*** (n=10) 68.1%	577.5 ± 35.7**ab (n=4) 44.8%	491.5 ± 20.7 (n=10) 23.3%	464 ± 26.5 (n=5) 16.4%
AAS	353.0 ± 37.04 (n=08)	942.9 ± 140.5***ab (n=08) 167.1%	873.7 ± 130.1**a (n=8) 147.5%	990.0 ± 143.5***ab (n=5) 180.4%	887.3 ± 104.9**ab (n=8) 151.3%	496.7 ± 43.5 (n=6) 40%

BARTLETT - NMSL $F_{(5,7)} = 5.19$ $p < 0.0001$; AAS $F_{(5,7)} = 3.75$ $p < 0.0021$

ANOVA WELCH NMSL $F_{(5,16.7)} = 3.54$ $p < 0.02$ e AAS $F_{(5,16.4)} = 10.19$ $p < 0.0001$). Teste de DUNNET'S ** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$ comparado ao basal;

ANOVA WELCH - T0h - $F_{(1,16.5)} = 0.81$, $p > 0.05$; T2h - $F_{(1,10)} = 14.95$, $p < 0.05$; T4h $F_{(1,12.9)} = 1.7$, $p > 0.05$; T8h $F_{(1,4.5)} = 7.78$, $p < 0.05$; T24h $F_{(1,7.5)} = 13.69$, $p < 0.05$; T7d $F_{(1,7.9)} = 0.8$, $p > 0.05$. Teste de T' students ** $p < 0.05$ *** $p < 0.01$ - comparado ao outro tratamento.

Valor basal de referência para esta técnica: 138-570 seg. (SIMPLATE II R® -ORGANON TEKNICA)

Valores da amostra (16 voluntários), ver anexo 5 (Tab. 10.1 a 10.6)

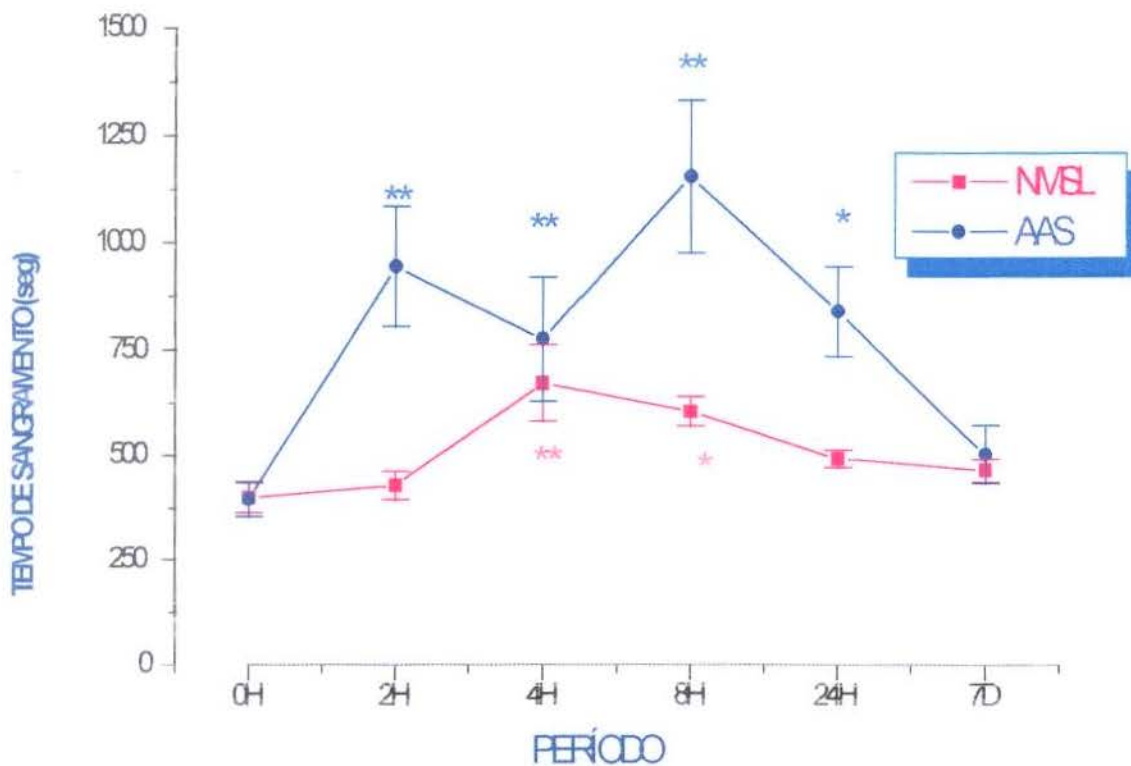


Figura 9 - Curva de variação do tempo de sangramento (em segundos) após a administração oral de nimesulide (NMSL - 100mg) e ácido acetilsalicílico (AAS - 100mg) em voluntários saudáveis. Cada ponto da curva representa a média ± erro padrão da média da determinação em 3 a 12 voluntários para cada droga estudada. O tempo de sangramento difere do valor basal (ANOVA WELCH NMSL $F(5,16.7)=3.54$ $p<0.02$ e AAS $F(5,16.4)=10.19$ $p<0.0001$). Teste de DUNNET'S $a^* p<0.05$; $a^{**} p<0.01$ comparado ao basal $* p<0.05$; $** p<0.01$.

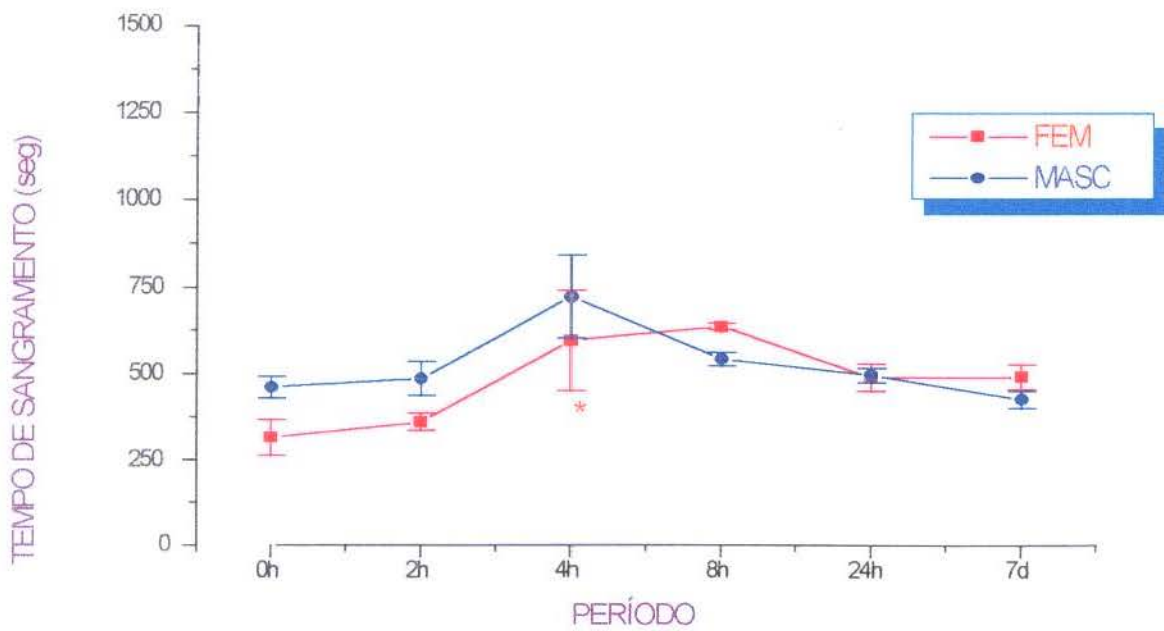


Figura 10 - O perfil da curva do tempo de sangramento (seg) antes e após o tratamento com nimesulide (NMSL-100mg, p.o) entre voluntários sadios do sexo masculino e feminino não diferem entre si nos períodos estudados (Teste t STUDENT - NMSL T0h -t(20) = 1.07, $p > 0.05$; T2h - t(9) = 2.15, $p > 0.05$; T4h t(8) = 0.67, $p > 0.05$; T8h t(2) = 3.9, $p > 0.05$, T24h t(8) = 0.15, $p > 0.05$; T7d t(3) = 1.3, $p > 0.05$). Cada ponto da curva é a média \pm erro padrão da média da determinação em 3 a 7 voluntários para cada sexo. No entanto, há diferença (WELCH ANOVA - NMSL MASC - $F(5, 6.7) = 1.95$ $p > 0.05$; FEM - $F(5, 7.0) = 10.1$ $p < 0.004$ entre as determinações após a intervenção farmacológica e o valor basal (0h) para ambos os sexos. Teste de Dunnett's * $p < 0.05$.

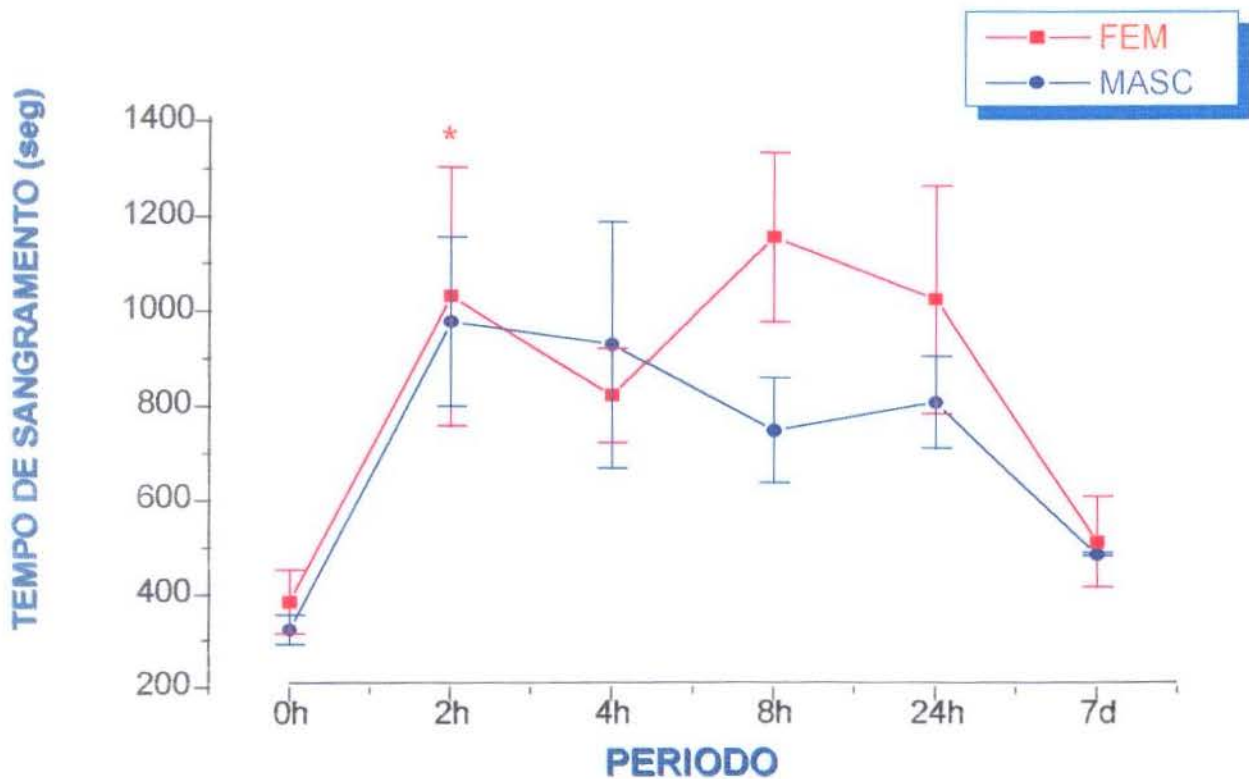


Figura 11 - O perfil da curva do tempo de sangramento (seg) antes e após o tratamento com ácido acetilsalicílico (AAS-100mg, p.o) entre voluntários sadios do sexo masculino e feminino não diferem entre si nos períodos estudados (Teste t'Student - AAS T0h - $t_{(6)} = 0.80$, $p > 0.05$; T2h - $t_{(8)} = 0.17$, $p > 0.05$; T4h $F_{(6)} = 0.39$; $p > 0.05$; T8h $t_{(3)} = 1.67$, $p > 0.05$; T24h $t_{(6)} = 1.0$, $p > 0.05$; T7d - WELCH ANOVA $F_{(1,2)} = 0.07$, t-test = 0.27 $p > 0.05$). Cada ponto da curva é a média \pm erro padrão da média da determinação em 3 a 7 voluntários para cada sexo. No entanto, há diferença (WELCH ANOVA AAS MASC - $F_{(5,5,5)} = 7.0$ $p < 0.02$; FEM - $F_{(5,6,5)} = 4.97$ $p < 0.03$) entre as determinações após a intervenção farmacológica e o valor basal (0h) para ambos os sexos. Teste de Dunnett's ^{a*} $p < 0.05$

TABELA 13- Efeito do nimesulide (NMSL-100mg) e do ácido acetilsalicílico (AAS-100mg) sobre o Tempo de Sangramento (seg) (média ± erro padrão da média) nos voluntários sadios, variação imposta pelo sexo período de observação.

	SEXO	NMSL	AAS
BASAL	MASC	459.14±30.3 (n=7)	322.5±32.7 (n=4)
	FEM	314.0±52.5 (n=5)	383.5±68.6 (n=4)
2h	MASC	485±48.5 (n=6)	975.7±178.2 ^{a*} (n=6)
	FEM	358.6±26.4 (n=5)	1029±178.2 ^{a*} (n=4)
4h	MASC	720.8±119.2 ^{a*} (n=6)	927.5±259.4 ^{a*} (n=4)
	FEM	594.2±145.9 ^{a*} (n=4)	852±83.18 (n=5)
8h	MASC	520±20.0 (n=2)	746±111.0 (n=2)
	FEM	635.0±25 (n=2)	1152.7±177 ^{a*} . (n=2)
24h	MASC	494.8±20.5 (n=5)	806±96 (n=5)
	FEM	488.2±38.8 (n=5)	1022.7±239.5(n=3)
7d	MASC	425.0±25.0 (n=2)	485.0±5.0 (n=2)
	FEM	490.0±36.1 (n=3)	510.0±96.4 (n=3)

BARTLET - NMSL - MASC - $F_{(5,7)} = 3.51$ $p < 0.0035$ FEM - $F_{(5,7)} = 2.44$ $p < 0.03$
 - AAS - MASC - $F_{(5,7)} = 2.98$ $p < 0.012$ FEM - $F_{(5,7)} = 1.43$ $p > 0.05$

WELCH ANOVA - NMSL MASC - $F_{(5,6,7)} = 1.95$ $p > 0.05$; FEM - $F_{(5,7,0)} = 10.1$ $p < 0.004$.

Teste de Dunnett's ^{a*} $p < 0.05$ comparado ao basal;

- AAS MASC - $F_{(5,5,5)} = 7.0$ $p < 0.02$; FEM - $F_{(5,6,5)} = 4.97$ $p < 0.03$.

Teste de Dunnett's ^{a*} $p < 0.05$ comparado ao basal;

BARTLET - NMSL T0h - $F_{(1,7)} = 0.59$, $p > 0.05$; T2h - $F_{(1,7)} = 1.72$, $p > 0.05$; T4h $F_{(1,7)} = 0.00$, $p > 0.05$; T8h $F_{(1,7)} = 0.49$, $p > 0.05$, T24h $F_{(1,7)} = 1.35$ $p > 0.05$; $F_{(1,7)} = 0.26$, $p > 0.05$

BARTLET - AAS T0h - $F_{(1,7)} = 1.31$, $p > 0.05$; T2h - $F_{(1,7)} = 0.16$, $p > 0.05$; T4h $F_{(1,7)} = 2.1$, $p > 0.05$; T8h $F_{(1,7)} = 0.35$; $p > 0.05$, T24h $F_{(1,7)} = 1.0$, $p > 0.05$; T7d $F_{(1,7)} = 8.55$, $p < 0.0034$

Teste t STUDENT - NMSL T0h - $t_{(20)} = 1.07$, $p > 0.05$; T2h - $t_{(9)} = 2.15$, $p > 0.05$; T4h $t_{(8)} = 0.67$, $p > 0.05$; T8h $t_{(2)} = 3.9$, $p > 0.05$, T24h $t_{(8)} = 0.15$, $p > 0.05$; T7d $t_{(3)} = 1.3$, $p > 0.05$. ^{b*} $p < 0.05$ comparação entre os sexos dentro do mesmo tratamento

-AAS T0h - $t_{(6)} = 0.80$, $p > 0.05$; T2h - $t_{(6)} = 0.17$, $p > 0.05$; T4h $F_{(6)} = 0.39$; $p > 0.05$; T8h $t_{(3)} = 1.67$, $p > 0.05$; T24h $t_{(6)} = 1.0$, $p > 0.05$; T7d - WELCH ANOVA $F_{(1,2)} = 0.07$, t-test = 0.27 $p > 0.05$ - ^{b*} $p < 0.05$ comparação entre os sexos dentro do mesmo tratamento

Valor basal de referência para esta técnica: 138-570 seg. (SIMPLATE II R® -ORGANON TEKNICA)

Valores da amostra (16 voluntários), ver anexo 5 (Tab. 13.1 a 13.6)

6 - DISCUSSÃO

EFEITO DO NMSL E DO AAS SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E A PRODUÇÃO DE TXA₂, *IN VITRO*

Os resultados da atividade do NMSL sobre a agregação plaquetária, *in vitro*, induzida pelos cinco agonistas utilizados evidencia um efeito inibitório de modo concentração-dependente. Esta atividade foi independente do agente agregante utilizado, estando em parte, em conformidade com os achados de CESERANI et al.⁵⁴, (1993).

VIGDHAL & TUKEY²²¹, (1977), também estudaram a atividade antiagregante do NMSL *in vitro* usando somente AA (0.3mM) como agonista, obtendo uma inibição também do tipo concentração - dependente e uma IC₅₀ de 8.5µM inferior a do AAS (IC₅₀ > 1000µM), sendo portanto, o NMSL mais potente que este último.

