

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Silvino Sasso Robalo

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA EM PACIENTES COM
DIABETES *MELLITUS* TIPO 2 E SUA ASSOCIAÇÃO COM A
RESISTÊNCIA À INSULINA**

Santa Maria, RS
2016

Silvino Sasso Robalo

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA EM PACIENTES COM DIABETES
MELLITUS TIPO 2 E SUA ASSOCIAÇÃO COM A RESISTÊNCIA À INSULINA**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do Grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva
Coorientador: Dr. José Antonio Mainardi de Carvalho

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sasso Robalo, Silvino
AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA EM PACIENTES COM
DIABETES MELLITUS TIPO 2 E SUA ASSOCIAÇÃO COM A
RESISTÊNCIA À INSULINA / Silvino Sasso Robalo.- 2016.
53 p.; 30 cm

Orientador: José Edson Paz da Silva
Coorientador: José Antonio Mainardi de Carvalho
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

1. Diabetes 2. Resistência à insulina 3. Índice de
HOMA 4. Coagulação 5. Grânulos plaquetários I. Paz da
Silva, José Edson II. Mainardi de Carvalho, José Antonio
III. Título.

Silvino Sasso Robalo

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA EM PACIENTES COM DIABETES
MELLITUS TIPO 2 E SUA ASSOCIAÇÃO COM A RESISTÊNCIA À INSULINA**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do Grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 16 de dezembro de 2016:

José Edson Paz da Silva, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

José Antonio Mainardi de Carvalho, Dr. (UFSM)
(Coorientador)

Maria do Carmo dos Santos Araujo, Dra. (UNIFRA)

Guilherme Vargas Bochi, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

- *A Deus por me dar força para persistir e por me acompanhar nessa caminhada.*
- *Ao Prof. Dr. José Edson Paz da Silva, pela orientação, incentivo e desenvolvimento acadêmico que tem me proporcionado, bem como pela amizade e palavras de incentivo em cada conversa.*
- *Ao Dr. José Antonio Mainardi de Carvalho, pela coorientação, disponibilidade e paciência em auxiliar na realização desse trabalho, bem como pela amizade e exemplo pessoal e profissional que é para mim desde os tempos de LAC.*
- *Aos professores Dra. Maria do Carmo dos Santos Araujo e Dr. Guilherme Vargas Bochi, membros desta banca examinadora, pela sua atenção e gentil disponibilidade em avaliar este trabalho.*
- *Ao prof. Dr. Clovis Paniz, pelas importantes considerações sobre esse trabalho.*
- *A equipe do Labimed Análises clínicas pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho, em especial a Dra. Marta Maria Medeiros Duarte por acreditar e possibilitar o suporte necessário para o desenvolvimento do mesmo.*
- *Aos pacientes que aceitaram gentilmente participar deste projeto de pesquisa, muito obrigado;*
- *Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo trabalho constante na busca para o aperfeiçoamento profissional de seus alunos.*
- *A minha namorada, Daciele Giriboni Gabriel por estar sempre ao meu lado e por saber e compreender meus momentos de ausência.*
- *Aos meus pais Ramão Orico Vieira Robalo e Angela Sasso Robalo, por sempre me incentivarem a progredir e serem exemplos em minha vida. Obrigado pelo apoio, companhia, amor e compreensão em todos os momentos.*

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA EM PACIENTES COM DIABETES *MELLITUS* TIPO 2 E SUA ASSOCIAÇÃO COM A RESISTÊNCIA À INSULINA