Entretanto, nossos achados revelam que as concentrações necessárias para inibir 50% da agregação plaquetária foram em média 8 a 96 vezes superiores as do AAS para os agonistas AA, ADP, COL e ADR, indicando menor potência do NMSL para este efeito quando comparado ao AAS; exceção feita quando o agonista foi o PAF, pois NMSL foi cerca de 180 vezes mais potente que o AAS.

Nos estudos realizados por O'BRIEN¹⁶⁶, (1968) e ZUCKER & PETERSON²³⁶, (1968) os mesmos afirmaram que o AAS promove inibição máxima da função plaquetária em concentrações relativamente baixas (<50µM) tanto *in vivo*, quanto *in vitro* e que a inibição é seletiva, no sentido de que o AAS parece ser mais efetivo em inibir a liberação induzida por alguns agentes (ADP e COL) que por outros (trombina). De modo similar, os valores que foram obtidos para a IC₅₀ do AAS neste estudo estão de acordo com esses achados da literatura reforçando a hipótese que o NMSL seja menos potente que o AAS, *in vitro*.

A inibição da 2^o onda de agregação obtida tanto após o acréscimo de AAS ao PRP, quanto ao acréscimo de NMSL indicam atividade inibidora da COX-plaquetária, pois esta 2^a onda de agregação se caracteriza por ser irreversível e é acompanhada da secreção de ADP e TXA₂ (COLMAN⁶³, 1986). A hipótese sugerida é de que o NMSL parece ser menos ativo sobre a COX plaquetária, atualmente referida como COX-1 (constitutiva) (VANE & BOTTING²¹⁶, 1995) do que o AAS.

A descoberta da isoforma induzível (COX-2) (XIE et al.²³³, 1991) permitiu uma reinterpretação e refinamento da teoria geral de que a inibição da atividade da COX explica os efeitos terapêuticos e colaterais das drogas NSAIDs (VANE²¹⁵, 1971). A COX-2 é induzida em células migratórias e outras células pelo estímulo inflamatório, presumivelmente através da produção de citocinas (SANO et al.¹⁹⁷, 1992). Portanto, é aceito atualmente que as ações antiinflamatórias dos NSAIDs são devidas à inibição da COX-2, enquanto os efeitos indesejáveis, tais como gastrotoxicidade e nefrotoxicidade, bem como alterações na hemostasia, são devidas à inibição da COX-1 constitutiva. Os estudos feitos por MITCHELL et al.¹⁵¹, (1994) mostraram que o AAS foi cerca de 42 vezes mais potente contra COX-1 do que COX-2, validando, desta forma, nossos achados, pois concentrações inferiores àquelas requeridas para a atividade antiinflamatória (ação sobre COX-2) do AAS foram encontradas em nossos estudos, como capazes de inibir a agregação plaquetária (ação sobre COX-1), *in vitro*, independentemente do agonista utilizado.

A IC₅₀ do NMSL necessária para inibir a agregação induzida por ADP é cerca de seis vezes superior à concentração máxima de NMLS encontrada no plasma (110µM) após um comprimido de 100mg da droga. Sendo considerado um agonista fisiológico, o ADP tem habilidade em induzir secreção depende da capacidade da plaqueta em sintetizar PGs e a agregação é inibida por drogas tipo AAS e indometacina (CHARO et al.⁵⁵, 1977), significando baixa potência e inespecificidade do NMSL para este tipo de efeito.

Esta seletividade de ação do NMSL sobre a COX, foi verificada em estudos anteriores de mucosa gástrica por vários autores (RUFER et al.¹⁹², 1982; CASCIARI et al.⁴⁸, 1984; CARR et al.⁴⁷, 1986) na tentativa de justificar a elevada tolerabilidade desta droga em relação aos demais NSAIDs.

Mais recentemente, o trabalho de MAGNI¹³³, (1993), também mostra que o NMSL apresenta ação discreta sobre o metabolismo do AA em alguns órgãos (pulmão, rins, estômago etc.) que normalmente são afetados pelos NSAIDs com ação mais efetiva sobre tecidos inflamados. Esta seletividade de ação foi explicada mais tarde, em 1995, nos trabalhos de VAGO et al.²¹⁴, e TAVARES et al.²⁰⁹, que referem à seletividade de ação do NMSL sobre a COX-2 nos ensaios realizados em leucócitos estimulados e mucosa gástrica. Assim, de modo similar, nossos resultados apontam um efeito discreto do NMSL sobre a COX-1 constitutiva.

É interessante ressaltar, que a atividade antiagregante do NMSL não apresenta o mesmo tipo de perfil observado para o AAS, isto é, observamos que o AAS inibe a agregação, *in vitro*, em concentrações que variam dentro de um intervalo muito pequeno (3 a 8 μ M) independentemente do agonista utilizado. No entanto, o NMSL apresentou relativa seletividade, isto é, mostrou-se mais efetivo em inibir a agregação induzida por alguns agentes, como por exemplo PAF (0.02 μ M) do que por outros como o ADP (625 μ M), num intervalo de concentração muito amplo.

Pode ser que somente a inibição seletiva da COX-2, ou melhor esclarecendo, a atividade discreta sobre COX-1, não explique o efeito inibitório do NMSL sobre a agregação plaquetária. Destaca-se a potente inibição dos efeitos do PAF, onde a IC₅₀ (0.02 μ M) foi cerca de 5500 vezes menor que aquela atingida após doses terapêuticas da droga (110 μ M). Segundo BRAQUET et al.³⁷, (1987) o PAF induz agregação plaquetária e a reação de liberação dos grânulos densos e alfa do homem, somente na presença de Ca⁺² e metabolismo energético, sendo independente do ADP e dos metabólitos do AA. Embora em plasma humano citratado, o PAF produza uma agregação bifásica, similar ao ADP e ADR, a segunda fase envolve a

liberação de TXA₂ que pode ser inibida por drogas como AAS. O PAF atua estimulando a atividade da trifosfatase de guanosina (GTPase) em membranas de plaquetas de modo dose depende. Estimula também o metabolismo do inositol através da proteína G.. Assim, a interferência com o PAF altera um ou mais destes mecanismos, diminuindo a ativação plaquetária.

É sabido que drogas que interferem com o Ca²⁺ intracelular também interferem com a resposta celular ao PAF, *in vitro*, (BRAQUET et al.³⁷, 1987). Estão incluídos agentes os quais atuam diretamente, tal como bloqueadores dos canais de Ca²⁺ (KHAN et al.¹¹⁵, 1985), substâncias quelantes de Ca²⁺ (MCINTYRE & SHAW¹⁴¹, 1983) ou indiretamente pela modulação do nível de nucleotídeo cíclico, por exemplo PGI₂ ou PGE₁ (CAMUSSI et al.⁴³, 1983) e inibidores de PDE (VARGAFTIG et al.²¹⁷, 1984).

Alguns autores, como o grupo do VERHOEVEN et al.²¹⁹, em 1993, mostraram que a inibição da PDE IV em basófilos humanos promove diminuição da liberação de PAF pelos mesmos.

Como descrito por BEVILCQUA et al.²³, (1994), o NMSL atua no metabolismo oxidativo de leucócitos PMN por interferir com a PDE IV e assim, eleva os níveis de AMPc nestas células. Talvez, uma das hipóteses para este efeito inibitório do NMSL sobre a ação do PAF seja, justamente, através da inibição da PDE da plaqueta (PDE III) interferindo, desta forma, com os níveis de AMPc, Ca²⁺ e, conseqüentemente na ativação plaquetária induzida por PAF.

No entanto, esta hipótese não explicaria o efeito seletivo e potente do NMSL sobre a ativação induzida por PAF, pois a elevação intracelular do AMPc na plaqueta, praticamente inibiria todos os outros agonistas e, portanto, este poderia ser um dos mecanismos do NMSL que explicaria parte de seu efeito antiagregante com os outros agonistas.

Seria interessante que ensaios mais conclusivos fossem realizados para verificar esta atividade do NMSL sobre a PDE plaquetária.

Outro ponto que deve ser destacado é a relação do tempo de incubação do NMSL sobre seu efeito antiagregante. A agregação induzida por PAF foi inibida em 62.5% com um período de incubação com NMSL de

30 seg elevando-se a 87.8% e 90.7% após 1 e 3 min, respectivamente. Destaca-se também, a rápida eficiência na inibição da agregação induzida por ADR após 1min de incubação. Estes achados podem indicar uma ação direta da droga nos sítios alvos destes agonistas, uma vez que o efeito destes agonistas é mediado por receptores específicos na superfície da plaqueta, alguns dos quais têm sido identificados como glicoproteínas (PHILIPS et al.¹⁷⁴, 1988). Porém, como nenhum trabalho desta natureza com o NMSL tenha sido descrito na literatura, fica difícil inferir algo mais consistente sobre o assunto. Na revisão feita por WEISSMAN²²⁸, (1991), destaca-se que o AAS e outros NSAIDs apresentam seu efeito antiinflamatório não somente devido ao seu efeito inibidor da COX mas também devido sua habilidade para romper interações nos limites da membrana celular, ou seja, com sítios de codificação de sinais do meio externo ao meio interno. Pode ser que o NMSL também apresente esta propriedade que vem sendo apontada para outros NSAIDs em alguns dos trabalhos realizados por ABRAMSON & WEISSMANN¹, (1989).

Em relação ao envolvimento do TXA₂ no efeito do NMSL, sua interferência significativa na produção de TXA₂ iniciou-se em concentrações inferiores (10-30µM) àquelas alcançadas após dose oral de um comprimido de 100mg (110µM), exceção feita quando os agonistas foram AA e ADR (≥100µM), onde a produção de TXA₂ só foi inibida significativamente em concentrações iguais ou superiores a 100µM.

Os resultados obtidos demonstram que, embora tenha havido redução significativa da produção de TXA₂ e de modo concentração - dependente, uma inibição próxima de 80%, que significaria certamente inibição da 2ª. onda de agregação, só foi atingida em concentrações acima da terapêutica para os agonistas AA, COL, ADP e ADR, exceção feita ao PAF cuja inibição de 78% da produção de TXA₂ foi atingida com 0.1µM.

Interessante notar, que embora as IC₅₀ para o efeito antiagregante plaquetário tenham sido obtido em concentrações próximas da terapêutica para os agonistas AA, ADR e COL, exceção novamente feita à inibição quando os agonistas são o PAF (concentração muito inferior a

terapêutica) e o ADP (concentração muito superior a terapêutica), a produção de TXA₂ estava somente parcialmente inibida. Estes resultados demonstram que o efeito inibitório do NMSL sobre a agregação é, em parte, mediado pela inibição da produção de TXA₂, reforçando a hipótese de que outros mecanismos ação do NMSL estejam envolvidos, ou que esta droga apresenta baixa atividade inibitória sobre a COX-1 plaquetária.

Os resultados observados para o AAS indicam uma poderosa ação inibitória sobre a COX plaquetária, uma vez que a produção de TXA₂ estava quase 100% inibida na concentração de 10µM, que foram justamente os valores obtidos para IC₅₀ do AAS para os vários agonistas utilizados, estando estes dados em conformidade com a literatura citada anteriormente.

EFEITO DO NMSL E DO AAS SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E A PRODUÇÃO DE TXA₂, EX VIVO

Nossos resultados demonstram que a administração oral (cp. 100mg) de NMSL não inibe a agregação plaquetária induzida pelos agonistas ADP, AA, PAF e ADR. Estes resultados se opõem àqueles obtidos no trabalho descrito por CESERANI et al.⁵⁴, (1993). Estes autores trabalharam com preás, em um ensaio *ex vivo*, verificando justamente o efeito inibitório do NMSL sobre a agregação induzida por estes mesmos agonistas. Embora seu trabalho não explicita bem a dose utilizada, os autores referem que a capacidade inibitória é aumentada com a administração de doses repetidas, representando um efeito tipo cumulativo. Talvez, a variabilidade biológica, espécies diferentes, ou mesmo esquema posológico e dosagem, neste caso, sejam fatores importantes de influência. O NMSL também não foi capaz de inibir significativamente a produção de TXA₂ em nenhum dos tempos estudados, exceção feita quando o agonista foi o PAF, onde a produção de TXA₂ foi significativamente inibida em todos os períodos estudados após a administração desta droga.

Deste modo, parece que os efeitos observados *in vitro*, foram mantidos quando da administração da droga aos voluntários, somente sobre a interferência do NMSL, na via mediada pelo PAF (CHIGNARD et al.⁵⁷, 1980).

Assim, verifica-se que o efeito antiagregante do NMSL, *in vitro*, sofre interferência quando a droga é administrada e submetida a ensaio *ex vivo*, talvez, pela própria cinética da droga no organismo, ou seja, metabolismo de primeira passagem, distribuição da droga, ou devido ao tempo que a concentração inibitória da droga permaneça no plasma em contato com a plaqueta permitindo, desta forma, que a droga penetre na mesma e consiga inibir seus mecanismos de ativação e secreção. Nossos resultados sugerem que o NMSL venha a interferir principalmente na agregação mediada pelo PAF, por uma atuação da droga nos limites da membrana plaquetária e não a nível de citosol.

Com relação aos resultados obtidos após administração de AAS (cp-100mg) aos voluntários sadios, nossos achados estão de acordo com aqueles encontrados na literatura, ou seja, AAS inibiu significativamente a agregação plaquetária nos tempos estudados com os quatro agonistas utilizados. Este efeito foi acompanhado de redução significativa da produção de TXA₂ como descrito também nos trabalhos de FITZGERALD et al.⁷⁷, (1983); CERLETTI et al.⁵², (1985); CARDONA et al.⁴⁶, (1992); TOHGIO et al.²¹², (1992) BÖRGER et al.³¹, (1993), entre muitos outros.

EFEITO DO NMSL E DO AAS SOBRE O TEMPO DE SANGRAMENTO, *IN VIVO*

Nossos resultados mostram que o tratamento com NMSL prolongou significativamente o TS ($p < 0.01$) após 4h mantendo-se alterado até 8h e sendo normalizado às 24h após.

A elevação significativa dos valores médios do TS nos voluntários tratados com AAS, em relação aos valores basais (antes da

administração) ocorreram a partir de 2h mantendo-se até 24h e sendo posteriormente restaurados após 7 dias. Estes valores médios foram superiores àqueles após tratamento com NMSL nos tempos 2h e 24h após, sendo que nos demais tempos não houve diferença estatisticamente significativa.

Comparando os dois tratamentos verifica-se que o AAS promove um aumento médio do TS em valores acima de 90% enquanto, o aumento médio promovido com o uso de NMSL não excede 68% e por um intervalo razoavelmente curto (4h).

Nossos achados estão em conformidade com aqueles encontrados por ARAUJO & MATTOS-FILHO⁶, (1996). Estes autores em um ensaio realizado em ratos, utilizando a técnica de DUKE⁶⁸, (1910), verificaram que o tratamento com NMSL (6mg/Kg, dividido em 2 doses com intervalo de 12h) promoveu aumento dos valores médios do TS, de modo crescente nos tempos 2h até 72h em relação aos valores basais, significando uma elevação em média de 20% do TS, porém não ultrapassando os valores de referência para a técnica, em ratos.

O prolongamento que NMSL promoveu nos tempos 4h e 8h excede em 17.6 % e 1.3% os valores referência para esta técnica empregada (570 seg., BABSON & BABSON¹¹, 1978), respectivamente. Enquanto o AAS promoveu elevações de 65.4%, 53.2%; 73.7% e 55.6% nos períodos 2h, 4h, 8h e 24h, respectivamente, estão em correspondência aos achados de MIELKE¹⁴⁵, (1983), O'BRIEN¹⁶⁶, (1968) e O'BRIEN et al.¹⁶⁷, (1970), que também verificaram alterações no TS mediante o uso de AAS em dose única ou em múltiplas doses, em voluntários sadios.

A utilização do AAS prolonga o TS através de uma alteração na função qualitativa plaquetária. A alteração qualitativa promovida pelo AAS deve-se à inibição irreversível da COX-1 plaquetária (ROTH et al.¹⁹¹, 1975) a qual é requerida para a produção de endoperóxidos e, posteriormente, TXA₂, os quais participam fundamentalmente na manutenção da hemostasia primária através da amplificação da agregação plaquetária e vasoconstrição (HAMBERG et al.⁹⁴, 1975). A acetilação da COX-1 ocorre em poucos minutos (ROTH & SIOK¹⁹⁰, 1978) e esta reação também afeta os megacariócitos da

medula (BURCHANN & MAJERIUS⁴², 1979). Uma vez que as plaquetas maduras não sintetizam nova enzima, o defeito persiste por toda a vida destas plaquetas em circulação (7 a 10 dias), daí o prolongamento do TS persistir por pelo menos 7 dias. Segundo BURCH et al.⁴⁰, (1978a) em um indivíduo adulto, ocorre 95% de inativação da COX com uma dose diária de 325mg e 86% de inativação com uma dose de 100mg. A COX da parede vascular, entretanto, parece ser menos sensível à acetilação pelo AAS (BURCH et al.⁴¹, 1978b). Além do mais, as células endoteliais são capazes de ressintetizar a COX por serem nucleadas, diferenciando-se das plaquetas que são anucleadas. Assim, uma única dose baixa de AAS inibe notavelmente a síntese plaquetária de TXA₂, enquanto afeta só minimamente a síntese de PGI₂ na parede vascular, favorecendo desta forma a ação deste último que é um potente antiagregante plaquetário e vasodilatador (MONCADA & KORBET¹⁵³, 1978) opondo-se ao mecanismo de hemostasia primária.

Similarmente ao AAS, o mecanismo de ação dos NSAIDs parece ser a inibição da atividade da COX-1 plaquetária. No entanto, em contraste com o AAS cada um destes agentes tem somente um efeito temporário sobre a função da COX plaquetária causando inibição da enzima somente enquanto determinada concentração da droga está presente no plasma. Por esta razão, dentre estas drogas somente o piroxicam, que tem uma meia vida biológica de mais de dois dias, afeta as plaquetas por um período maior que as outras drogas do grupo (EGEM et al.⁶⁹, 1976; ALI & McDONALD³, 1978; BURCHANN & MAJERIUS⁴², 1979).

De um modo geral, estes NSAIDs prolongam o TS minimamente, efeito este transitório e com uma intensidade menor que aquela produzida pelo AAS. A COX plaquetária é reversivelmente inibida pela indometacina e irreversivelmente inibida pelo AAS (ROTH et al.¹⁹¹, 1975, ALI & McDONALD³, 1978; BURCHANN & MAJERIUS⁴², 1979), embora, segundo MITCHELL et al.¹⁵¹, (1994) a capacidade da indometacina em inibir a COX-1 seja 50 vezes maior que sua eficácia em inibir COX-2.

O NMSL, portanto, apresenta o mesmo padrão de resposta que a maioria dos NSAIDs com relação ao prolongamento do TS, mesmo porque

os trabalhos recentes de VAGO et al.²¹⁴, (1995) e TAVARES et al.²⁰⁹, (1995) mostram a discreta atividade desta droga em inibir a atividade da COX-1, daí a baixa interferência do NMSL na função plaquetária *in vivo*.

Assim, o NMSL *in vivo* apresenta menor interferência sobre a função qualitativa plaquetária do que o AAS, justificado pela sua pequena habilidade em inibir a COX-1 em relação ao AAS sendo de 42x, segundo MITCHELL et al.¹⁵¹, 1994.

Se por um lado estamos diante de uma droga que parece não ter influência significativa na hemostasia, assegurando seu uso em intervenções cirúrgicas, pelo menos até 8h antes, por outro lado, apesar da enorme tolerabilidade gástrica da mesma, não poderia ser utilizada no tratamento de cardiopatias em substituição ao AAS, devido a sua baixa atividade intrínseca neste sistema.

7 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos dentro das condições estabelecidas neste experimento, permitiram concluir que a droga nimesulide:

- promove inibição da agregação plaquetária, *in vitro*, de modo concentração e tempo-dependente, independente do agonista utilizado;
- apresenta seletividade de ação para o efeito antiagregante, ou seja, parece ser distintamente mais efetiva em inibir, *in vitro*, a agregação por alguns agentes como PAF, COL, AA e ADR do que por ADP;
- promove inibição máxima da função plaquetária em concentrações relativamente elevadas ($> 300\mu\text{M}$) *in vitro*, excedendo em pelo menos 3 vezes o $C_{\text{máx}}$ desta droga ($110\mu\text{M}$);
- é menos potente que o AAS para inibir a agregação induzida pelos agentes ADP, COL, AA e ADR;
- é mais potente que o AAS para inibir a agregação induzida por PAF, sugerindo interferência específica na agregação induzida pelo mesmo;
- interfere com a síntese de TXA_2 , *in vitro*, em concentrações superiores a encontrada no plasma após dose terapêutica, desta maneira sendo menos efetivo sobre a COX-1 plaquetária que o AAS;
- a rápida inibição da agregação (< 3 min), por esta droga quando em contato com o PRP sugere habilidade para romper interações nos limites da membrana plaquetária entre o agonista e seu sítio alvo, destaca-se o efeito sobre o PAF (30seg);
- administrada em dose única de 100mg no organismo, não evidencia atividade antiagregante e a interferência na síntese de TXA_2 só é observada quando o agonista utilizado é o PAF, confirmando a interferência desta droga na função plaquetária através de outro mecanismo, que ação sobre a COX;
- interfere com o tempo de sangramento com latência de 4h e duração também de 4h, sugerindo que seu mecanismo inibitório sobre a função qualitativa plaquetária seja reversível como os demais NSAIDs e não como ocorre com o AAS que é irreversível e dependente da meia vida plaquetária.

ANEXOS

ANEXO 1 - Informação e consentimento pós-informação para pesquisa clínica:

- Estudo do efeito do nimesulide sobre a agregação plaquetária, *ex vivo*
- Estudo do efeito do nimesulide sobre o tempo de sangramento, *in vivo*

ANEXO 2 - Ficha de caracterização do voluntário

ANEXO 3 - Documento da Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da USF

ANEXO 4 - Tabelas suplementares contendo a média \pm epm e a estatística referente às figuras ilustrativas.

ANEXO 5 - Tabelas suplementares dos resultados individuais da amostra

ANEXO 1

ESTUDO DO EFEITO DO NMSL SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA, EX VIVO

INFORMAÇÃO E CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO PARA PESQUISA CLÍNICA

VOLUNTÁRIO: _____

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas pelo Prof. Dr. Gilberto de Nucci, Prof. Dr. Thales R. Mattos Filho e Profa. Luciane C. L. Araujo, objetivando firmar acordo por escrito mediante o qual o indivíduo, objeto da pesquisa, autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

I - TÍTULO DO TRABALHO EXPERIMENTAL

"Estudo comparativo dos efeitos do nimesulide e AAS sobre a agregação plaquetária, tempo de sangramento e produção de TXA_2 em voluntários sadios".

II OBJETIVO

Avaliar o efeito do nimesulide na função plaquetária e compará-lo quantitativamente e qualitativamente àquele promovido pelo AAS.

III - JUSTIFICATIVA

- efeito do AAS vem sendo bastante estudado e seus achados estão bem documentados na literatura. Porém é sabido que seu mecanismo antiagregante ainda não foi totalmente descoberto, havendo atualmente várias teorias propostas para tal efeito. Acrescenta-se a isto, que o AAS é praticamente a única droga utilizada mundialmente para prevenir formação de trombos plaquetários com eficácia satisfatória. Outras drogas do mesmo grupo, isto é, antiinflamatórios não esteroidais apesar de apresentarem tal propriedade, clinicamente não promovem efeitos antiagregantes prolongados que justifiquem sua utilização. O nimesulide é uma droga relativamente nova, que ainda não foi estudada detalhadamente sobre estes aspectos. A vantagem da utilização desta droga, é que a mesma apresenta tolerabilidade maior que

o AAS e menor capacidade lesiva da mucosa gástrica. Em sua estrutura química pode-se observar a presença de um NO₂ que possivelmente lhe confere propriedades diferentes do AAS.

IV - PROCEDIMENTOS DO EXPERIMENTO

O voluntário será submetido a duas fases de experimentação. Antes de iniciar os tratamentos, será coletado do mesmo amostra de sangue para verificar a função plaquetária sem a interferência de qualquer droga. Para tanto, o voluntário em jejum (8h), será sentado com o braço na posição supina, na mesma altura do coração sobre um suporte firme, com a superfície volar exposta. Um butterfly No. 21 será conectado à veia cubital média. Será coletado 20 ml de sangue em citrato de sódio 3.8% (9:1 v/v). Nem o voluntário, nem o pesquisador souberão quais das drogas será administrada. Esta informação será guardada até o final da pesquisa pelo orientador do projeto. Após isto, será entregue um envelope contendo uma das duas drogas ou AAS o Nimesulide e o mesmo, ainda em jejum, deverá tomar o comprimido com um copo de água. Passado 2h e 4h, será realizada nova coleta de sangue para a avaliação da agregação plaquetária com os vários agentes agonistas selecionados.

V- DESCONFORTOS OU RISCOS ESPERADOS

O desconforto será a picada da agulha para retirada do sangue e para a verificação do tempo de sangramento. Além disto poderão aparecer náuseas e prolongamento do tempo de sangramento.

VI - INFORMAÇÕES

O voluntário tem a garantia de que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa.

Também os pesquisadores supra citados assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando.

VII - RETIRADA DO CONSENTIMENTO

O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo.

VIII - CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

EU _____,
portador do certificado que tendo lido as informações acima e suficientemente esclarecido(a) de todos os itens pelos Profs. Dr. Gilberto de Nucci, Prof. Dr. Thales Rocha Mattos-Filho e Profa. Luciane C.L. Araujo, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a execução do trabalho de pesquisa, exposto acima, em mim.

_____, de _____ de 1995.

NOME (LEGÍVEL) _____
RG _____

ANEXO 1

ESTUDO DO EFEITO DO NIMESULIDE SOBRE O TEMPO DE SANGRAMENTO

INFORMAÇÃO E CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO PARA PESQUISA CLÍNICA

VOLUNTÁRIO: _____

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas pelo Prof. Dr. Gilberto de Nucci, Prof. Dr. Thales R. Mattos Filho e Profa. Luciane C. L. Araujo, objetivando firmar acordo por escrito mediante o qual o indivíduo, objeto da pesquisa, autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

I - TÍTULO DO TRABALHO EXPERIMENTAL

"Estudo comparativo dos efeitos do Nimesulide e do AAS sobre a agregação plaquetária, tempo de sangramento e produção de TXA₂ em voluntários sadios".

II OBJETIVO

Avaliar o efeito do nimesulide na função plaquetária e compará-lo quantitativamente e qualitativamente àquele promovido pelo AAS.

III - JUSTIFICATIVA

O efeito do AAS vem sendo bastante estudado e seus achados estão bem documentados na literatura. Porém, é sabido que seu mecanismo antiagregante ainda não foi totalmente descoberto, havendo atualmente várias teorias propostas para tal efeito. Acrescenta-se a isto, que o AAS é praticamente a única droga utilizada mundialmente para prevenir formação de trombos plaquetários com eficácia satisfatória. Outras drogas do mesmo grupo, isto é, antiinflamatórios não esteroidais apesar de apresentarem tal propriedade, clinicamente não promovem efeitos antiagregantes prolongados que justifiquem sua utilização. O nimesulide é uma droga relativamente nova, que ainda não foi estudada detalhadamente sobre estes aspectos. A vantagem da utilização desta droga, é que a mesma apresenta tolerabilidade maior que o AAS e menor capacidade lesiva da mucosa gástrica. Em sua

estrutura química pode-se observar a presença de um NO₂ que possivelmente lhe confira propriedades diferentes do AAS.

IV - PROCEDIMENTOS DO EXPERIMENTO

No laboratório, o voluntário, em jejum de 8h, será sentado com o braço na posição supina, na mesma altura do coração sobre um suporte firme, com a superfície volar exposta. Em uma área da parte muscular do antebraço, distante da fossa antecubital, evitando veias superficiais, cicatrizes e contusões, a determinação do Tempo de Sangramento (TS) será realizada, com um dispositivo denominado Simplate® (ORGANON TEKNIKA). Um manguito de esfigmomanômetro com pressão de 40 mmHg será colocado na parte superior do braço que estava sendo realizado o TS. A antissepsia será realizada com álcool 70% e o dispositivo será acionado. Neste momento será disparado o cronômetro e de 30 em 30 segundos o sangue será limpo com papel de filtro tomando-se o cuidado de não encostar nas bordas do corte para não alterar o tampão plaquetário. O procedimento será repetido a cada 30 segundos até não haver mancha de sangue no papel de filtro. Neste momento o cronômetro será parado, registrando-se o tempo decorrido, representando este o TS. O TS será repetido antes da administração do medicamento, 2h, 4h, 8h, 24h e 7 dias após o tratamento. Logo em seguida, da primeira mediada do TS (basal), a cada voluntário será entregue um envelope contendo uma das duas drogas, ou AAS ou o Nimesulide e o mesmo deverá ingeri-la com água. Nem o voluntário, nem o pesquisador saberão qual das drogas estará fazendo uso. Esta informação será guardada pelo orientador. Terminado esta fase, o voluntário aguardará 20 dias e então participará da Fase B, que segue o mesmo procedimento excetuando que a droga do envelope será a outra. Caracterizando desta forma, experimento duplo-cego, 'cross-over' e aleatório.

V- DESCONFORTOS OU RISCOS ESPERADOS

O desconforto será a picada da agulha para retirada do sangue e a possível formação de cicatriz no local onde for realizado a determinação do TS. Além disto, pode aparecer sensação de dor epigástrica, náuseas e prolongamento do tempo de sangramento.

VI - INFORMAÇÕES

O voluntário tem a garantia de que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa.

Também os pesquisadores supra citados assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando.



VII - RETIRADA DO CONSENTIMENTO

O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo.

VIII - CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

EU

_____, portador do _____ certifico que tendo lido as informações acima e suficientemente esclarecido(a) de todos os itens pelos Prof. Dr. Gilberto de Nucci, Prof. Dr. Thales R. Mattos Filho e Profa. Luciane C.L. Araujo, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a execução do trabalho de pesquisa, exposto acima, em mim.

_____, de ____

de 1996.

NOME (LEGÍVEL) _____

RG _____

ASSINATURA _____

ANEXO 2

FICHA No. _____

NOME _____

IDADE: _____ SEXO _____ COR: _____
 ESTATURA: _____ PESO (Kg) _____
 ENDEREÇO: _____

CIDADE: _____

PROFISSÃO: _____

DIA DO CICLO MENSTRUAL (O 1º dia da sua última menstruação é o dia 1) _____

FAZ USO CONTÍNUO DE ALGUM MEDICAMENTO? _____

ESTÁ ATUALMENTE REALIZANDO ALGUM TRATAMENTO RADIOLÓGICO OU FARMACOLÓGICO? _____

APRESENTA ALGUMA PATOLOGIA? _____

FASE A:

DROGA ADMINISTRADA _____

DATA: ____/____/____

TEMPO DE SANGRAMENTO (TS)

PERÍODOS	HORÁRIOS	VALORES OBTIDOS
0h		
2h		
4h		
8h		
24h		
7dias		

OBS.

—

CONTAGEM DE PLAQUETAS

--

HEMOGRAMA

HEMATÓCRITO	
LEUCÓCITOS	
HEMÁCEAS	
HEMOGLOBINA	

LEUCÓCITOS DIFERENCIAL

OBS. _____

FICHA Nº. _____

COAGULOGRAMA

PROVA DO LAÇO:

PRESSÃO MÁXIMA	PRESSÃO MÍNIMA	MÉDIA	Nº PETÉQUIAS

TTPA	
TP	
RETRAÇÃO COÁGULO	
FIBRINOGENIO (TT)	

obs.

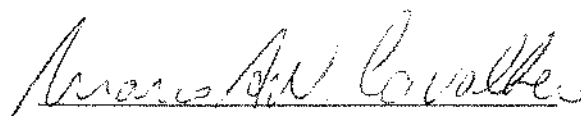
ANEXO 3

**PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA DA
UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO**

Bragança Paulista, 28 de março de 1995

Para: Profa. Luciene C. L. Araújo
Da: Comissão de Ética Médica do Hospital Universitário São Francisco
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade São Francisco

A Comissão de Ética Médica do Hospital Universitário São Francisco, através de reunião entre seus membros, deu posição favorável para a realização do **Estudo Comparativo da Atividade Antiagregante Plaquetária do Nmesulide e da Aspirina em Voluntários Sadios**, da Profa. Luciane C. L. Araujo, orientada pelo Prof. Dr. Gilberto de Nucci, dentro das condições apresentadas no prospecto enviado a esta comissão.



Prof. Marco Antonio N. Cavallero
Membro da Comissão de Ética Médica
Universidade São Francisco

ANEXO 4

TABELAS SUPLEMENTARES CONTENDO A
MÉDIA \pm EPM E A ESTATÍSTICA
REFERENTE ÀS FIGURAS
ILUSTRATIVAS.

TABELA 1 - Efeito inibitório do NMSL (%) sobre a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico (AA 1mM), ADP (1 μ M), fator ativador plaquetário (PAF 1-3 μ M), colágeno (2.5-5.0 μ g/ml) e adrenalina (ADR 10 μ M). O NMSL foi pré-incubado (20min.) com PRP, em concentrações variando de 0.0001 μ M a 1000 μ M. Os resultados representam as médias de 7-9 experimentos \pm o erro padrão das médias.

NMSL (μ M)	AGREGANTES				
	AA	ADR	ADP	COL	PAF
0.0001	ND	ND	ND	ND	2.2 \pm 1.3*
0.001	ND	ND	ND	ND	20.7 \pm 6.5*
0.003	ND	ND	ND	ND	42.9 \pm 19.3*
0.01	ND	ND	ND	ND	72.3 \pm 21.3*
0.1	ND	ND	ND	ND	81.8 \pm 12.0
0.3	ND	ND	ND	ND	83.9 \pm 11.0
1.0	ND	11.0 \pm 11.0*	ND	19.8 \pm 11.7*	84.2 \pm 10.6
3.0	ND	18.6 \pm 13.9*	ND	30.7 \pm 14.0*	85.8 \pm 10.2
10.0	3.76 \pm 2.6*	33.2 \pm 14.9*	6.7 \pm 3.2*	44.3 \pm 19.7*	88.6 \pm 8.5
30.0	35.8 \pm 14.7*	42.6 \pm 16.8*	13.1 \pm 4.3*	50.4 \pm 15.7*	91.2 \pm 7.8
100.0	66.1 \pm 16.8	75.9 \pm 11.6	15.4 \pm 3.8*	74.0 \pm 12.0	97.4 \pm 2.6
300.0	88.3 \pm 11.6	92.7 \pm 4.1	24.6 \pm 3.5*	97.1 \pm 2.1	100 \pm 0
1000.0	100 \pm 0	100 \pm 0	57.2 \pm 5.0	100.0 \pm 0	100 \pm 0

WILCOXON/KRUSKAL-WALLIS : AA $\chi^2_{(4)} = 22.35$ $p < 0.0002$; ADR $\chi^2_{(6)} = 29.21$ $p < 0.0001$; ADP $\chi^2_{(4)} = 17.7$ $p < 0.0014$; COL $\chi^2_{(5)} = 23.97$ $p < 0.0005$; PAF $\chi^2_{(10)} = 40.57$ $p < 0.0000$.

ND= não determinado

TABELA 2 - Efeito inibitório (%) do AAS sobre a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico (AA 1mM), ADP (1 μ M), fator ativador plaquetário (PAF 1-3 μ M), colágeno (2.5-5.0 μ g/ml) e adrenalina (ADR 10 μ M). O AAS foi pré-incubado (20min.) com PRP em concentrações variando de 0.1 μ M a 100 μ M. Os resultados representam as médias de 3-5 experimentos \pm o erro padrão das médias.