AUTOR: Silvino Sasso Robalo

ORIENTADOR: José Edson Paz da Silva

COORIENTADOR: José Antonio Mainardi de Carvalho

A incidência de diabetes *mellitus* (DM) tem aumentado, tornando-se um problema de saúde pública global. Aproximadamente 415 milhões de pessoas em todo o mundo tem DM, causando complicações crônicas incluindo alterações no estado de homeostase sanguínea. No DM ocorrem distúrbios circulatórios devido a hiperreatividade das plaquetas, aumento da adesão, ativação e agregação plaquetária, resultando na liberação do conteúdo dos grânulos *alfa*, incluindo β -Tromboglobulina (β tg) e fator-4-plaquetário (CXCL4), bem como de tromboxano B2 (TxB2). A resistência à insulina (RI) tem se mostrado como preditora do DM e aterosclerose, bem como de doenças cardiovasculares. Um dos métodos utilizados para a avaliação da RI é através do índice de HOMA (Homeostasis model assessment). Esse trabalho objetivou verificar alterações na coagulação através da determinação das concentrações de fibrinogênio, D-dímeros e ativação plaquetária (TxB2, β tg e CXCL4) e associar com o índice de HOMA em pacientes diabéticos tipo 2 (DM2) recentemente diagnosticados. Foram recrutados 38 pacientes recentemente diagnosticados e não tratados com DM2 e 38 indivíduos saudáveis. Esses pacientes foram estratificados nos seguintes quartis de HOMA: HOMA-1 (0,89 a 1,77), HOMA-2 (1,77 a 5,26), HOMA-3 (5,26 a 11,32) and HOMA-4 (11,32 a 18,56). Níveis de fibrinogênio e D-dímeros foram dosados através de imunoturbidimetria, enquanto TxB2, β tg e CXCL4 foram quantificados por técnica de ELISA de acordo com as recomendações do fabricante. De acordo com os resultados os valores de HOMA foram positivamente correlacionados com TxB2 ($r = 0,75$, $p < 0,001$), β tg ($r = 0,75$, $p < 0,001$), CXCL4 ($r = 0,68$, $p < 0,001$), fibrinogênio ($r = 0,54$, $p < 0,001$) e D-Dímero ($r = 0,52$, $p < 0,001$). Além disso foi observado um aumento dos níveis destes marcadores nos quartis mais elevados de HOMA. Estes achados sugerem que pacientes recentemente diagnosticados com diabetes apresentam resistência à insulina a qual está relacionada com alterações na homeostase sanguínea e na liberação de componentes de grânulos de plaquetas capazes de estimular a resposta celular que pode causar aterosclerose. Em conclusão, pode ser sugerido que níveis elevados de HOMA podem servir como alerta para possíveis complicações na homeostase sanguínea e no metabolismo lipídico em pacientes diabéticos recentemente diagnosticados e que poderá causar complicações futuras que impactarão na qualidade de vida destes pacientes.

Palavras-chave: Diabetes. Resistência à insulina. Índice de HOMA. Coagulação. Grânulos plaquetários

ABSTRACT

ACTIVATION PLATELET ASSESSMENT IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND ITS ASSOCIATION WITH INSULIN RESISTANCE

AUTHOR: Silvino Sasso Robalo

ADVISOR: José Edson Paz da Silva

CO-ADVISOR: José Antonio Mainardi de Carvalho

The incidence of diabetes mellitus (DM) has increased, becoming a global public health problem. Approximately 415 million people worldwide have DM, causing chronic complications including changes in the state of blood homeostasis. In DM there are circulatory disorders caused by platelet hyperreactivity due to increased adhesion, activation and platelet aggregation, resulting in the release of the content of alpha granules, including β -thromboglobulin (β tg) and platelet-factor-4 (CXCL4), as well as thromboxane B2 (TxB2). Insulin resistance (IR) has been shown to predict DM and atherosclerosis, as well as cardiovascular diseases. One of the methods used for the evaluation of IR is through HOMA index (Homeostasis model assessment). This study aimed to verify changes in coagulation by determining the concentrations of fibrinogen, D-dimers and platelet activation (TxB2, β tg and CXCL4) and associate it with the HOMA model in newly diagnosed type 2 diabetic patients. We recruited 38 newly diagnosed and untreated patients with DM2 and 38 healthy subjects. These patients were stratified into the following HOMA quartiles: HOMA-1 (0.89 to 1.77), HOMA-2 (1.77 to 5.26), HOMA-3 (5.26 to 11.32) and HOMA-4 (11.32 to 18.56). Levels of fibrinogen and D-dimers were measured by immunoturbidimetric method, while TxB2, β tg and CXCL4 were quantified by ELISA technique according to the manufacturers' recommended protocols. According to the results HOMA values were positively correlated with TxB2 ($r = 0.75$, $p < 0.001$), β tg ($r = 0.75$, $p < 0.001$), CXCL4 ($r = 0.68$, $p < 0.001$), fibrinogen ($r = 0.54$, $p < 0.001$) and D-dimer ($r = 0.52$, $p < 0.001$). In addition, increased levels of these markers were observed in the higher HOMA quartiles. These findings suggest that patients newly diagnosed with diabetes have insulin resistance which is related to changes in blood homeostasis and the release of components of platelet granules capable of stimulating the cellular response that can cause atherosclerosis. In conclusion, it may be suggested that elevated levels of HOMA may serve as an alert for possible complications in blood homeostasis and lipid metabolism in newly diagnosed diabetic patients and that may cause future complications that will impact the quality of life of these patients.