AAS (μ M)	AGREGANTES				
	AA	ADR	ADP	COL	PAF
0.1	0*	2.3 \pm 1.7*	4.3 \pm 4.3*	ND	0*
0.3	0*	8.6 \pm 5.5*	5.2 \pm 5.2*	0*	23.8 \pm 15.8*
1.0	5.2 \pm 5.2*	45.1 \pm 20.9*	11.3 \pm 6.5*	14.9 \pm 14.9*	35.0 \pm 18.1*
3.0	22.1 \pm 4.2*	65.2 \pm 20.5	30.5 \pm 13.8*	58.1 \pm 24.1	53.7 \pm 17.3
10.0	46.7 \pm 18.9	98.3 \pm 1.7	65.7 \pm 4.9*	100 \pm 0	93.7 \pm 2.9
30.0	100 \pm 0	98.8 \pm 1.2	100 \pm 0	100 \pm 0	95.4 \pm 2.8
100.0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0

WILCOXON/KRUSKAL-WALLIS : AA $\chi^2_{(6)} = 18.34$ $p < 0.0054$; ADR $\chi^2_{(6)} = 24.2$
 $p < 0.0005$; ADP $\chi^2_{(6)} = 27.98$ $p < 0.001$; COL $\chi^2_{(5)} = 15.22$ $p < 0.0094$; PAF $\chi^2_{(6)}$
 $= 26.79$ $p < 0.0002$.
 ND= não determinado

TABELA 3 - Inibição tempo-dependente do nimesulide (NMSL) sobre a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico (AA 1mM), ADP (1 μ M), fator ativador plaquetário (PAF 1-3 μ M), colágeno (COL 2.5-5.0 μ g/ml) e adrenalina (ADR 10 μ M). O NMSL foi pré-incubado em PRP durante os períodos de 30 seg até 30min. A dose selecionada do NMSL corresponde à IC₅₀ referente a cada agente agregante. Os resultados são as médias de 5-9 experimentos \pm o erro padrão das médias.

AGONISTAS	Tempo de Incubação com NMSL					
	30 seg	1min.	3min	10min	20 min	30 min
AA	2.76 \pm 1.3*	13.5 \pm 1.6*	20.3 \pm 1.5*	22.4 \pm 2.4*	27.6 \pm 1.7*	85.0 \pm 14.9
ADR	42.3 \pm 14.9*	66.6 \pm 12.3	84.2 \pm 9.1	86.7 \pm 6.7	89.3 \pm 5.8	100 \pm 0
ADP	12.0 \pm 5.1*	12.9 \pm 4.6*	16.2 \pm 5.8*	27.7 \pm 5.1	22.1 \pm 4.0	36.5 \pm 5.6
COL	6.9 \pm 1.8*	36.4 \pm 12.0*	45.3 \pm 17.1*	77.2 \pm 14.5	86.4 \pm 8.9	100 \pm 0
PAF	62.5 \pm 5.0*	87.8 \pm 6.1	90.7 \pm 3.6	95.2 \pm 3.1	98.1 \pm 1.1	100 \pm 0

WILCOXON/KRUSKAL-WALLIS : AA $\chi^2_{(5)}=24.6$ p<0.0002; ADR $\chi^2_{(5)}=15.99$ p<0.006; ADP $\chi^2_{(5)}=13.4$ p<0.01;
COL $\chi^2_{(5)}=21.03$ p<0.0008; PAF $\chi^2_{(5)}=21.04$ p<0.0008.

ND=não determinado

TABELA 6 - Efeito inibitório do nimesulide NMSL (0.01 - 1000 μ M) sobre a produção de **TXA₂** (ng/ml) induzida pela adrenalina (ADR - 10 μ M), ADP (1 μ M), ácido araquidônico (AA-1mM), colágeno (COL 2.5 - 5.0 μ g/ml) e PAF (1-3 μ M) em PRP. O NMSL foi pré-incubado com PRP por 20 min.antes da adição dos agentes agregantes. Os resultados estão representados como médias \pm erro padrão da média de 3-6 experimentos.

NMSL (μ M)	AGREGANTES				
	AA	ADR	ADP	COL	PAF
0	63.1 \pm 7.3	25.7 \pm 2.9	21.7 \pm 2.8	32.0 \pm 4.2	20.6 \pm 2.2
0.01					7.8 \pm 3.1*
0.03					7.1 \pm 3.4*
0.1					4.5 \pm 2.3*
0.3					3.8 \pm 0.8*
1.0		17.1 \pm 3.7			3.7 \pm 1.3*
3.0		11.7 \pm 1.7			3.2 \pm 1.2*
10.0	47.0 \pm 4.5	16.5 \pm 4.9	16.1 \pm 1.6	18.0 \pm 7.5	3.8 \pm 1.3*
30.0	36.7 \pm 6.5*	14.3 \pm 5.8	8.3 \pm 0.9*	12.3 \pm 6.2*	2.6 \pm 1.1*
100.0	5.98 \pm 0.43*	1.65 \pm 0.47*	0.82 \pm 0.03*	5.2 \pm 1.9*	1.1 \pm 0.2*
300.0	4.3 \pm 0.6*	0.83 \pm 0.3*	0.15 \pm 0.02*	2.4 \pm 0.7*	0.49 \pm 0.3*
1000.0	1.2 \pm 0.5*	0.2 \pm 0.2*	0 \pm 0*	0.28 \pm 0.18*	0 \pm 0*

ANOVA: ADP $F_{(5,15)} = 20.7$ $p < 0.000$; ADR $F_{(7,37)} = 9.18$ $p < 0.0000$; AA $F_{(5,24)} = 25.51$ $p < 0.0000$; Col $F_{(5,28)} = 9.26$ $p < 0.0000$; PAF $F_{(10,30)} = 12.07$ $p < 0.0000$.
 Teste Tukey-Kramer: * $p < 0.01$ quando comparados aos valores do agonista na ausência do NMSL (0).

- Valores individuais da amostra (25 voluntários), ver anexo 5 (Tab. 6.1 a 6.5)

TABELA 7 - Efeito inibitório do ácido acetilsalicílico AAS (0.1 - 100 μ M) sobre a produção de TXA₂ (ng/ml) induzida pela adrenalina (ADR - 10 μ M), ADP (1 μ M), ácido araquidônico (AA-1mM), colágeno (COL 2.5 - 5.0 μ g/ml) e PAF (1-3 μ M) em PRP. O AAS foi pré-incubado com PRP por 20 min.antes da adição dos agentes agregantes. Os resultados estão representados como médias \pm erro padrão da média de 3-4 experimentos.

AAS (μ M)	AGREGANTES				
	AA	ADR	ADP	COL	PAF
0	63.1 \pm 7.3	25.7 \pm 2.9	21.7 \pm 2.8	32.0 \pm 4.2	20.6 \pm 2.2
0.1		21.0 \pm 2.0			21.1 \pm 1.6
0.3		20.1 \pm 4.4			16.3 \pm 1.6
1.0	86.3 \pm 6.7	17.3 \pm 5.2	25.7 \pm 6.5	25.1 \pm 4.1	5.7 \pm 0.6*
3.0	82.3 \pm 4.9	5.9 \pm 1.3*	12.0 \pm 5.4	15.4 \pm 2.9*	2.4 \pm 0.4*
10.0	21.1 \pm 4.7*	0.68 \pm 0.09*	1.0 \pm 0.5*	4.5 \pm 1.1*	0.7 \pm 0.3*
30.0	9.46 \pm 2.9*	0.14 \pm 0.05*	0.7 \pm 0.5*	0.29 \pm 0.13*	0.11 \pm 0.06*
100.0	1.2 \pm 0.4*	0.01 \pm 0.01*	0 \pm 0*	0 \pm 0*	0 \pm 0*

ANOVA : ADP $F_{(5,15)} = 10.37$. $p < 0.0002$; ADR $F_{(7,29)} = 12.41$ $p < 0.0000$; AA $F_{(5,15)} = 9.19$ $p < 0.0002$; COL $F_{(5,20)} = 20.42$ $p < 0.0000$; PAF $F_{(7,28)} = 35.71$ $p < 0.0000$.
 Teste Tukey-Kramer : * $p < 0.01$ quando comparados aos valores do agonista na ausência do AAS (0).

■ Valores individuais da amostra (25 voluntários), ver anexo 5 (Tab. 7.1 a 7.5)

Tabela 11.1 - Teste de homogeneidade de variâncias, para os voluntários sem distinção de sexo antes e após tratamento com NMSL.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
0h	12	119.5806	89.6667	89.6667
24h	10	65.5714	48.80000	47.5000
2h	11	113.1895	90.8760	87.3636
4h	10	282.9597	230.2400	228.200
7d	5	59.4138	48.8000	52.000
8h	4	71.3559	57.5000	57.500

Test	F Ratio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	5.1946	5	?	0.0001

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
3.5434	5	16.63	0.0229

Tabela 11.2 - Teste de homogeneidade de variâncias, para os voluntários sem distinção de sexo antes e após tratamento com AAS.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
0h	08	104.7541	73.5000	71.7500
24h	08	296.7754	216.3750	177.7500
2h	11	466.0758	372.4298	353.2727
4h	08	368.0508	259.9375	256.2500
7d	06	106.7083	68.8889	66.6667
8h	05	320.8130	248.4000	221.8000

Test	F Ratio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	3.7519	5	?	0.0021

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
10.1924	5	16.479	0.0001

Tabela 12.1 - Teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários do sexo masculino, antes e após tratamento com NMSL.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
0h	07	82.3416	65.0204	65.8500
24h	05	45.9424	38.2400	37.4000
2h	06	118.7855	90.0000	85.0000
4h	06	292.0859	222.5000	222.5000
7d	02	35.3553	25.0000	25.0000
8h	02	28.2843	20.0000	20.0000

Test	F Ratio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	3.5128	5	?	0.0035

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
1.9536	5	6.7112	0.2076

Tabela 12.2 - Teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários do sexo feminino, antes e após tratamento com NMSL.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
0h	05	117.4415	98.8000	89.0000
24h	05	86.8113	56.7200	54.8000
2h	05	59.1507	46.0800	47.0000
4h	04	291.8725	206.7500	206.7500
7d	03	62.4500	46.6667	50.0000
8h	02	35.3553	25.0000	25.0000

Test	F Ratio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	2.4396	05	?	0.0322

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
10.1531	5	7.0366	0.0041

Tabela 12.3 - Teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários do sexo masculino, antes e após tratamento com AAS.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
0h	04	65.3835	48.7500	37.5000
24h	05	214.7242	133.6000	128.6000
2h	06	436.5692	349.5556	325.6667
4h	04	518.8182	376.7500	342.5000
7d	02	7.0711	5.0000	5.0000
8h	02	156.9777	111.0000	111.0000

Test	F Ratio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	2.9859	5	?	0.0107

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
6.9990	5	5.5643	0.0206

Tabela 12.4 - Teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários do sexo feminino, antes e após tratamento com AAS.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
0h	04	137.2917	101.5000	101.5000
24h	03	414.7787	318.2222	272.6667
2h	04	544.0965	385.2500	380.5000
4h	05	185.7956	161.6000	136.0000
7d	03	167.0329	120.0000	150.0000
8h	02	193.7473	137.0000	137.0000

Test	F Ratio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	1.4543	05	?	0.2012

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
4.4658	5	5.3389	0.0573

Tabela 12.5 - Teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários entre os sexos antes do tratamento com NMSL.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
FEM	10	136.6498	115.9200	115.6000
MASC	12	106.4551	85.1389	79.6667

Test	F Ratio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	0.5912	1	?	0.4420

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
1.0929	1	16.874	0.3106

t-Test
1.0454

Tabela 12.6 - Teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários entre os sexos após 2h do tratamento com NMSL.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
FEM	05	59.1507	146.0800	47.0000
MASC	06	118.7855	90.0000	85.0000

Test	F Ratio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	1.7219	1	?	0.1894

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
5.2359	1	7.5794	0.0532

t-Test
2.2882

Tabela 12.7- Teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários entre os sexos após 4h do tratamento com NMSL.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
FEM	04	291.8725	206.7500	206.7500
MASC	06	292.0859	222.5000	222.5000

Test	F Ratio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	0.0000	1	?	0.9989

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
0.4512	1	6.5826	0.5246

t-Test
0.6717

Tabela 12.8- Teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários entre os sexos após 8h do tratamento com NMSL.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
FEM	02	35.35534	25.0000	25.0000
MASC	02	14.14214	10.0000	10.0000

Test	F Ratio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	0.4954	1	?	0.4815

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
15.2069	1	1.3124	0.1125

t-Test
3.8996

Tabela 12.9 - Teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários entre os sexos após 24h do tratamento com NMSL.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
FEM	05	86.81129	56.72000	54.8000
MASC	05	45.94236	38.24000	37.4000

Test	F Ratio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	1.3520	1	?	0.2449

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
0.0226	1	6.0776	0.8854

t-Test
0.1503

Tabela 12.10 - Teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários entre os sexos após 7 dias do tratamento com NMSL.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
FEM	03	62.44998	46.66667	50.0000
MASC	02	35.35534	25.0000	25.0000

Test	F Ratio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	0.2645	1	?	0.6070

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
2.1948	1	2.9999	0.2351

t-Test
1.4815

Tabela 12.11 - Teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários entre os sexos antes do tratamento com AAS.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
FEM	04	137.2917	101.5000	101.5000
MASC	04	65.3825	48.7500	37.5000

Test	F Ratio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	1.3017	1	?	0.2539

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
0.6437	1	4.2942	0.4644

t-Test
0.8023

Tabela 12.12 - Teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários entre os sexos após 2h do tratamento com AAS.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
FEM	04	554.0965	385.2500	380.5000
MASC	06	436.5692	349.5556	325.6667

Test	F Ratio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	0.1647	1	?	0.6848

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
0.0274	1	5.518	0.8744

t-Test
0.1655

Tabela 12.13 - Teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários entre os sexos após 4h do tratamento com AAS.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
FEM	04	197.9899	170.0000	170.0000
MASC	04	518.8182	376.7500	342.5000

Test	F Ratio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	2.0888	1	?	0.1484

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
0.1499	1	3.8556	0.7190

t-Test
0.3872

Tabela 12.14 - Teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários entre os sexos após 8h do tratamento com AAS.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
FEM	03	307.0738	221.5556	295.6667
MASC	02	156.9777	111.0000	111.0000

Test	F Ratio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	0.3557	1	?	0.5509

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
3.7799	1	2.9643	0.1482

t-Test
1.9442

Tabela 12.15 - Teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários entre os sexos após 24h do tratamento com AAS.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
FEM	03	414.7787	318.22220	272.6667
MASC	05	214.7242	133.6000	128.6000

Test	Fratio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	1.0469	1	?	0.3062

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
0.7052	1	2.6605	0.4698

t-Test
0.8398

Tabela 12.16- Teste de homogeneidade de variâncias nos voluntários entre os sexos após 7 dias do tratamento com AAS.

Level	Count	Std dev	Means AbsDif to mean	MeanAbsDif to Median
FEM	03	167.0329	120.0000	150.0000
MASC	03	5.7735	4.4444	3.3333

Test	FRatio	DF Num	DF Den	prob>F
Bartlett	8.5535	1	?	0.0034

WELCH ANOVA testing means equal, allowing Std's Not Equal

F Ratio	DF Num	DF Den	Prob>F
0.0764	1	2.0048	0.8082

t-Test
0.2764

ANEXO 5

Tabelas suplementares dos resultados
individuais da amostra

TABELA 1.1 - % de inibição da agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico (**AA** 1mM) em PRP pré-incubado (20min.) com nimesulide em concentrações variando de 3 μ M a 1000 μ M

N	1000 μ M	300 μ M	100 μ M	30 μ M	10 μ M
01	100	7	0	5	0
02	100	100	100	8.7	0
03	100	100	0	0	0
04	100	100	100	100	0
05	100	100	100	100	0
06	100	100	100	32.4	9.9
07	100	100	100	7.6	0
08	100	100	28.5	28.5	20.2
x	100	88.3	66.1	35.3	3.76
epm	0	11.6	16.8	14.7	2.6

TABELA 1.2 - % de inibição da agregação plaquetária induzida por **ADP**(10 μ m) em PRP pré-incubado (20min.) com nimesulide em concentrações variando de 1 μ M a 1000 μ M.

N	1000 μ M	300 μ M	100 μ M	30 μ M	10 μ M
01	60.0	13.0	2.3	16.5	0
02	70.4	24.7	16.0	0	13.6
03	42.3	25.6	21.8	8.9	0
04	56.0	28.0	19.0	21.0	8
05	57.4	31.9	18.1	19.1	11.7
x	57.2	24.6	15.4	13.1	6.7
epm	5	3.5	3.8	4.3	3.2

TABELA 1.3 - % de inibição da agregação plaquetária induzida por adrenalina (ADR 10 μ M) em PRP pré-incubado (20min). com nimesulide em concentrações variando entre 1 μ M a 1000 μ m.

N	1000 μ M	300 μ M	100 μ M	30 μ M	10 μ M	3 μ M	1 μ M
01	100	98.8	84.7	0	0	0	0
02	100	99.2	98.9	98.9	73.4	0	0
03	100	100	100	63.5	13.5	5.4	0
04	100	91.2	21.9	0.8	0	0	0
05	100	89.8	81.1	10.0	8.6	0	0
06	100	100	100	100	100	100	77.1
07	100	70	45	25	37	25	0
x	100	92.7	75.9	42.6	33.2	18.6	11.0
epm	0	4.1	11.6	16.8	14.9	13.9	11.0

TABELA 1.4 - % de inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno (COL - 2.5-10 μ g/ml) em PRP pré-incubado (20min.) com nimesulide em concentrações variando entre 1 μ M a 1000 μ m.