Keywords: Diabetes. Insulin resistance. HOMA index. Coagulation. Platelet granule.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Cascata da coagulação.....	18
Figura 2 – Vias sinalizatórias CXCL4 em monócitos.....	24
Figura 3 – Síntese do tromboxano.....	25

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Tabela 1 – Clinical and biochemical characteristics of the participants.....	42
Tabela 2 – Laboratory characteristics of the study group in relation to Fibrinogen, D-dimer, CXCL4, TxB2, β tg and platelets.....	43
Tabela 3 – Coagulation and platelet activation markers stratified by HOMA index.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP:	Adenosina difosfato
AGE:	Produtos de glicação avançados
ATP:	Adenosina trifosfato
βtg:	β-tromboglobulina
CCL5:	Quimiocina ligante 5
COX-1:	Ciclooxigenase-1
COX-2:	Ciclooxigenase-2
CXCL4:	Fator-4-plaquetário
DAG:	Diacilglicerol
DM:	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1:	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2:	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
eNOS:	Oxido nítrico sintase endotelial (<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>)
EPC:	Células endoteliais progenitoras
Erk:	Quinase regulada por sinal extracelular (<i>Extracellular signal–regulated kinase</i>)
EROs:	Espécies reativas de oxigênio
ET-1:	Endotelina-1
HbA1c:	Hemoglobina glicada
HDL:	Lipoproteína de alta densidade
HOMA:	Modelo de avaliação da homeostase
IL-1:	Interleucina-1
IL-6:	Interleucina-6
INFγ:	Interferon <i>gama</i>
IP ₃	1,4,5-trifosfato
JNK:	<i>C-Jun N-terminal kinase</i>
LDL:	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-R:	Receptor de Lipoproteína de baixa densidade
MAPK:	Proteína quinase ativada por mitógenos (<i>Mitogenic activated protein kinase</i>)
MCSF:	Fator estimulador de colônias de macrófagos (<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>)
NO:	Oxido nítrico
OMS:	Organização mundial da saúde
oxLDL:	LDL oxidado
PAI-1:	Inibidor do ativador do Plasminogênio-1 (<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PGG ₂ :	Prostaglandina G ₂
PGH ₂ :	Prostaglandina H ₂
PGI ₂ :	Prostaciclina
PI3K:	Fosfatidilinositol-3-quinase (<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PKC:	Proteína quinase C
RI:	Resistência à insulina
RTp:	Receptor prostanóide de tromboxano
SphK1:	<i>Sphingosine kinase 1</i>
Syk:	Tirosina quinase esplênica (<i>Spleen tyrosine kinase</i>)
TF:	Fator tecidual
tPA:	Ativador do plasminogênio tecidual (<i>Tissue-type plasminogen activator</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TxA ₂ :	Tromboxano A ₂

TxB2: Tromboxano B2
uPA: Uroquinase ativadora de plasminogênio (*Urokinase-type plasminogen activator*)
VSMC: Células musculares lisas vasculares
vWF: Fator de vonWillebrand

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	DIABETES <i>MELLITUS</i>	14
1.2	DIAGNÓSTICO DO DIABETES <i>MELLITUS</i>	15
1.3	RESISTÊNCIA À INSULINA	15
1.4	DISFUNÇÃO ENDOTELIAL, ARTEROSCLEROSE E DIABETES	16
1.5	COAGULAÇÃO E DIABETES <i>MELLITUS</i>	17
1.6	PLAQUETAS	19
1.7	GRÂNULOS PLAQUETÁRIOS.....	21
1.7.1	β -Tromboglobulina	21
1.7.2	Fator-4-plaquetário.....	22
1.8	TROMBOXANO A2 E TROMBOXANO B2	24
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVO GERAL	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3	MANUSCRITO	28
4	CONCLUSÕES	45
5	REFERÊNCIAS	46

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está descrita de forma que primeiramente são apresentados os itens **INTRODUÇÃO** e **OBJETIVOS**. As seções **MATERIAIS e MÉTODOS, RESULTADOS e DISCUSSÃO** estão apresentadas sob a forma de manuscrito, o qual se encontra no item **MANUSCRITO**.

O item **CONCLUSÃO** está disposto após o manuscrito, apresentando interpretações e comentários gerais a respeito dos resultados apresentados no artigo. As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO** desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica de ocorrência crescente, que se tornou preocupação de saúde pública global (HURI; LING; WAN AHMAD, 2015). Mais de 415 milhões de pessoas sofrem desse distúrbio metabólico no mundo. Sendo silenciosa, sabe-se que este número é muito maior, já que muitas pessoas ainda não obtiveram o diagnóstico (IDF 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a glicemia elevada é o terceiro maior fator de risco para a mortalidade prematura, atrás da hipertensão e do tabagismo (WHO, 2009). O risco de desenvolvimento de doenças vasculares periféricas, coronárias ou cerebrais é até quatro vezes maior em pacientes diabéticos, sendo em grande parte causadoras de morte nesses pacientes (DUARTE et al., 2015).

Distúrbios circulatórios em diabéticos são caracterizados pelo avanço da tendência trombótica devido à hiper-reatividade das plaquetas, mostrando intensificação da adesão, ativação, agregação e liberação do conteúdo de grânulos *alfa* das plaquetas, como β -tromboglobulina (β tg) e fator-4-plaquetário (CXCL4), bem como incremento da síntese do tromboxano, que desempenham papel significativo no recrutamento e ativação de leucócitos da circulação para locais de inflamação do tecido (ROGALA; ASSESSMENT; KASPERSKA-ZAJAC, 2005; KIM, J.; BAE; KIM, S. 2013; ALEXANDRU et al., 2016). Além disso, causa acréscimo na ativação de fatores de coagulação pró-trombóticos juntamente com a redução da fibrinólise (ALZAHIRANI; AJJAN, 2010).

A resistência a insulina (RI) é definida como a ineficiência da insulina plasmática, em concentrações normais, de promover a homeostase glicêmica adequada (MADEIRA et al., 2008), resultando em hiperinsulinemia compensatória com o objetivo de produzir respostas fisiológicas adequadas (VASQUES et al., 2008; NICHOLS et al., 2015). O aumento da incidência da RI está sendo observado com grande prevalência quando associado com fatores de risco como obesidade, dislipidemia, hipertensão e estados de hipercoagulação (RADZIUK, 2014).

O controle glicêmico realizado pelas dosagens de glicose e hemoglobina glicada (HbA1c), em pacientes diabéticos pode ser complementado através do nível de RI usando o índice de HOMA (Modelo da avaliação da homeostase). Esse método possui fácil aplicação e baixo custo (MORAIS et al., 2016). Nesse contexto, com a multiplicação do número de pacientes com DM e a conseqüente evolução para as complicações, entre as quais, mudanças no estado homeostático da coagulação, o objetivo desse estudo é de determinar os níveis de

marcadores associados com a coagulação e ativação plaquetária em pacientes masculinos recentemente diagnosticados com DM tipo 2 e sua associação com os valores de HOMA.

1.1 DIABETES *MELLITUS*

O DM induz distúrbios metabólicos causados pela hiperglicemia (ADA, 2010). Para o desenvolvimento dessa doença, diversos mecanismos estão envolvidos, os quais são derivados de processos autoimunes que impedem a produção de insulina ou anormalidades que resultam na RI. Nos processos autoimunes ocorre a destruição de células β do pâncreas, células estas que são as maiores responsáveis pela secreção de insulina. Alterações nas células β como, disfunções na formação e secreção de insulina além de variações no tamanho, estão envolvidas no DM (ADA, 2002), bem como quantidades insuficientes ou dificuldade de reconhecimento da insulina pelo organismo (CRAIG; HATTERSLEY; DONAGHUE, 2009).

Existem vários tipos de DM, sendo os mais comuns o tipo 1 e o tipo 2. O Diabetes *Mellitus* Tipo 1 (DM1) ocorre devido a destruição de células pancreáticas β , fazendo com que o organismo seja incapaz de produzir insulina. A maior parte destes casos acontece entre 10 e 14 anos de idade (GROSS et al, 2002). A grande maioria dos pacientes que apresentam DM são portadores de Diabetes *Mellitus* Tipo 2 (DM2), sendo este distúrbio caracterizado por secreção normal ou elevada de insulina. Entretanto, a resistência à insulina não permite efeitos compensatórios com relação aos valores elevados de glicose presentes no sangue destes pacientes (IDF, 2015). O início ocorre ao redor dos 40 anos, porém a incidência maior é próxima aos 60 anos de idade (ADA, 2016).

A OMS (2016) alerta para as diversas complicações causadas pelo DM, sendo elas divididas em microvasculares e macrovasculares. Dentre as complicações microvasculares destacam-se retinopatias, nefropatias e neuropatias. Nas macrovasculares ocorrem doenças cardiovasculares como os doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica e problemas circulatórios. A inflamação crônica é a maior responsável pela resistência à insulina que acontece em pacientes obesos e com DM. O processo inflamatório está intimamente relacionado com mecanismos patofisiológicos no desenvolvimento desta doença, como glicotoxicidade, lipotoxicidade e estresse oxidativo (HERDER; CARSTENSEN; OUWENS, 2013).

Pacientes portadores de DM apresentam maior risco de eventos coronarianos trombóticos. Aproximadamente 80% dos óbitos nestes pacientes são devido a estes eventos,

originários da hiperativação plaquetária e de alterações nas propriedades de coagulação e formação de fibrina (GAJOS; PIŁACIŃSKI; ZOZULIŃSKA-ZIÓŁKIEWICZ, 2013).