N	1000 μ M	300 μ M	200 μ M	100 μ M	30 μ M	10 μ M	3 μ M	1 μ M
01	100	100	100	100	100	100	82.0	55.9
02	100	100	100	100	100	100	76.3	13.1
03	100	100	100	100	100	100	100	100
04	100	100	100	100	11.7	5.8	0	0
05	100	100	100	63.0	14.1	4.1	0	0
06	100	100	100	100	100	0	0	0
07	100	81.9	54.9	11.7	0	0	0	0
08	100	92.0	26.8	19.3	16.1		10.5	9.8
09	100	100	100	72	12		8.0	0
x	100	97.1	86.8	74.0	50.4	44.3	30.7	19.8
epm	0	2.1	9.0	12	15.7	19.7	14.0	11.7

TABELA 1.5 - % de inibição da agregação plaquetária induzida por PAF (1-3 μ m) em PRP pré-incubado (20min.) com nimesulide em concentrações variando entre 0.0001 μ M a 100 μ m

N	100 μ M	30 μ M	10 μ M	3 μ M	1 μ M	0.3 μ M	0.1 μ M	0.01 μ M	0.003 μ M	0.001 μ M	0.0001
01	100	100	100	100	100	100	100			30.7	8.9
02	100	100	100	100	100	100	100				0
03	81.8	45.4	40.0	30.0	30.0	26.0	24.5		0	0	0
04	100	100	100	100	100	100	100				0
05	100	100	100	100	100	100	100	97.0	70.5	26	5.6
06	100	100	100	100	100	100	100	90.0	80.0	35.0	1.2
07	100	93.3	80	70.6	60	61.3		30	21.0	12	0
x	97.4	91.2	88.6	85.8	84.2	83.9	81.8	72.3	42.9	20.7	2.2
epm	2.6	7.8	8.5	10.2	10.6	11.0	12.0	21.3	10.3	6.5	1.3

TABELA 2.1 - % de inibição da agregação plaquetária induzida por **ADP** (10 μ M) em PRP pré-incubado (20min.) com ácido acetilsalicílico em concentrações variando entre 0.1 μ M a 100 μ M.

N	100 μ M	30 μ M	10 μ M	3 μ M	1 μ M	0.3 μ M	0.1 μ M
01	100	92.5	70.8	54.2	20	0	0
02	100	100	72	31.0	25	0	0
03	100	100	77.5	6.25	0	0	0
04	100	100	57.3	0	0	0	0
05	100	73.5	50.9			26.10	21.4
x	100	93.2	65.7	30.5	11.25	5.22	4.28
epm	0	5.1	4.9	13.8	6.5	5.2	4.28

TABELA 2.2 - % de inibição da agregação plaquetária induzida adrenalina (**ADR** 10 μ M) em PRP pré-incubado (20min.) com ácido acetilsalicílico em concentrações que variaram entre 0.1 μ M a 100 μ M.

N	100 μ M	30 μ M	10 μ M	3 μ M	1 μ M	0.3 μ M	0.1 μ M
01	100	100	100	100	100	0	0
02	100	93.9	91.3	33.9	16.5	16.3	8.7
03	100	100	100	0	0	0	0
04	100	100	100	92	17.6	0	0
05	100	100	100	100	91.3	27	2.8
x	100	98.8	98.3	65.2	45.1	8.6	2.3
epm	0	1.2	1.7	20.5	20.9	5.5	1.7

TABELA 2.3 - % de inibição da agregação plaquetária induzida por PAF (1-3 μ M) em PRP pré-incubado (20min.) com ácido acetilsalicílico em concentrações que variaram entre 0.1 μ M a 100 μ M.

N	100 μ M	30 μ M	10 μ M	3 μ M	1 μ M	0.3 μ M	0.1 μ M
01	100	100	88.5	80.5	2.6	0	0
02	100	100	85.2	0	0	0	0
03	100	90	100	30	15	0	0
04	100	100	100	95.5	84.5	79.4	
05	100	87.1	94.6	62.4	73.1	39.8	0
x	100	95.4	93.7	53.7	35.0	23.8	0
epm	0	2.8	2.9	17.3	18.1	15.8	0

TABELA 2.4 - % de inibição da agregação plaquetária induzida por Colágeno (2.5- 10 μ g/ml) em PRP pré-incubado (20min.) com ácido acetilsalicílico em concentrações que variaram entre 0.3 μ M a 100 μ M.

N	100 μ M	30 μ M	10 μ M	3 μ M	1 μ M	0.3 μ M
01	100	100	100	16.3	0	0
02	100	100	100	58.0	0	0
03	100	100	100	100	44.8	0
x	100	100	100	58.1	14.9	0
epm	0	0	0	24.1	14.9	0

TABELA 2.5 - % de inibição da agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico (AA 1mm) em PRP pré-incubado (20min.) com ácido acetilsalicílico em concentrações que variaram entre 0.1 μ M a 100 μ M.

N	100 μ M	30 μ M	10 μ M	3 μ M	1 μ M	0.3 μ M	0.1 μ M
01	100	100	100	14.4	0	0	0
02	100	100	100	23.3	0	0	0
03	100	100	18.5	28.7	15.7	0	0
x	100	100	46.7	22.1	5.2	0	0
epm	0	0	18.9	4.2	5.2	0	0

TABELA 3.1 -% de inibição da agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico (AA 1mM) variação imposta pelo tempo de incubação com nimesulide (IC₅₀).

N	30 seg.	1min.	3min.	10min.	20min	30min
01	2.1	16.8	15.3	13.7	25.0	100
02	0	10	24.7	22	22.9	100
03	0	11	22	29	30	100
04	5.2	18.0	19.8	23.4	32.4	100
05	6.5	11.9	19.6	23.9	27.6	25.2
x	2.76	13.5	20.3	22.4	27.6	85.04
epm	1.3	1.6	1.5	2.4	1.7	14.9

TABELA 3.2 -% de inibição da agregação plaquetária induzida por ADP (10 μ M) variação imposta pelo tempo de incubação com nimesulide (IC₅₀).

N	30 seg.	1min.	3min.	10min.	20min.	30min.
01	20	11.8	3.5	38.8	13.0	48.2
02	0	7.4	11.0	23.0	16.0	34.6
03	7.7	9.0	15.4	12.8	21.8	19.2
04	25.0	29.0	35.0	35.0	28.0	36.0
05	7.4	7.4	16.0	28.7	31.9	44.7
x	12.0	12.9	16.2	27.7	22.1	36.5
epm	5.1	4.6	5.8	5.1	4.0	5.6

TABELA 3.3 - % de inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno (COL - 2.5 - 5.0 μ g/ml) variação imposta pelo tempo de incubação com nimesulide (IC₅₀).

N	30 seg.	1min.	3min.	10min.	20min.	30min.
01	3.6	16.7	9.7	84.5	55.9	100
02	11.8	55.2	68.4	100	76.3	100
03	10.7	24.1	15.2	21.4	100	100
04	5.8	74.1	100	100	100	100
05	2.5	12.3	33.0	80	100	100
x	6.9	36.4	45.3	77.2	86.4	100
epm	1.8	12.0	17.1	14.5	8.9	0

TABELA 3.4 - % de inibição da agregação plaquetária induzida por adrenalina (ADR 10 μ M) variação imposta pelo tempo de incubação com nimesulide (IC₅₀).

N	30 seg.	1min.	3min.	10min.	20min.	30min.
01	83.5	88.5	98.8	94.1	98.8	100
02	52.0	86.2	90.4	100	99.2	100
03	20.3	18.9	100	77.0	63.5	100
04	85.1	88.6	87.7	91.2	91.2	100
05	13.2	38.5	39.7	57.8	39.7	100
06	0	83.9	88.7	100	100	100
x	42.3	67.4	84.2	86.7	82.1	100
epm	14.9	12.5	9.1	6.7	10.2	0

TABELA 3.5 - % de inibição da agregação plaquetária induzida por fator ativador plaquetário (PAF 1-3 μ M) variação imposta pelo tempo de incubação com nimesulide (IC₅₀).

N	30 seg.	1min.	3min.	10min.	20min.	30min.
01	72.7	89.0	98.0	100	98.9	100
02	60.6	90.0	90.0	100	99.2	100
03	65.0	98.0	98.9	100	100	100
04	70.0	97.8	87.7	91.2	99.0	100
05	44.1	64.3	79.0	85.0	93.7	100
x	62.5	87.8	90.7	95.2	98.1	100
epm	5.0	6.1	3.6	3.1	1.1	0

TABELA 5.1 - Produção de TXA_2 em PRP, antes e após a adição dos agonistas plaquetários adrenalina (ADR - $10\mu\text{M}$), ADP ($1\mu\text{M}$), ácido araquidônico (AA- 1mM), colágeno (COL 2.5 - $5.0\ \mu\text{g/ml}$) e PAF ($1-3\mu\text{M}$).

N	BASAL	ADR	ADP	AA	COL	PAF
1	2.5	34	20.6	85	30	13.7
2	1.0	24	9.6	78	34	15.4
3	3.5	38	27.4	90	43	20.6
4	5.5	30	28.4	71.8	28	16.5
5	0.5	18	24.6	38	42	29.8
6	6.5	30	19.5	40	15.2	24.6
7	0.2	37.4		50		28
8	5.0	18.6		52		16.5
9	5.5	15				
10	2.0	12.3				
11	5.1					
12	2.3					
13	7.0					
14	0.1					
15	1.23					
16	0.46					
17	0.7					
18	0.7					
19	7.45					
20	3.63					
x	3.0	25.7	21.7	63.1	32.0	20.6
epm	0.6	2.9	2.8	7.3	4.2	2.2

TABELA 5.2 - Produção de TXA_2 em PRP, após incubação prévia (20min.) com indometacina ($10\mu\text{M}$) e adição dos agonistas plaquetários adrenalina (ADR - $10\mu\text{M}$), ADP ($1\mu\text{M}$), ácido araquidônico (AA- 1mM), colágeno (COL 2.5 - $5.0\mu\text{g/ml}$) e PAF ($1-3\mu\text{M}$).

N	ADR	ADP	AA	COL	PAF
1	12	0.1	3.0	3.0	5.5
2	7	0.22	3.8	14.0	0.7
3	10	0.6	5.0	9.4	0.21
4	4	0.4	5.2	5.5	8.5
5	3	0.5	1.0	0.73	2.3
6	4	0.3	18	0	8.5
7	1.3		23.8	7.4	7.7
8	0.1		83.4	3.2	3.1
9	8.6			4.3	
10	2.7			2.5	
x	5.3	0.35	17.9	5.0	4.6
epm	1.2	0.07	9.7	1.3	1.2

TABELA 6.1- Produção de TXA₂ em PRP, após incubação prévia (20 min.) com nimesulide, seguido do agente agregante adrenalina (ADR 10 μ M)

N	1000 μ M	300 μ M	100 μ M	30 μ M	10 μ M	3 μ M	1 μ M
01	nd	nd	nd	24.0	34.0		
02	nd	nd	1.0	3.0	14.0		28.0
03	1.0	1.0	2.4	38.0			
04	nd	2.0	3.0	14.0	20.0		14.5
05	nd	1.0	1.0	2.5	11.0	10.0	11.0
06	nd	1.0	2.5	4.0	4.5	13.5	15.0
x	0.2	0.83	1.65	14.3	16.7	11.7	17.1
epm	0.2	0.31	0.47	5.8	4.9	1.7	3.7

TABELA 6.2- Produção de TXA₂ em PRP, após incubação prévia (20 min.) com nimesulide, seguido do agente agregante ácido araquidônico (AA 1mM)

N	1000 μ M	300 μ M	100 μ M	30 μ M	10 μ M
01	2.5	5.0	6.9		58.0
02	1.0	3.5	6.5	25.0	42.0
03	2.0	5.5	4.5	26.0	36.0
04	0.5	3.0	5.5	48.0	46.0
05	nd		6.5	48.0	48.0
x	1.2	4.3	6.0	36.7	47.0
epm	0.5	0.6	0.43	6.4	4.5

TABELA 6.3- Produção de TXA₂ em PRP, após incubação prévia (20 min.) com nimesulide, seguido do agente agregante ADP (1 μ M)

N	1000 μ M	300 μ M	100 μ M	30 μ M	10 μ M
01	nd	0.2	0.87	8.0	14
02	nd	0.1	0.78	7.0	15.1
03	nd	0.15	0.81	10.0	19.2
x	0	0.15	0.82	8.3	16.1
epm	0	0.02	0.03	0.9	1.6

TABELA 6.4- Produção de TXA₂ em PRP, após incubação prévia (20 min.) com nimesulide, seguido do agente agregante (PAF 1-3µM)

N	300µM	100µM	30µM	10µM	3µM	1µM	0.3µM	0.1µM	0.03µM	0.01µM
01	0.5	1.4	4.7	6.3	1.2	1.9	5.4			
02	0.97	0.92	2.1	2.5	2.3	2.2	1.6	1.2	1.4	2.4
03	nd	0.87	0.9	2.5	2.4	3.2	3.5	9.1	6.8	7.75
04					6.85	7.5	4.8	3.4	13.2	13.2
x	0.49	1.1	2.6	3.8	3.2	3.7	3.8	4.5	7.1	7.8
epm	0.3	0.2	1.1	1.3	1.2	1.3	0.8	2.3	3.4	3.1

TABELA 6.5 - Produção de TXA₂ em PRP, após incubação prévia (20 min.) com nimesulide, seguido do agente agregante colágeno (Col. 2.5 - 5.0 µg/ml)

N	1000µM	300µM	100µM	30µM	10µM
01	nd	0.5	ND	1.0	0.5
02	nd	3.0	3.0	20.0	24.0
03	0.7	4.7	8.0	33.0	42.0
04	nd	1.0	3.5	4.0	20.0
05	1.0	4.26	13.6		
06	nd	0.95	2.8	3.4	3.5
x	0.28	2.4	5.2	12.3	18.0
epm	0.18	0.7	1.9	6.1	7.5

TABELA 7.1 - Produção de TXA₂ em PRP, após incubação prévia (20 min.) com ácido acetilsalicílico, seguido do agente agregante ADP (1µM)

N	100µM	30 µM	10µM	3µM	1µM
01	nd	0.03	0.03	1.4	38
02	nd	0.41	1.31	15.9	23.2
03	nd	1.6	1.6	18.8	15.9
x	0	0.7	1.0	12.0	25.7
epm	0	0.5	0.5	5.4	6.5

Tabela 7.2 - Produção de TXA₂ em PRP, após incubação prévia (20 min.) com ácido acetilsalicílico, seguido do agente agregante adrenalina (ADR - 10µM)

N	100µM	30 µM	10µM	3µM	1µM	0.3µM	0.1µM
01	nd	0.06	0.65	4.3	9.2	24.2	24
02	0.04	0.27	0.93	3.4	31.2	30.0	22
03	nd	0.02	0.63	6.3	9.6	9.25	17.1
04	nd	0.2	0.5	9.5	19.5	17.0	
x	0.01	0.14	0.68	5.9	17.3	20.1	21.0
EPM	0.01	0.05	0.09	1.3	5.2	4.4	2.0

TABELA 7.3 - Produção de TXA₂ em PRP, após incubação prévia (20 min.) com ácido acetilsalicílico, seguido do agente agregante PAF (1-3µM).

N	100µM	30 µM	10µM	3µM	1µM	0.3µM	0.1µM
01	nd	0.01	1.7	1.9	6.12	18.7	23.5
02	nd	0.29	0.22	2.8	7.2	19.1	24.1
03	nd	0.04	0.6	1.6	5.5	15.4	17.8
04	nd	0.11	0.25	3.53	4.2	12.0	19.0
x	0	0.11	0.7	2.4	5.7	16.3	21.1
epm	0	0.06	0.3	0.4	0.6	1.6	1.6

Tabela 7.4 - Produção de TXA₂ , em PRP, após incubação prévia (20 min.) com ácido acetilsalicílico, seguido do agente agregante ácido araquidônico (AA - 1mM)

N	100µM	30 µM	10µM	3µM	1µM
01	0.5	9.0	29.5	90	75
02	2.0	4.68	13.05	84	98
03	1.0	14.7	20.8	73	86
x	1.2	9.46	21.1	82.3	86.3
epm	0.4	2.9	4.7	4.9	6.7

Tabela 7.5 - Produção de TXA₂ , em PRP, após incubação prévia (20 min.) com ácido acetilsalicílico, seguido do agente agregante colágeno (Col - 2.5 - 5.0µg/ml)

N	100µM	30 µM	10µM	3µM	1µM
01	nd	0.65	7.1	23.4	35.5
02	nd	0.03	3.4	16.0	28
03	nd	0.17	2.1	10.5	17.8
04	nd	0.32	5.6	11.9	19.0
x	0	0.29	4.5	15.4	25.1
epm	0	0.13	1.1	2.9	4.1

TABELA 8.1- Agregação plaquetária (%) em PRP de voluntários submetidos a tratamento com nimesulide (cp. 100mg via oral)

N	0h				2h				4h			
	ADP	ADR	PAF	AA	ADP	ADR	PAF	AA	ADP	ADR	PAF	AA
1	76.0	73.6	92.8	93.6	88	88.0	96.0	84.0	67.2	69.6	91.2	95.2
2	88.0	96.0	78.4	80.0	73.6	74.4	80	92.0	76.8	64.0	96.0	72.0
3	64.0	48.0	83.2	92.0	78.4	70.4	19.2		74.4	72.8	64.8	68.8
4	62.4	78.4	84.0	80.0	66.4	67.2	59.2	69.6	70.4	76.0	40.8	64.8
x	72.6	74.0	84.6	86.4	76.6	75.0	63.6	82.0	72.2	70.6	73.2	75.2
epm	5.9	9.9	3.0	3.7	4.5	4.5	16.6	4.6	2.1	2.6	12.7	6.8

TABELA 8.2- Agregação plaquetária (%) em PRP de voluntários submetidos a tratamento com ácido acetilsalicílico (cp. 100mg, via oral)

N	0h				2h				4h			
	ADP	ADR	PAF	AA	ADP	ADR	PAF	AA	ADP	ADR	PAF	AA
1	74.4	84.0	80.0	80.0	40.0	68.0	68.8	85.7	26.7	67.2	80.0	63.2
2	80.0	72.0	78.9	95.0	35.9	50.1	59.1	80.0	32.0	28.1	75.0	59.0
3	69.0	79.0	82.0	81.5	46.0	34.5	47.5	78.9	55.7	37.0	77.0	68.0
x	74.5	78.3	80.3	85.5	40.6	50.9	58.5	81.5	38.1	44.1	77.3	63.4
epm	3.2	3.4	0.9	4.8	2.9	9.6	6.1	2.1	8.9	11.8	1.5	2.6

Tabela 9.1- Inibição da produção de TXA₂ em PRP de voluntários submetidos a tratamento com nimesulide (cp 100mg, via oral).