1.2 DIAGNÓSTICO DO DM

O diagnóstico do DM, de acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA, 2016), é baseado nos seguintes critérios: glicemia após 8h de jejum superior a 126 mg/dL, teste de tolerância à glicose após sobrecarga com 75g de glicose com valor ≥ 200 mg/dL, ou ainda, que apresente resultado aleatório para glicose superior a 200 mg/dL com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crises hiperglicêmicas. A ADA (2016) sugere o uso da HbA1c $\geq 6,5\%$ como critério para o diabetes, entretanto, a Sociedade Brasileira de diabetes (2016) recomenda cautela no uso deste marcador pois estudos mostram variações nos níveis desse analito nas diferentes etnias e os estudos experimentais ou observacionais realizados apresentam menor consistência.

1.3 RESISTÊNCIA À INSULINA

Na RI é verificada a inibição dos efeitos da insulina nos tecidos envolvidos no metabolismo da glicose, como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. Ocorre interferência nas vias metabólicas de transporte de glicose, síntese de glicogênio e antilipólise. Estas alterações fisiológicas levam a várias desordens metabólicas como DM, hipertensão, dislipidemia, obesidade, anormalidades na coagulação sanguínea e na fibrinólise (TSO; HUANG, 2009; BODEN, 2011).

A insulina atua através de duas principais vias, fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), sendo estas responsáveis por seus efeitos metabólicos e hemodinâmicos. A PI3K estimula a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) a produzir óxido nítrico (NO) em células endoteliais através de sucessivas fosforilações (TOUSOULIS et al., 2013). Enquanto a MAPK está envolvida na regulação gênica, crescimento e diferenciação celular (CUSI et al., 2000; LANN; LeROITH, 2007).

A insulina em indivíduos saudáveis apresenta papel inibitório na agregação plaquetária, pois diminui a resposta à trombina, adenosina difosfato (ADP), ácido araquidônico e colágeno (KIM, J.; BAE; KIM, S, 2013). A ação da insulina em plaquetas de pacientes com DM é prejudicada, ocorrendo diminuição do número de receptores bem como menor afinidade destes pela insulina (SCHNEIDER, 2009).

Na RI a via dependente de MAPK permanece inalterada, entretanto, ocorrem alterações específicas na via PI3K inibindo a fosforilação do eNOS diminuindo a produção e biodisponibilidade do NO (ALEXANDRU et al., 2016). O NO tem por principal ação mediar a vasodilatação nos vasos sanguíneos (ASSMANN et al., 2016). Além disso, a RI, também incrementa a secreção do vasoconstritor endotelina-1 (XU; ZOU, 2009), do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), estimula a proliferação e migração de células musculares lisas vasculares (VSMC) e a expressão de moléculas de adesão (CERSOSIMO et al., 2014). O índice de HOMA é amplamente utilizado para caracterizar a RI, devido sua fácil aplicação, rapidez e baixo custo (VASQUES et al., 2008). Este índice é calculado através do produto entre a glicose (mmol/L) e insulina (μ UI/mL) dividindo-se por 22,5 (MATTHEWS et al., 1985). Os valores superiores a 2.5 são indicativos de resistência à insulina (DIMITROULAS et al., 2013).

1.4 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL, ARTEROSCLEROSE E DIABETES

O endotélio, em seu estado fisiológico saudável, não permite que células como leucócitos fiquem aderidas a parede dos vasos. Os estados iniciais de estímulos inflamatórios como os causados pelas citocinas inflamatórias como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon *gama* (INF γ) estimula o endotélio a expressar moléculas de adesão que regulam interações com leucócitos, monócitos e plaquetas, os quais agem na hemostasia sanguínea (HUANG, 2009). O DM, por ter implicações microvasculares, está relacionado como iniciador deste processo, uma vez que níveis altos de glicose são importantes formadores de espécies reativas de oxigênio (EROs) (AGUIAR; VILLELA; BOUSKELA, 2007). Quando as respostas normais do endotélio são afetadas, o endotélio deixa de servir a seus mecanismos fisiológicos e de proteção originando dessa forma a disfunção endotelial (GIMBRONE et al., 2000), resultando no desequilíbrio entre os fatores responsáveis pela vasoconstrição e vasodilatação (ALEXANDRU et al., 2016).

A disfunção endotelial é causada por diversos fatores e agentes patogênicos bem como sinais de dano celular. Dentre os fatores de risco para disfunção endotelial encontramos: lipoproteína de baixa densidade (LDL), LDL oxidado (oxLDL) e triglicérides elevados, lipoproteína de alta densidade (HDL) diminuída, hipertensão, hiperglicemia, hiperinsulinemia, fibrinogênio e PAI-1 elevados, tabagismo entre outros (SENA; PEREIRA; SEIÇA, 2014; SALVADOR et al., 2016).

Com o desenvolvimento do DM vários fatores patofisiológicos causam dano ao endotélio (SINGH et al., 2015). A hiperglicemia e RI estimula o estresse oxidativo devido ao

aumento da formação de EROs e por propiciar a presença de ácidos graxos livres implicando na elevação dos níveis de oxLDL (KING; GRANT, 2016). A glicose em excesso se liga a grupos amino de proteínas e fosfolipídios de forma não enzimática, gerando os produtos de glicação avançados (AGEs). Os AGEs são capazes de realizarem ligações cruzadas entre o colágeno e proteínas da matriz extracelular da parede vascular, levando ao acúmulo do LDL, deixando-o mais suscetível a oxidação. Também induz a redução da função de barreira, aumentando a permeabilidade vascular e de expressão de moléculas de adesão nas células vasculares (SABOOR et al., 2014).

A aterosclerose está associada com a ativação de células endoteliais, estresse oxidativo e acúmulo de leucócitos nas paredes dos vasos sendo conhecida por ser um processo inflamatório crônico (PEREIRA et al., 2013). Após a quimiotaxia dos monócitos, estes infiltram-se na parede dos vasos sanguíneos transformando-se em macrófagos. A presença do oxLDL em grande quantidade na parede vascular causa alterações nessas células gerando as células espumosas (*foam cells*), que secretam citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6) induzindo o espessamento da camada gordurosa, precursora da placa de ateroma (LEVI; POLL, 2010). Além disso, a ruptura da placa ateromatosa leva a exposição do fator tecidual subendotelial e do colágeno (ABBATE et al., 2012) que estimula a aderência de plaquetas e ativação local da coagulação e formação de rede de fibrina, além da formação de trombos que causam complicações agudas (GRANT, 2007).

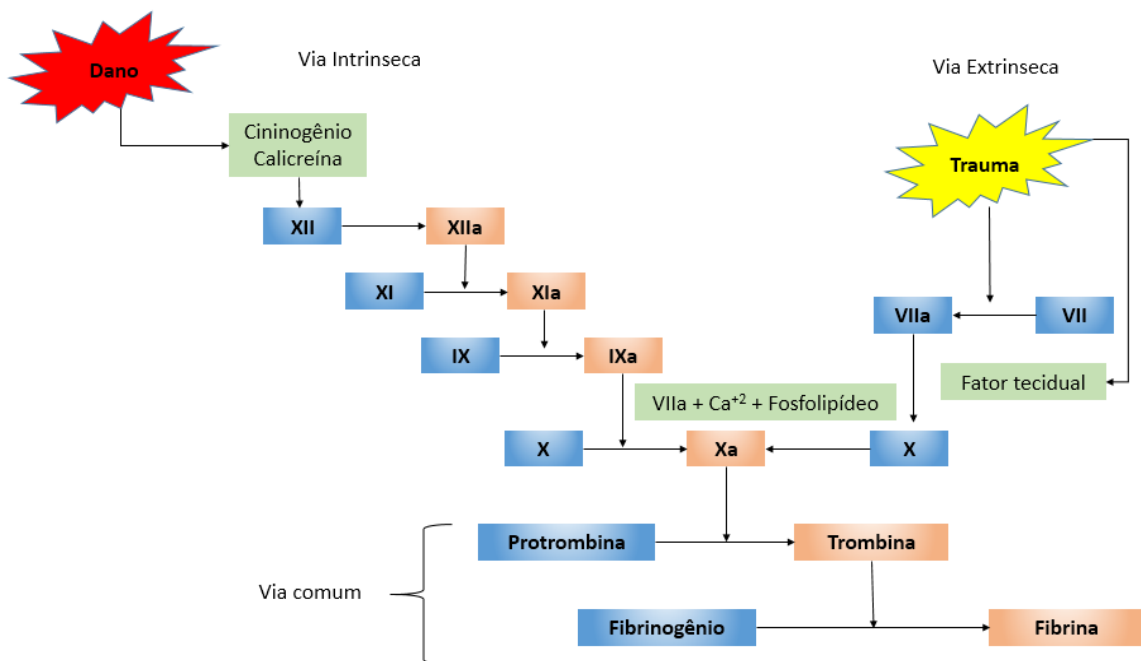
1.5 COAGULAÇÃO E DIABETES *MELLITUS*

O sistema homeostático engloba vários fatores, tendo componentes fluídos (sistema coagulativo e de fibrinólise), componentes celulares (plaquetas, células endoteliais, macrófagos) e o sistema de receptores e ligações proteicas responsáveis pela formação trombótica (ADAMS; BIRD, 2009). A coagulação é formada por várias proteínas coagulatórias que levam a geração de trombina. A trombina tem papel central na cascata de coagulação com vários efeitos que resultará na geração de coágulo de fibrina com ligações cruzadas, e a ativação de plaquetas (POSMA; POSTHUMA; SPRONK, 2016).