N	0h				2h				4h			
	ADP	ADR	PAF	AA	ADP	ADR	PAF	AA	ADP	ADR	PAF	AA
1	49.0	34.4	42.6	166	25.2	35.8	42.2	172	9.78	53.6	30.8	283.0
2	18.3	26.8	44.0	120.4	1.6	17.8	4.8	99.5	10.4	21.1	12.5	324
3	12.8	38.0	60.4	310	5.98	32.4	2.54	189	11.1	38.0	23.4	96.0
4	24.0	36.0	38.0	245	5.9	33.2	2.4	180	3.0	0.0	1.5	90.0
x	26.0	33.8	46.3	210.3	9.7	29.8	12.9	160.1	8.6	28.2	17.0	198.2
epm	8.0	2.4	4.9	42.0	5.2	4.0	9.7	20.5	1.9	11.4	6.4	61.3

TABELA 9.2 - Inibição da produção de TXA₂ em PRP de voluntários submetidos a tratamento com ácido acetilsalicílico (cp 100mg, via oral).

N	0h				2h				4h			
	ADP	ADR	PAF	AA	ADP	ADR	PAF	AA	ADP	ADR	PAF	AA
1	47.6	20.0	54.0	134	0.0	4.4	2.3	87	0.0	16.0	0.0	170
2	36.8	17.0	60.0	180	1.5	7.8	8.7	76.7	0.0	6.8	0.5	120
3	50.0	25.0	42.0	210	0.5	10.0	5.1	80.0	0.0	5.1	0.0	81.2
x	44.8	20.7	52.0	174.7	0.7	7.4	5.4	81.2	0.0	9.3	0.2	123.7
epm	4.1	2.3	5.3	22.1	0.4	1.6	1.8	3.0	0.0	3.4	0.2	25.7

TABELA 10.1 - Valores basais do tempo de sangramento (seg) antes dos tratamentos instituídos, nos voluntários sadios.

N	NMSL(Y)	AAS(X)
1	379	360
2	570	360
3	450	225
4	390	345
5	465	495
6	570	475
7	255	369
8	260	195
9	425	
10	180	
11	450	
12	390	
MÉDIA	398.67	353.0
EPM	34.5	37.04

Tabela 10. 2 - Valores do tempo de sangramento (seg) após 2h dos tratamentos instituídos, nos voluntários sadios.

N	NMSL(Y)	AAS(X)
1	300	420
2	500	1500
3	400	1500
4	630	780
5	570	750
6	510	904
7	396	1020
8	375	600
9	270	1800
10	332	698
11	420	
MÉDIA	427.54	942.9
EPM	34.1	140.5

Tabela 10.3 - Valores do tempo de sangramento (seg) após 4h dos tratamentos instituídos, nos voluntários sadios.

N	NMSL(Y)	AAS(X)
1	660	859
2	735	600
3	385	1681
4	1155	570
5	450	1000
6	940	620
7	344	980
8	431	680
9	600	
10	1002	
MÉDIA	670.2	873.75
EPM	89.5	130.13

Tabela 10.4 -Valores do tempo de sangramento (seg) após 8h dos tratamentos instituídos.

N	NMSL(Y)	AAS(X)
1	540	857
2	500	637
3	610	1131
4	660	857
5		1470
MÉDIA	577.5	990.0
EPM	35.7	143.5

TABELA 10.5 - Valores do tempo de sangramento (seg) após 24h dos tratamentos instituídos, nos voluntários sadios.

N	NMSL(Y)	AAS(X)
1	521	779
2	444	540
3	549	802
4	450	1140
5	510	769
6	485	1500
7	480	818
8	630	750
9	396	
10	450	
MÉDIA	491.5	887.3
EPM	20.7	104.9

TABELA 10.6 - Valores do tempo de sangramento (seg) após 7 dias dos tratamentos instituídos, nos voluntários sadios.

N	NMSL(Y)	AAS(X)
1	450	480
2	400	490
3	420	540
	540	660
	510	330
MÉDIA	464.0	496.7
EPM	26.6	43.6

VALORES DE REFERÊNCIA (VARIACÃO DO TESTE) = 180-570seg

TABELA 13.1 - Valores basais do tempo de sangramento (seg) antes dos tratamentos instituídos, nos voluntários sadios.

N	NMSL(Y)		AAS(X)	
	MASC	FEM	MASC	FEM
1	379	255	360	495
2	570	260	360	475
3	450	425	225	369
4	390	180	345	195
5	465	450		
6	570			
7	390			
MÉDIA	473.1	314	322.5	383.5
DESVIO	85.7	117.4	65.3	137.3
EPM	30.3	52.5	32.7	68.6

Tabela 13. 2 - Valores do tempo de sangramento (seg) após 2h dos tratamentos instituídos, nos voluntários sadios.

N	NMSL(Y)		AAS(X)	
	MASC	FEM	MASC	FEM
1	300	396	420	1020
2	500	375	1500	600
3	400	270	1500	1800
4	630	332	780	698
5	570	420	750	
6	510		904	
MÉDIA	485	358.6	975.7	1029.5
DESVIO	118	59.1	436.6	544.8
EPM	48.5	26.4	178.2	272.1

Tabela 13.3 - Valores do tempo de sangramento (seg) após 4h dos tratamentos instituídos, nos voluntários sadios.

N	NMSL(Y)		AAS(X)	
	MASC	FEM	MASC	FEM
1	660	344	859	1000
2	735	431	600	620
3	385	600	1681	980
4	1155	1002	570	680
5	450			
6	940			
MÉDIA	720.8	594.2	927.5	852.0
DESVIO	292.1	291.9	518.8	185.8
EPM	119.2	145.9	259.4	83.1

Tabela 13.4 - Valores do tempo de sangramento (seg) após 8h dos tratamentos instituídos.

N	NMSL(Y)		AAS(X)	
	MASC	FEM	MASC	FEM
1	540	610	857	1131
2	500	660	637	857
3				1470
MÉDIA	520	635	746.0	1152.7
DESVIO	28.3	35.3	156.9	307.0
EPM	20.0	25.0	111.0	177.3

Tabela 13.5 - Valores do tempo de sangramento (seg) após 24h dos tratamentos instituídos, nos voluntários sadios.

N	NMSL(Y)		AAS(X)	
	MASC	FEM	MASC	FEM
1	521	485	779	1500
2	444	480	540	818
3	549	630	802	750
4	450	396	1140	
5	510	450	769	
MÉDIA	494.8	488.2	806.0	1022.7
DESVIO	45.9	86.8	214.7	414.8
EPM	20.5	38.8	96.0	239.5

Tabela 13.6 - Valores do tempo de sangramento (seg) após 7 dias dos tratamentos instituídos, nos voluntários sadios.

N	NMSL(Y)		AAS(X)	
	MASC	FEM	MASC	FEM
1	450	420	480	540
2	400	540	490	660
3		510		330
MÉDIA	425	490	485.0	510
DESVIO	35.3	62.4	7.1	167.0
EPM	25	36.1	5.0	96.4

VALORES DE REFERÊNCIA (VARIAÇÃO DO TESTE) = 180-570seg

SUMMARY

The therapeutic effect of nonsteroidal anti-inflammatory (NSAIDs) come with undesired effects related with gastric irritation, homeostatic changes, among others. Nimesulide (NMSL) is a NSAID that present ample peculiar action mechanism. Early studies show that the NMSL present short activity above COX-1. The objective of this study was verify if the NMSL modifies the platelet function and the bleeding time (TS) what in odontology could be disadvantageous, prejudicing the cicatrization of de damaged area. For this, platelet function was valued *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. Voluntaries blood samples was collected in sodium citrate 3.8%, to obtainment of platelet rich plasma (PRP). The PRP was incubated with NMSL(0.01 μ M a 1000 μ M) or AAS(0.1 μ M a 100 μ M) per 20 min in 37°C above constant agitation. The IC₅₀ to platelet anti-aggregation of NMSL and the AAS was determinated after the addition of ADP.(1 μ M), aradonic acid (AA 1mM), platelet activating factor (PAF 1-3 μ M), collagen (COL 2.5 - 5.0 μ g/ml) and adrenaline (ADR 10 μ M). The formation of TXA₂ after addition of agonistics of PRP was determinated by radioimunoassay. In *ex vivo studies*, health voluntaries was selected and distributed in 2 groups, with NMSL treatment (cp 100mg, n=4) or AAS (cp 100mg, n=3). Blood samples was collected before and after 2h and 4h of treatment, following de proceeds of *in vitro* study while the verification of platelet aggregation and determination of the production of TXA₂. *IN VIVO*, was utilized the same drugs doses, following the TS determination using SIMPLATE - II R®, before and after 2h, 4h, 8h, 24h and 7 days. Was find out that the NMSL is less potent than the AAS to inhibit the platelet aggregation *in vitro*, induced by ADP, COL, ADR e AA, exception made to PAF. His effect is concentration and time depend. The TXA₂ production was inhibited by NMSL (>30 μ M) in concentrations higher than AAS (>3 μ M) in *in vitro* studies. Although more than 80% inhibition of production only was reached in higher concentrations than 100 μ M. NMSL didn't interfered with the platelet aggregation in *ex vivo* assays, however inhibiting significantly (p<0.05) the TXA₂ production induced by PAF. NMSL prolonged the TS (mean 56%) into times 4h and 8h in smaller proportions than AAS (mean 160%), that interfered into times 2h, 4h, 8h and 24h. Has been concluded that NMSL is less potent than AAS in the COX-1 platelet inhibition. Although others mechanisms may be involved, seem this drug especificity of action to inhibit the mediated effects by PAF, like a example, the interference with the platelet phosphodisterases.

Keywords:

1) Nimesulide 2) Acetilsalilic acid 3) Platelet 4) Bleending time

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAMSON, S.B., WEISSMANN, G. The mechanisms of action nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Arthr and Rheum**, v.32,n.1,p.1-9, Jan, 1989.
2. ADLER, J.R., HANDIN, R.I. Solubilization and characterization of a platelet membrane ADP-binding protein. **J. Biol Chem.**,v.254,p.3866, 1979.
3. ALI, M., McDONALD, J.M.D. Reversible and irreversible inhibition of platelet cyclooxygenase and serotonin release by non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Thromb. Res.**, v.13,p.1057-1059, 1978.
4. AL-MONDHRIRI, H.Y., MARCUS, A.J., SPAET, T.H. On the mechanism of platelet function inhibition by acetylsalicylic acid. **Proc Exp Biol.**, v.133,p.632-636, 1970.
5. ALONSO, F., SANCHEZ-CRESPO, M., MATO, J.M. Modulatory role of cyclic AMP in the release of platelet activating factor from human polymorphonuclear leukocytes. **Immun.**, v.45,p.493-500, 1982.
6. ARAUJO, L.C.L., MATTHOS-FILHO, T.R. Comparative of nimesulide and ASA on some values of hemostasy in rats. **Revista de Ciência e Tecnologia** [no prelo].
7. ARMSTRONG, R.A., JONES, R.A., WILSON, N.H. Ligand binding to thromboxane receptors on human platelet: Correlation with biological activity. **Br. J. Pharmacol.**, v.79,p.953-964, 1983.
8. ATAC, A., SPAGNUOLO, M., ZUCKER, M.B. Long term inhibition functions by aspirin. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.133,p.1331, 1970.
9. AUTERI, A. et al. Clinical study on pharmacological interaction between nimesulide and warfarin. **Int. J. Clin. Pharm. Res.**, v.11,n.6,p.267-270, 1991.
10. BABIOR, B.M. The respiratory burst of phagocytes. **J. Clin. Invest.**, v.73,p.599-564, 1984.
11. BABSON, S. R., BABSON, A. L. Development and evaluation of a disposable device for performing simultaneous duplicate bleeding time determinations. **Am J Clin Pathol.**, v.70, p.406-408, 1978.

12. BALLOU L R, CHEUNG, W.Y. Marked increase of human phospholipase A₂ activity *in vitro* and demonstration of an endogenous inhibitor **Proc Natl Acad Sci., USA**, v.80,p.5203, 1983.
13. BAST, A. et al. Oxidants and Antioxidants: State of art. **Am. J. Med.**, v.91,p.3c-13s, Sept.30 1991. [Suplement 3c]
14. BEAUMONT, J.L., CAEN, J., BERNARD, J. Influence de l'acide acetyl salique dans les maladies hemorragiques. **Sangre**, Barc, p.27-243, 1956.
15. BECKER, E.L. The short and happy life of neutrophil activation. **J. Leukocyte Biol.**, v.47,p.378-380, 1990.
16. BELL, R. L., KENNERLY, D.A., STANFORD, N., Diglyceride lipase: A pathway for arachidonate release from human platelets. **Proc natl Acad Sci., USA**, v.76,p.3238, 1979.
17. BENVENISTE, J., HENSON, P.M., COCHRANE, C.G. Leukocytes-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils and platelet activating factor. **J. Exp. Med.**, v.136,p.1356-1377,1972.
19. BERGER, K. et al. **Antioedema, analgesic and antipyretic activities of nimesulide by rectal route.** In 2nd World Conference on Inflammation, Monte Carlo, 1986.
20. BERTI, F. et al. Antianaphylatic and antihistaminic activity of the non-steroidal antiinflammatory compound nimesulide in guinea-pig. **Arzn-Forsch.**, v.40,n.2,p.1011-1016, 1990.
21. _____ et al. Nimesulide, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, display antianaphylatic and antihistaminic activity in guinea pigs. **Drugs Invest.**, v.3,p.39-47, 1991.
22. BEVILACQUA, M. et al. Activation of protein kinase C by respiratory burst stimulants desensitizes β 2-adrenoceptors on human neutrophils, Antagonism by drugs affecting protein kinase C. **Drug Invest.**, v.3,p.54, 1991. [Suplement 2]
23. _____ et al. Nimesulide decrease superoxide productoin by inhibiting phosphodiesterase type IV. **Eur. J. Pharmacol. - Molecular Pharmacology Section**, v.268,p.415-423, 1994.

24. _____, VAGO, T., BERETTA, A. Nimesulide as inhibitor of superoxide anions (O_2^-) production by human polymorphonuclear leukocytes. **Pain Reproduct**, v.31,p.265-72, 1988.
25. BICK, R.L., ADAMS, T., Schmalhort, W.R. Bleeding times, platelet adhesion and aspirin. **Am J Clin Pathol.**, v. 65, p.69-72; 1976.
26. BILLAH, M.M., LAPETINA, E.G.. Rapid decrease of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in thrombin-stimulated platelets. **J. Biol. Chem.**, v.257,p.12705-12708, 1982.
27. BISCARINI, L. PATOIA, L., DEL FAVERO, A. Nimesulide: a new non steroidal antiinflammatory agent. **Drugs Today**, v.24, p.23-7, 1988.
28. BJORNSSON, T.D., SCHNEIDER, D.E., BERGER, H.J. Aspirin acetylates fibrinogen and enhances fibrinolysis. Fibrinolytic effect is independent of changes in plasminogen activator levels. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v.250,p.154, 1989.
29. BLOCKMANS, D.; DECKMYN, H.; VERMYLEN, J. Platelet activation. **Blood Rev**, v.9,p.143-156, 1995.
30. BOCHGRERINK, C. H., WAALER, B.A. The secondary bleeding time, A new method of differentiation of hemorrhagic diseases. **Acta Med Scand.**, v.162,p.361, 1958.
31. BÖRGER, R.H. et al., Rapid and selective inhibition of platelet aggregation and thromboxane formation by intravenous low dose aspirin in man. **Clin. Sci.**, v.84,p.517-524, 1993.
32. BORN, G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. **Nature.**, v.195,p. 927-929, 1962.
33. _____. Uptake of adenosine nad of adenosine diphosphate by human blood platelets. **Nature**, v.206,p.1121, 1965.
34. BORN, G.V.R. FEINBERG, H. Binding of adenosine diphosphate to intact human platelets. **J.Physiol.**, v.251,p.803, 1975.
35. BOSE, S., ROOHI, F., SHIRALKAR, M. Effect of variable low doses of aspirin on platelet functions. **Indian J. Physiol Pharmacol.**, v.38,n.1,p.56-60, 1994.

36. BÖTTCHER, I. et al. A sulphonamide indanone derivative CGP 28237 (ZK 34229), a novel non-steroidal anti-inflammatory agent without gastrointestinal ulcerogenicity in rats. **Drugs Exp. Clin. Res.**, v.13,p.237-245, 1987.
37. BRAQUET, P. et al. Perspectives in platelet-activating factor research. **Pharmac. Reviews**, v.39, n.2,p.97-134, 1987.
38. BRASS, L.F., JOSEPH, S.K. A role for inositol triphosphate in intracellular Ca^{2+} mobilization and granule secretion in platelets. **J. Biol. Chem.**, v.260,p.15172, 1985.
39. BUCCI, E. et al. Studio clinico sull'attività terapeutica e la tollerabilità della nimesulide in formulazione supposte in odontostomatologia. **Minerva Stomat.**, v.39,n10,p.827-829, Oct. 1990.
40. BURCH, J.W. et al. Sensitivity of fatty acid COX from human aorta to acetylation by aspirin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.75,p.5181-5184, 1978a.
41. _____; STANFORD, N., MAJERUS, P.W. Inhibition of platelet prostaglandin synthetase by oral aspirin. **J. Clin. Invest.**, v.61,p.314-319, Fev.1978b.
42. BURCHANN, M.R., MAJERIUS, P.W. The role of prostaglandins in platelet function. **Sem. Hematol.**, v.16,p.96-207, 1979.
43. CAMUSSI, G., TETTA, C., BUSSOLINO, F. Inhibitor effect of prostacyclin (PGI₂) on neutropenia induced by intravenous injection of platelet-activating-factor (PAF) in the rabbit. **Prostag.**, v.25,p.343-351, 1983.
44. CAPECCHI, P.L. et al. Inhibition of neutrophil function in vitro by nimesulide. Preliminary evidence of an adenosine-mediated mechanism. **Arzn. Forsch.**, v.43,p.992-6, 1993.
45. CAPSONI, F. et al. Inhibition of neutrophil oxidative metabolism by nimesulide. **Agents Actions**, v.21,p.121-129, 1987.
46. CARDONA, M. et al., Efecto del ácido acetilsalicílico a dosis bajas sobre los parámetros de agregación plaquetária in vitro. **Rev Esp. Cardiol.**, v.45,p.264-269, Apr.1992.