O modelo clássico da cascata de coagulação apresenta duas vias, a via intrínseca e a via extrínseca (Figura 1). A via intrínseca inicia através do contato com o colágeno encontrado abaixo do endotélio vascular, ativando o fator XII. Enquanto a via extrínseca inicia quando o vaso sofre algum trauma, liberando o fator tecidual (FT), e o complexo lipoproteico, que se combinam com o fator VII. Ambas as vias levam a ativação do fator X iniciando a via comum.

A via comum forma um complexo conhecido como ativador da protrombina, levando a protrombina a gerar trombina desenvolvendo o processo final da coagulação transformando o fibrinogênio em fibrina (OSORIO; QUENÁN; GÓMEZ, 2013). O processo de coagulação não deve ir além da região afetada, devendo ser limitado para evitar a oclusão do vaso. Essa necessidade é suprida através da ação de quatro anticoagulantes naturais, proteína C, proteína S, antitrombina e o inibidor da via do fator tecidual (FERREIRA et al., 2010).

Figura 1 – Cascata da coagulação



Fonte: adaptado de ADAMS; BIRD (2009)

A fase da finalização conhecida como fibrinólise é essencial para impedir a deposição de fibrina que é associada ao desenvolvimento de trombose. O plasminogênio sofre ação de ativadores como a uroquinase ativadora de plasminogênio (uPA) e do ativador tecidual de plasminogênio (tPA) para a formação da plasmina que são, por sua vez, regulados pela ação do PAI-1 (HOFFMAN; MONROE, 2007). A plasmina tem por função a clivagem da fibrina e formação de produtos de degradação da fibrina tais como o D-dímero (SOARES et al., 2010). Sendo conhecido como marcador de hipercoagulabilidade, fornecendo informações prognósticas em diversas patologias, como trombose venosa, coagulação intravascular disseminada, doenças cardiovasculares, doenças infecciosas e câncer (KESIEME et al., 2011; CHAROENSRI; PORNRATANARANGSI, 2011; CHOPRA et al., 2012). Níveis de D-

dímeros são capazes de refletir a severidade da aterosclerose, e sua concentração é dependente da quantidade de fibrina associada com o trombo aterosclerótico (PEREIRA et al., 2013).

O DM induz a glicação da hemoglobina, protrombina, fibrinogênio e outras proteínas envolvidas nos mecanismos de coagulação. Distúrbios circulatórios em diabéticos são caracterizados por coagulopatias, alterações fibrinolíticas e mudanças no metabolismo endotelial (SELVIN et al., 2010). A glicose através de seu efeito osmótico induz a agregação das plaquetas e degranulação, também estimulando a adesão destas ao endotélio (KEATING; SOBEL; SCHENEIDER, 2003).

A hiperglicemia, RI, disfunção endotelial e inflamação associadas com o DM levam a ativação da coagulação através do aumento dos fatores de coagulação como: fator tecidual, fator VII, VIII, trombina e fibrinogênio. Níveis elevados de fibrinogênio e trombina estão relacionados com alterações na estrutura do coágulo, resultando em uma rede de fibrina mais densa e resistente à fibrinólise. Mudanças similares também são observadas devido à glicação do fibrinogênio (KING; GRANT, 2016).

Pacientes diabéticos mostram alterações na estrutura da rede de fibrina, apresentando menor permeabilidade, sendo mais compacta, de aspecto mais grosseiro, mais enredada, além de mais resistente à fibrinólise com taxa de degradação mais lenta (PIETERS, et al. 2008; ALZHRANI; AJJAN, 2010). Espera-se que em estados de hipercoagulabilidade tenha-se um estado de hiperfibrinólise, para que a homeostase sanguínea seja mantida. No entanto, pacientes diabéticos apresentam degradação da fibrina diminuída, provavelmente devido à fibrina mais rígida originária da glicação do fibrinogênio (SOARES et al., 2010). Além disso, a hiperglicemia estimula a produção do PAI-1, que quando presente em grande quantidade nas plaquetas inibe a formação de plasmina (DU et al., 2000).