47. CARR, D.P., HENN, R., GREEN, J.R. Comparison of the systemic inhibition of thromboxane synthesis, anti-inflammatory drugs in the rat. **Agents Action**, v.19,p.375-5, 1986.
48. CASCIARRI, I., TOFANETTI, O., CIPOLLA, P.V. Effect of the new antiinflammatory drug nimesulide on 6-keto-PGF 1α , PGE 2 and TXB 2 gastrioc production compared with ASA and salsalate. Proceedings of the 22nd Congress of the Italian Society of Pharmacology, Bologna, 1984.
49. CASOLARO, V. et al. Nimesulide, a sulphonanilide nonsteroidal anti-inflammatory drug, inhibits mediator release from human basophils and mast cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.263,n.3,p.1375-1385.
50. CASSEY, P.S., GILMAN, A.G. G protein involvement in receptor-effector coupling. **J. Biol. Chem.**, v.26,p.2577-2580, 1988.
51. CASTILHO, R., BASTIDA, E. Hematologia Clinica. 2ed., Barcelona, Doyma, Barcelona, 1988. 547-641p.
52. CERLETTI, C. et al. Aspirin kinetics and inhibition of platelet thromboxane generation. **Arth. Rev.**, v.13,p.67-77, 1985.
53. _____ et al. Biochemical selectivity of oral versus intravenous aspirin in rats. **J. Clin Invest.**, v.78,p.323-6, 1986.
54. CESERANI, R. et al. Antipyretic and platelet antiaggregating effects of nimesulide. **Drugs**, v.46,p.48-51, 1993. [Suplement 1]
55. CHARO, I.F., FEINMAN, R.D., DETWILER, T.C. Interrelations of platelet aggregation and secretion. **J. Clin. Invest.**, v.60,p.866-873, 1977.
56. CHESNEY, C.M. et al. Effect of platelet-activating factor (PAF) on human platelets. **Blood**, v.59,p.582-585, 1982.
57. CHIGNARD, M.L.E. et al. J Platelet-activating factor (PAF-acether) secretion from platelets: effect of aggregating agents. **Br. J. Haematol.**, v.46,p.455-464, 1980.
58. CLARCK, J.G., BENJAMIN, N., LARKIN, S. W. Endothelin is a potente long-lasting vasoconstrictor in men. **Am J. Physiol.**, v.257,p.2033, 1989.
59. CLARK, N. FOUKE, B.A. Gengival hemorrhage related to aspirin ingestion. **J. Periodontol.**, v.47,n.6, p.355-7, Jun. 1976.

60. CLARKE, R.J. et al., Supression of thromboxane A2 but not of systemic prostacyclin by controlled-release aspirin. *N Engl J. Med.*, v.325,p.1137-41, 1991.
61. CLELAND, L.G. Oxy radicals, 'peroxide tone' and inflammation. *J. Rheumatol.*, v.11,p.727-726.
62. COLLER, B.S. Platelet aggregation by ADP collagen and ristocetin: a critical review of methodology and analysis, in *CRC Handbook Series in Clinical Laboratory Sciences. Sec. I Hematology*, v.I, Ed. Boca Raton, CRC Press, 1979. *Apud* WILLIAN, J., et al. *Hematology*. 4ed., New York Mc Graw Hill, 1990. p.1161-1390.
63. COLMAN, R.W. Platelet activation: role of and ADP receptor. *Semin Hematol.*, v.23,p.119, 1986.
64. DALLEGRI, F. et al. Inactivation of neutrophil-derived by hypochlorous acid by nimesulide: a potential mechanism for the tissue protection during inflammation. *Int. J. Tissue React.*, v.12,n.2,p.107-11, 1990.
65. _____ et al. Neutrophil oxidative responses. Cell-directed and scavenging actions of the anti-inflammatory drug nimesulide. *Drug Invest.*, v.3,p.71-4, 1992. [Suplemment 1]
66. De FURIA, F.G. et al. The acetylation of hemoglobin by aspirin. 1st. International Symposium on Sickle Cell Disease, p.185-186, 1974. *Apud* ROTH, G.J., STANDFOR, G.J.N., MAJERUS, P.W. Acetylation of prostaglandin synthetase by aspirin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.72,p.3073-3076, 1975.
67. DELMAETRO, R.F. Na approach to free radical in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand.*, v.492,p.153, 1980. [Suplemment]
68. DUKE, W.W. The reallion of blood platelets to hemorrhagic disease, Descriton of a method for determining the bleeding time and coagulation time and report of three cases of hemorrhagic disease relieved by transfusion. *JAMA*, v.55,p.1185-92, 1910.

69. EGEM, R.W., PASTON, J., KUCHL, F.A.Jr. Mechanism for irreversible self activation of prostaglandin synthetase. *J. Biol. Chem.*, v.251,p.7329-7335, 1976.
70. EMKEY, R.D. Aspirin and Renal Disease. *Am J. Med.*, v.14,p.97-100, Jun. 1983.
71. FANTONE, J.C., WARD, P.A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J. Pathol.*, v.107,p.397-418, 1982.
72. FEINSTEIN, M.B., EGAN, J.J., OPAS, E.E. Reversal of thrombin-induced myosin phosphorylation and the assembly cytoskeletalstructures in platelets by the adenylate cyclase stimulants prostaglandin D2 and forskolin. *J. Biol. Chem.*, v.258,p.1260-1267, 1983.
73. FERRASIS, V.A. et al. Preoperative aspirin ingestion increases operative blood loss after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg.*, v.45,p.71-4, 1988.
74. FERREIRA, S. ASPIRINA. *Ciência Hoje.*, v.3,n.17,p.56-62, Març-Abr.,1985.
75. FINGUERRA, M. et al. A new non-steroidal anti-inflammatory agent, nimesulide, in the treatment of inflammatory disorders of the lung. *Clin Ter.*, v117,p.199-206, 1986.
76. FIORE, L.D. et al. The bleeding time response to aspirin. *Am clin Pathol.*, v.94,p.292-296,1990.
77. FITZGERALD, G.A. et al. Endogenous biosynthesis of prostacyclin and thromboxane and platelet function during chronic administration of aspirin in man. *J. Clin. Invest.*, v.71,p.676-688, Marc 1983.
78. FUJIMOTO, T., OHARA, S., HAWIGER, J. Thrombin-induced exposure and prostacyclin inhibition of the receptor for factor VIII/von Willebrand factor on human platelets. *J. Clin. Invest.*, v.69,p.1212-1222, 1982.
79. GAARDEN, A., JONSEN, J., LALAND, S. Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature*, v.192,p.531-533, 1961.

80. GABRIEL, S.E., JAAKKIMAINEN, L., BOMBARDIER, C. Risks for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A meta-analysis. **Ann Intern Med.**, v.115, p.787-796, 1991.
81. GAMARSKI, J. A terapia das artropatias degenerativas com nimesulide. **Rev. Bras. Med.**, v.38, p.309-317, 1981.
82. GERRARD, J.M. et al. A reassessment of the bleeding time: Association of age, hematocrit, platelet function, von Willebrand factor, and bleeding time thromboxane B2 with length of the bleeding time. **Clin Invest Med.**, v.12, p.165-171, 1989.
83. _____, WHILE, J.G. Prostaglandins and thromboxanes: 'middlemen' modulating platelet function in hemostasis and thrombosis. **Prog. Hemos. Throm.**, v.4, p.87-125, 1978.
84. GILMAN, A.G. G Proteins and dual control of adenylate cyclase. **Cell.**, v.36, p.577-579, 1984.
85. GORMAN, R.R. Modulation of human platelet function by prostacyclin and thromboxane A₂. **Fed. Proc.**, v.38, p.83-88, 1979.
86. GRALNICK, H.R. et al. Platelet von Willebrand factor: Na important determinant of the bleeding time in type I von Willebrand's disease. **Blood**, v.68, p.58, 1986.
87. GRANT, J.A., SCRUTTON, M.C. Novel α_2 -adrenoceptors primarily responsible for inducing human platelet aggregation. **Nature**, v.277, p.659, 1979.
88. GRANT, P.G., COLMAN, R.W. Purification and characterization of a human platelet cyclic nucleotide phosphodiesterase. **Biochemistry**, v.23, p.1801-1807, 1984.
89. GRANT, T.J., MOORE, G.G.I., SWINGLE, K.F. Antiinflammatory activity of 4-nitro-2-phenoxymethanesulfonamide (R805). **Fed. Proc.**, v.34, n.3, p.759, 1975.
90. GREENWALD, R.A. Current approaches to the development of oxygen radical scavengers. **Drugs Today**, v.26, n.5, p.299-307, 1990.

91. HACK, et al. The inhibition of platelet COX by aspirin is associated with the acetylation of a 72k Da polypeptide in the intracellular membranes. **Biochem J.**, v.223,p.105, 1984.
92. HAMBERG, M. et al. Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v.71,p.345-349, 1974a.
93. _____, SVENSSON, J., SAMUELSSON, B. Prostaglandin endoperoxides. A new group concept concerning the mode of action and release of prostaglandins. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.71,p.3824-3828, 1974b.
94. _____, _____, _____. Thromboxanes; A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.72,p.1994-2998, 1975.
95. HAMMARSTROM, S., FALARADEAU, P. Resolution of prostaglandin endoperoxide synthase and thromboxane synthase of human platelets. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v.74, p.3691-3695, 1977.
96. HANASHAN, D.J. Platelet activating factor a biologically active phosphoglyceride. **Ann. Rev Biochem.**, v.55,p.483, 1986.
97. HANLEY, S.P. et al., Differential inhibition by low-dose aspirin of human venous prostacyclin synthesis and platelet thromboxane synthesis. **Lancet.**, p.969-971, 1981.
97. HARKER, L. A. Platelet survival time: its measurement and use. **Prog Hemost. Thromb.**, v. 4,p.321-326, 1978.
98. _____, SLICHER, S.J. The bleeding time as a screening test for evaluation of platelet function. **N Engl J. Med.**, v.287,p.155-9, 1972.
99. HARVATH, L. et al. CAMP and human neutrophil chemotaxis. Elevation of cAMP differentially affects chemotactic responsiveness. **J. Immunol.**, v.146,p.224-228, 1991.
100. HENRY, D., ROBERTSON, J. Nonsteroidal Anti-inflammatory and peptic ulcer Hospitalization Rates in New South Wales. **Gastroent.**, v.104,p.1083-1091, 1993.

101. HENSON, P.M., JOHNSTON, R.B.Jr. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases and cationic proteins. **J. Clin. Invest.**, v.79,p.669-74, 1987.
102. HJORT P F, STORMORKEN, H. A study of the *in vitro* and *in vivo* effects of a synthetic heparin-like anticoagulant: Dextran Sulphate scan. **J Clin Lab Invest.**, v.9,n.29,p.1, 1957.
103. HOFFBRAND, A.V., BRAIN, M.C., HIRSH, J. Recent advances in Haemathology. v.2, 1977.
104. HOLMSEN, H. The platelet: its membrane, physiology, and biochemistry. **Clin. Haematol.**, v.1,p.235-240, 1972.
105. _____, WEISS, H.J. Secretable storage pools in platelets. **Ann. Rev. Med.**, v.30,p.119-130, 1979.
106. HWANG, S.B., LAM, M-H, PONG, S-S. Ionic and GTP regulation of binding of platelet-activating factor to receptors and platelet-activating factor-induced activation of GTPase in rabbit platelet membranes. **J. Biol. Chem.**, v.261,p.532-537, 1986.
107. IVY, A.C., SHAPIRO, P.F., MELNICK, P. The bleeding tendency in jaundice. **Surg Gynecol Obstet.**, v.60,p.781-4, 1935.
108. JAFFE, E.A.; WEKSLER, B.B. Recovery of endothelial cell prostacyclin production after inhibition by low dose aspirin. **J. Clin Invest.**, v.63,p.532, Marc. 1979.
109. JAFFE, R., DEYKIN, D. Evidence for a structural requeriment for the aggregation of platelets by collagen. **J. Clin. Invest.**, v.53,p.875, 1974.
110. JEFFERSON, J.R., HARMON, J.T., JAMIESON, G. A Identification of high-affinity (Kd 0.35 mol/L) and low affinity (Kd 7.9 μ mol/L) platelet binding sites for ADP and competition by ADP analogues. **Blood**, v.71, p.110, 1988.
111. KANESHIRO, M.M. et al., Bleeding time after aspirin in disorders of intrinsic clotting. **N. Engl. J. Med.**, v.281, p.1039-1042, 1969.
112. KAO, K.J., SHAUT, D.M., KLEIN, P.A. Functional involvement of thrombospondin in platelet aggregation induced by low versus high concentrations of thrombin. **Thromb. Haemostas.**, v.55,p.136-142, 1986.

113. KAPLAN, K.L. β -Thromboglobulin. In Spaet, T.H. (ed) Progress in Hemostasis and Thrombosis, Grune & Stratton, N. Y, v.5, p.153-178, 1980. *Apud* VERSTRAETE, M., VERMYLEN, J. Trombose. Ed. Sarvier, São Paulo, 1989. 356p.
114. KELLY, J.J. Salicylate ingestion: a frequent cause of gastric haemorrhage. **Am J. Med Sc.**, v.232, p.119, 1956.
115. KHAN, S.H., LANE, P.A., SMITH, A.D. Disaggregation of PAF-acether-aggregated platelets by verapamil and TMB-8 with reversal of phosphorylation of 40K and 20K proteins. *Eur. J. Pharmacol.*, v.107, p.198, 1985.
116. KIM, M.H., NEUBIG, R.R. Membrane reconstitution of high-affinity α 2-adrenergic antagonist binding with guanine nucleotide regulatory proteins. **Biochim.**, v.26, p.3664, 1987.
117. KINLOUGH-RATHBONE, R.L. et al. Mechanisms of platelet shape change, aggregation and release induced by collagen, thrombin or A23187. **J. Lab. Clin. Med.**, v.90, p.707-719, 1977.
118. _____, PACKHAM, M.A., MUSTARD, J.F. Vessel injury platelet adherence, and platelet survival. **Arterioscl.**, v.3, p.529-546, 1983.
119. KISHIMOTO, A. et al. Activation of calcium and phospholipid dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. **J. Biol Chem.**, v.255, p.2273, 1980.
120. KITCHEN, L., ERICHSON, R.B., SIDEROPOULOUS, H. Effect of drug induced platelet dysfunction on surgical bleeding. **Am J. Surg.**, v.43, p.215-7, 1982.
121. KROLL, M.H., SCHAFER, A.I. Biochemical mechanism of platelet activation. **Blood**, v.74, p.1181-95, 1989.
122. KUEHL, F.A. **Adv. Prostaglandin. Thromboxane Res.**, v.6, p.77, 1980. *Apud* RUFER, C. et al. Non-steroidal anti-inflammatories-XII Mode of action of anti-inflammatory methane sulfonanilides. **Bioch. Pharmacol.**, v.31, n.22, p.3591-3596, 1982.
123. KUMAR, V., COTRAN, R.S., ROBBINS, S.L. Patologia Básica. 5ª ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1994. 608p.

124. KUMAR, R., ANSELL, J.E., CANOS, R.T. Clinical trial of a new bleeding time device. **Am J Clin Pathol.**, v.70,p.642-645, 1978.
125. LAD, P.M. et al. The beta-adrenergic receptor in the human neutrophil plasma membrane: receptor-cyclase uncoupling is associated with amplified GTP activation. **J. Immunol.**, v.132,p.1466, 1984.
126. LANDS, W.E., BYRNES, M.J. The influence of ambient peroxides on the conversion of 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid prostaglandin. **Prog. Lipid. Res.**, v.20,p.287-290, 1982.
127. LAPORTE, J-R. et al. Upper gastrointestinal bleeding in relation to previous use of analgesic and non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Lancet** v.337,p.85-89, 1991.
128. LAWRENCE, C., SAKUNTABHAI, A., TILING-GROSSE, E. Effect of aspirin and nosteroidal antiinflammatory drug therapy on bleeding complications in dermatologic surgical patients. **J Am. Acad Dermatol.**, v.31:988-92, 1994.
129. LEDERMAN, R., RUBINSTEIN, J. Estudo controlado com Nimesulide e ibuprofeno no tratamento de processos inflammatorios extraarticulares. **Fol. Med.**, v.84,p.301-306, 1982. [Suplemment 1]
130. LEGRAND, Y.T. et al. Microfibrils (MF), Platelet interaction: requeriment of von Willebrand factor. **Thromb. Res.**, v.19,p.737, 1980.
131. MACMILLAN, D.C. Secondary clumping effect in human citrated platelet rich plasma produced by adenosine diphosphate and adrenaline. **Nature**, v.211,p.140, 1966.
132. MAFFEI-FACINO, R., CARINI, M., ALDINI, G. Antioxidant activity of nimesulide and its main metabolities. **Drugs**, v46,p.15-21, 1993. [Suplemment 1]
133. MAGNI, E. The effect of nimesulide on prostanoid formation. **Drugs**, v.46,p.10-14, 1993. [Suplemment 1]
134. MANTOVANI, M., Dal Pra, M.L. Impiego clinico di aulin nelle flogosi dell'orecchio medio. **Otorinol.**, v.37,p.445-450, 1987.
135. MARCUS, A.J. Platelet function (second of three parts). **N. Engl J. Med.**, v.280,p.2169, 1969.

136. MARINI, U. et al. Double-blind endoscopic study comparing the effect of nimesulide and placebo on gastric mucosa of dyspeptic subjects. **Drug Invest.**, v.2,p.162-6, 1990.
137. MARINO, O. et al. Inhibition of histamine release from human FcERI+ cells by nimesulide. **Agents Actions**, Special Conference Issue, p.C311-C314, 1992
138. MASON, R.P., CHIGNELL, C.F. Free radicals in pharmacology and toxicology- selected topics. **Am. Soc. Pharm. Exp. Ther.**, v.33,n.4,p.189-211, 1982.
139. MASOTTI, G. et al. Differential inhibition of prostacyclin production and platelet aggregation by aspirin. **Lancet**, v.II,p.1213-1216, 1979.
140. McINTYRE, B.A, PHILP, R.B., INWOOD, M.J. Effect of ibuprofen on platelet function in normal subjects and haemophiliac patients. **Clin Pharmacol Ther.**, v.24,p.616-21, 1978.
141. McINTYRE, D.E., SHAW, A.M. Phospholipid-induced human platelet activation: effects of calcium channel blockers and calcium chelators. **Thromb. Res.**, v.31,p.823-844, 1983.
142. MCPHAIL, L.C., CLAYTON, C.C., SNYDERMAN, R. The NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for regulation by multiples signals. **J. Biol. Chem.**, v.259,p.5678-5775, 1984.
143. MIELKE, C.H.Jr. Ternplate bleeding time: technical evaluation and comparison to other methods in normal adults. In: Day, H.J., Holmsen, H., Zucker, M.J, Platelet function testing. DHEW publication, Washington: U.S. Government Printing Office, n.78,p.1087, 1978. *Apud* MIELKE, C.H.Jr: Aspirin prolongation of the template bleeding time: influence of venostasis and direction of incision. **Blood**, v.60,p.1139-1142, 1982.
144. MIELKE, C.H.Jr: Aspirin prolongation of the template bleeding time: influence of venostasis and direction of incision. **Blood**, v.60,p.1139-1142, 1982.
145. MIELKE, C.H.Jr. Influence of aspirin on platelets and the bleeding time. **Am. J. Med.**, v.14,p.72-78, Jun. 1983.
146. MIELKE, C. H.Jr., KANESHIRE, M. M., MAHER, I. A. The standardized normal Ivy bleeding time and its prolongation by aspirin. **Blood**, v.34,p.204, 1969.

147. MILLER, O.V., GORMAN, R.R. Evidence for distinct prostaglandin I₂ and D₂ receptors in human platelet. **J. Pharmacol Exp. Ther.**, v.210, p.134, 1979.
148. MILLS, D.C.B., ROBB, I. A., ROBERTS, G.C.K. The release of nucleotides, 5-hydroxytryptamine and enzymes from human blood platelets during aggregation. **J Physiol.**, v.195,p.715, 1968.
149. MILVIO, C. Nimesulide for the treatment of painful inflammatory process in the ear, nose and throat areas: a double-blind controlled study with benzydamine. **J. Inter. Med. Res.**, v.12,p.327-332, 1984.
150. _____, Treatment of influenza syndrome. A double-blind controlled trial of nimesulide vs aspirin. **Clin T. J.**, v.22,p.111-117, 1985.
151. MITCHELL, J.A. et al. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cycloxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v.90,p.11693-7, 1994.
152. MONCADA, S., HERMAN, A.G., VANHOUTTE, P. Endothelium-derived relaxing factor is identified as nitric oxide. **TIPS**, v.8,p.365-368, 1987.
153. MONCADA, S KORBET, R. Dipyridamole and other phosphodiesterase inhibitors act as antithrombotic agents by potentiating endogenous prostacyclin. **Lancet**, v.1,p.1286-1288, 1978.
154. MONIACI, D. et al. Valutazione dell'efficacia e della tollerabilità della nimesulide in alcune patologie odontostomatologiche. **Min. Stomat.**, v.37,p.291, 1988.
155. MOORE, G.G.I., HARRINGTON, J.K. Patent 3, v.840,p.597, 1974. *Apud* SWINGLE, K.F., MOORE, G.G.I., GRANT, T.J. 4-Nitro-2-Phenoxyethanesulfonamide (R805): a Chemically Novel Antiinflammatory Agent. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v.221,p.132-139, 1976.
156. MUSTARD, J.F., KINLOUGH-RATHBONE, R.L., PACKHAM, M.A. Prostaglandins and platelets. **Ann. Rev. Med.**, v.31,p.86-89, 1980.
157. NADELL, J. e al. Effect of naproxen and aspirin on bleeding time and platelet aggregation. **J. Clin Pharmacol.**, v.14,p.176-82, 1974.

158. NATHAN, C., SANCHEZ, E. Tumor necrosis factor and CD11/CD18 ($\beta 2$) integrins act synergistically to lower cAMP in human neutrophils. **J. Cell. Biol.**, v.111,p.217-20, 1990.
159. NEEDLEMAN, P. et al. Thromboxane synthetase inhibitors as pharmacological tools, differential biochemical and biological effects on platelet suspensions. **Prostag.**, v.14,p.897-907, 1977.
160. NEWMAN, K.D., WILLIAMS, L.T., BISHOPRIC, N. H. Identification of adrenergic receptors ion human platelets by [3 H] dihydroercryptine binding. **J.Clin. Invest.**, v.61,p.395, 1978.
161. NIELSON, C.P. et al. Effects of selective phosphodiesterase inhibitors on the polymorphonuclear leukocyte respiratory burst. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v.86,p.801-805, 1990.
162. NIEUWENHUIS, H. K., AKKERMAN, J.W. N, HOUDIJK, W.P.M. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. **Nature**, v.318,p. 470, 1985.
163. NIEWIAROWSKI, S. et al. The release of platelet clotting factors during aggregation and viscous metamorphosis. **Exp. Biol. Med.**, v.3,p.121, 1968.
164. O'BRIEN, J.R. The bleending time in normal and a abnormal subjects. **J. Clin Pathol.**, v.4,p.272, 1951.
165. O'BRIEN, J. R. Some effects of adrenaline and anti-adrenaline compounds on platelets *in vitro* and *in vivo*. **Nature**, v.200,p.763-764,1963.
166. O'BRIEN, J.R. Effects of salicylates on human platelets. **Lancet**, v.1,p.779-83, 1968.
167. O'BRIEN, J.R., FINCH, N., CLAIR, E. A comparison of na effect of different antiinflammatory drugs on human platelets. **J. Clin. Pathol.**, v.23,p.522, 1970.
168. ORBAN, B., GOTTLIEB, B. Periodontics in the tradition of Orban and Gottlieb. ed by D.A Grant, I. B. Stern and G.G. Everett. 5 ed. St Louis, C.V. Mosby, 1979. P515-7 *Apud* ROSALEM, P.L. Estudo dos efeitos de antiácidos na farmacocinética e reatividade do fluoreto com o esmlate dental, após

- aplicação tópica de flúor em gel. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 1991. 138p.
169. PACIORETH, M.J., BLOCK, L.H. Effects of aspirin on platelet aggregation as a function of dosage and time. **Clin Pharmacol Ther.**, v.27,p.803-809, 1980;
170. PAIS, J.M. RASTEIRO, F.N. Nimesulide in the short term treatment of inflammatory process of dental tissue. A double-blind controlled trial against oxyphenbutazone. **J. Int. Med. Res.**, v.3, p.149, 1983.
171. PALMER, R.M.J., FERRIGE, A.G., MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v.327,p.524-526, 1987.
172. PEDERSEN, A.K., FITZGERALD, G.A. Dose-related kinetics of aspirin-presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase. **N. Engl. J. Med.**, v.311,p.1206-11, 1984.
173. PEERSCHKE, E.I. Induction of human platelet fibrinogen receptors by epinephrine in the absence of released ADP. **Blood**, v.60,p.71, 1982.
174. PHILIPS, D.R. et al. The platelet membrane glycoprotein lib-lia complex. **Blood**, v.71,p.831-843, 1988.
175. PINCKARD, R.N., HAWKINS, D., FARR, S. In vitro acetylation of plasma proteins, enzymes and DNA by aspirin. **Nature**, Lond, v.219,p.68-69, 1968.
176. PRESTON, F.E. et al. Inhibition of prostacyclin and platelet thromboxane A2 after low-dose aspirin. **N Engl Med.**, v.304,p.76-79, 1981.
177. PRESTON, F.E.; GREAVES, M.; JACKSON, C.A. Low-dose aspirin inhibits platelet and venous cyclo-oxygenase in man. **Thromb. Res.**,v.27, p.477-484, 1982.
178. PURDON, A.D., SMITH, J.B. Turnover of arachidonic acid in the major diacyl and ether phospholipids of human platelets. **J Biol Chem.**, v.260,p.12700, 1985.

179. RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M.J., MONCADA, S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. **Lancet**, v.2,p.1057-1058k, 1987.
180. _____, _____, _____. An L-arginine to nitric oxide pathway in human platelets regulates aggregation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.87,p.5193-5197, 1990.
181. RAINSFORD, K.D. The comparative gastric ulcerogenic activities of non-steroid anti-inflammatory drugs; **Agents and Action**, v.7,p.573-577, 1977.
182. REINER, M., MAGNI, E. Efficacy and safety of nimesulide in the short-term treatment of rheumatoid arthritis. **Cur. Ther. Res.**, v,31, p.906-912, 1982.
183. REINER, M., MASSERA, E., MAGNI, E. Nimesulide in the treatment of fever: a double-blind crossover clinical trial. **J Inter. Med. Res.**, v.12,p.102-107, 1984.
184. RITTENHOUSE-SIMMONS, S. Production of diglyceride from phosphatidylinositol in activated human platelets. **J. Clin. Invest.**, v.63,p.582-587, 1979.
185. RODGERS, R.P.C., LEVIN, J. A critical reappraisal of the bleeding time. **Semin. Thromb. Haemostas.**, v.16,p.1-20, 1990.
186. RORARIUS, M.G. et al. Effects of peri-operatively administered diclofenac and indometacin on blood loss, bleeding time, and plasma prostenoides in man. **Eur J. Anaesthesiol.**, v. 6,p.335-42, 1989.
187. ROSALEM, P.L. **Estudo dos efeitos de antiácidos na farmacocinética e reatividade do fluoreto com o esmalte dental, após aplicação tópica de flúor em gel.** Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 1991. 138p.
188. ROSKAM, J., HUGUES, J., BOUNAMEAUX, Y. The part played by platelets in the formation of an efficient hemostatic plug. **Thromb. Diath. Haemorrh.**, v.3,p.510-516, 1959.
189. ROSS, D. The respiratory burst of phagocytic leukocytes. **Drug Invest.**, v.3,p.48-53, 1991.

190. ROTH, G.J., SIOK, C.J. Acetylation of the NH₂-terminal serine of prostaglandin synthetase by aspirin. **J. Biol. Chem.**, v.253,p.3782-3785, 1978.
191. _____, STANDFOR, G.J.N., MAJERUS, P.W. Acetylation of prostaglandin synthetase by aspirin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.72,p.3073-3076, 1975.
192. RUFER, C. et al. Non-steroidal anti-inflammatories - XII: mode of action of anti-inflammatory methane sulfonamides. **Bioch. Pharmacol.**, v.31,p.3591-3596, 1982.
193. RYAN, W.L., HAKENKAMP,K. Variable response to aspirin measured by platelet aggregation and bleeding time. **Lab Med.**, v.22,p.197-202, 1991.
194. SALMON, J.A. A radioimmunoassay for 6-keto-prostaglandin F_{1α}. **Prostaglandins**, v.15, p.383-397, 1978.
195. SAMRA, S.K. et al. A study of aspirin-induced changes in bleeding time, platelet aggregation, and sonoclot coagulation analysis in humans. **Ann Clin Lab Sci.**, v.21,p.315-327, 1991.
196. SANFORD, J.S. et al. Hematology, 3ed, N.Y., 1990.
197. SANO, H. et al. Cyntocin and responses inflammatory. **J. Clin. Invest.**, v.89,p.97-108, 1992.
198. SANTORO, S. A Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. **Cell.**, v.46,p.913, 1986.
199. SCHAFER, A.I. et al. Identification of platelet receptors for prostaglandin I₂ and D₂. **J. Biol. Chem.**, v.254, p.2914, 1979.
200. SETTIPANE, G.A. Aspirin and allergic Diseases; a review. **Am. J. Med.**, v.14, p.102-109, Jun. 1983.
201. SHADLE, P.J., GINSBERG, M.H., PLOW, E.F. Platelet-collagen adhesion: Inhibition by a monoclonal antibody that binds to glycoprotein lib. **J Cell Biol.**, v.99,p.2056, 1984.
202. SINGER, R. Aspirin a probable cause for secondary post tonsille hemorrhage. **Arch. Otorynalog.**, Chicago, v.42,p.19, 1945.
203. SMITH, J.G., WILLIS, A.L. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. **Nature**, v.231,p.235-237, 1971.

204. STEENING COMMITTEE OF THE PHYSICIAN'S HEALTHY STUDY RESEARCH GROUP. Final report on the aspirin component of the ongoing physician's health study. **N. Engl. J. Med.**, v.321, p.129-139, 1989.
205. SWINGLE, K.F., MOORE, G.G.I. Preclinical pharmacological studies with nimesulide. **Drugs Exp. Clin. Res.**, v.10, p.586-597, 1974.
206. SWINGLE, K.F., MOORE, G.G.I., GRANT, T.J. 4 - nitro - 2 - phenoxy-methansulfonamide (R-805): a chemically novel anti-inflammatory agent. **Arch. Int. Pharmacod.**, v.221, p.132-139, 1976.
207. TAKENAWA, T., ISHITOYA, J., NAGAI, Y. Inhibitory effect of prostaglandin E₂, forskolin, and dibutyryl cAMP on arachidonic acid release and inositol phospholipid metabolism in guinea pig neutrophils. **J. Biol. Chem.**, v.261, p.1062-5, 1986.
208. TANAKA, K. et al. Pharmacological studies of the new antiinflammatory agent 3-formylamino-7-methylsulfonylamino-6-phenoxy 4H-1-benzopyran-4-one. Antiinflammatory, analgesic and other related properties. **Arzneim. Forsch.**, v.42, p.935-44, 1992.
209. TAVARES, I.A., BISHAI, P.M., BENNET, A. Activity of nimesulide on constitutive and inducible cyclooxygenases. **Arzneim.**, v.45, n.10, p.1093-5. Oct. 1995.
210. TECOMA, E.S. et al. Transient catecholamine modulation of neutrophil activation: kinetic and intracellular aspects of isoproterenol action. **J. leukocyte biol.**, v.40, p.629-632, 1986.
211. TOFFANETTI, O. et al. Effect of nimesulide on cyclo-oxygenase activity in rat gastric mucosa and inflammatory exudate. **Med. Sci. Res.**, v.17, p.745-746, 1989.
212. TOHGIO, H. et al. Effects of low-to-high doses of aspirin on platelet aggregability and metabolites of thromboxane A₂ and prostacyclin. **Stroke**, v.23, p.1400-1403, 1992.
213. UNDEM, B.J. et al. Inhibition by adenosine 3' 5'-monophosphate of eicosanoid and platelet-activating factor biosynthesis in the mouse PT-18 mast cell. **J. Biol. Chem.**, v.265, p.6750-6758, 1990.

214. VAGO, T., BEVILACQUA, M. NORBIATO, G. Effect of nimesulide action time dependence on selectivity towards prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase activity. **Arzneim.**, v.45,n.10,p.1096-8, Oct. 1995.
215. VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature-New Biology**, v.231,n.25,p.232-35, Jun.23 1971
216. _____, BOTTING, M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res.**, v.44,p.1-10, 1995.
217. VARGAFTIG, B.B., FOUQUE, F., LEPORT, J.J. Platelet aggregation and PAF-acether, pharmacological interferences. **J. Pharmacol.**, Paris, v.15,p.69-84, 1984.
218. VELO, G.P. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of nimesulide in experimental models. **Drug Invest.**, v.3,p.10-13, 1991. [Supplement 2]
219. VERHOEVEN, A.J. et al. Nimesulide inhibits platelet-activating factor synthesis in activated human neutrophils. **Drugs**, v.46,p.52-8, 1993. [Supplement 1]
220. VERSTRAETE, M., VERMYLEN, J. Trombose. Ed. Sarvier, São Paulo, 1989. 356p.
221. VIGDHAL, R.L., TUKEY, R.H. Mechanism of action novel anti-inflammatory drugs diflumidone and R-805. **Bioch. Pharmacol.**, v.26, p.307-311, 1977.
222. WALDMAN, R., NIEBERDING, M., WALTER, U. Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP and cGMP-dependent protein kinases. **Eur. J. Biochem.**, v.167,p.441-448, 1987.
223. WARD, A., BROGDEN, R.N. Nimesulide: a preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in inflammation and pain states. **Drugs**, v.36,p.732-753, 1988.
224. WATSON, C.J.E. et al. Identifiable factors in post prostatectomy haemorrhage: the role of aspirin. **Br. J. Urol.**, v.66,p.85-7,1990.
225. WEISS, H.J., ALEDORT, L.M., KOCHWA, S: The effect of salicylates on the hemostatic properties of platelets in man. **J Clin Invest.**, v.47,p.2169-2180, 1968.

226. WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **N. Engl. J. Med.**, v.320,p.365, 1989.
227. WEISSENBACH, R. Clinical trial with nimesulide, a new non-steroid anti-inflammatory agent, in rheumatic pathology. **J. Inter. Med. Res.**, v.9, p.349-352, 1981.
228. WEISSMANN, G. Aspirin. **Sci. Am.**, p.58-64, Jan. 1991.
229. WILLIAN, J., et al. Hematology. 4ed., New York Mc Graw Hill, 1990. p.1161-1390.
230. WILNER, G.D., NOSSEL, H.L., LEROY, E.C. Aggregation of platelets by collagen. **J.Clin. Invest.**, v. 47,p.2616-2621, 1968.
231. WOJNAR, R.J., HEARN, T., STARKWEATHER, S. Augmentation of allergic histamine release from human leukocytes by nonsteroidal anti-inflammatory-analgesic agents. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.66,p.37-45, 1980.
232. WRIGHT, J.T. The origin and nature of blood platelets Boston. **Med Surg. J.**, v.154,p.643-646, 1906. *Apud* WILLIAN, J., et al. Hematology. 4ed., New York Mc Graw Hill, 1990. p.1161-1390
233. XIE, W. et al. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v.88,p.2692-6, 1991.
234. ZIMMERLI, W., SANSANO, S., WEISENBERG-BOTTCHER, I. Influence of the anti-inflammatory compound flosulide on granulocyte function. **Biochem. Pharmacol.**, v.10,p.1913-7, 1991.
235. ZUCKER, M.B. The functionament of blood platelets. **Sci. Am.**, v.242,p.86-103, 1980.
236. _____, PETERSON, J. Inhibition of adenosine diphosphate-induced secondary aggregation and other platelet functions by acetylsalicylic acid ingestion. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, N.Y, v.127,p.547-551, 1968.