Assim sendo, as complicações circulatórias do DM causadas por interferências na homeostase sanguínea, somadas aos efeitos vasculares causadores da aterosclerose são as manifestações mais graves da doença e, em grande parte, são responsáveis pela diminuição da expectativa de vida nesses pacientes (PANENI; BECKMAN; CREAGER, 2013).

1.6 PLAQUETAS

As plaquetas são fragmentos anucleares pequenos (em torno de 3,5 micrometros) originárias de megacariócitos permanecendo na circulação em torno de 10 dias, reconhecendo locais que sofreram trauma tecidual ou dano vascular e iniciando a coagulação sanguínea (XU; SUN, 2015). Também apresentam funções secundárias, como manutenção do tônus vascular,

defesa do hospedeiro e participação em processos inflamatórios, recrutando leucócitos e células progenitoras para a região danificada (SMYTH et al., 2009). A rápida adesão e agregação das plaquetas nos locais de trauma vascular tem papel chave na manutenção da homeostase sanguínea (SENZEL; GNATENKO; BAHOU, 2009).

A estrutura interna da plaqueta é dividida em quatro zonas: periférica, sol-gel, organelas e membranas. A zona periférica é composta pela membrana externa, interna e sistema canalicular aberto, o qual é responsável por trocas moleculares com o meio externo. A zona membranas apresenta o sistema tubular denso onde existe maior concentração de cálcio, responsável pela manutenção de eventos contráteis e sistemas enzimáticos envolvidos na produção de prostaglandinas. A zona sol-gel é responsável pela estrutura e sustentação da plaqueta bem como permitir a mudança de forma durante a ativação plaquetária, possibilitando o prolongamento de pseudópodes, a contração interna e a liberação do conteúdo dos grânulos. A zona das organelas é composta por grânulos *alfa*, densos, mitocôndrias e lisossomos. Os grânulos *alfa* possuem moléculas responsáveis pela adesão, agregação e formação de coágulo como: fibrinogênio, CXCL4, fator V, vonWillebrand (vWF) entre outros. Os grânulos densos participam da ativação plaquetária (adenosina trifosfato (ATP), ADP, serotonina, cálcio) enquanto que os lisossomos contêm enzimas hidrolíticas responsáveis pela remodelação trombótica (CASTRO et al., 2006).

O DM interfere no comportamento das plaquetas, causando a hiperativação plaquetária, facilitando a resposta à pequenos estímulos e mostrando hipersensibilidade ao colágeno (FRANCHINI et al., 2008; HAOUARI; ROSADO, 2008). A formação de placas de ateroma é acelerada, pois há desbalanço entre os danos endoteliais e os mecanismos de reparação. A placa de ateroma tem presença de eritrócitos, fibras de fibrina e plaquetas sendo considerada mais vulnerável e susceptível a ruptura (ROOY; PRETORIUS, 2014). Diversas vias de sinalização e distúrbios metabólicos presentes no DM, estão envolvidos na adesão, ativação e agregação plaquetária, sendo a resistência a insulina, a hiperglicemia, a dislipidemia e o stress oxidativo os principais agentes ampliadores dessa condição (DEMIRTAS et al., 2015).

O DM causa diversos efeitos nas funções plaquetárias, promovendo a adesão primária e secundária, ativação e liberação do conteúdo dos grânulos (FATEH-MOGHADAM et al., 2005). A hiperglicemia estimula a glicação de proteínas, inclusive as da membrana das plaquetas. Essa alteração causada na estrutura da proteína leva a amplificação da expressão de P-selectina e receptores GPIIb/IIIa, o que torna as plaquetas mais suscetíveis a ativação (HESS, 2015), reduzindo a fluidez da membrana, e levando à incorporação de proteínas glicadas no trombo formado. A P-selectina, possui propriedades adesivas, mediando a ligação entre

plaquetas e endotélio, pois esta facilita a ligação com monócitos e neutrófilos e permite a formação de agregados heterofílicos. Dessa forma, mais agregados plaqueta-leucócitos nos vasos dos pacientes com DM são encontrados (KIM, J; BAE; KIM, S, 2013).

1.7 GRÂNULOS PLAQUETÁRIOS

As plaquetas liberam moléculas que ajudam na ativação endotelial, migração e proliferação das células musculares lisas. As plaquetas são ativadas por diversos estímulos como lesões a células endoteliais, ruptura de placas ateroscleróticas já formadas dentre outros (COOPER et al., 2014). Cada plaqueta apresenta entre 50 – 80 grânulos, que secretam mais de 300 mediadores que atuam em diversos processos como coagulação, inflamação e angiogênese (WINDELOV et al., 2015). Quando ativadas, os grânulos se movem para a membrana plasmática liberando o conteúdo granular, como β tg, CXCL4, ADP, ATP, dentre outros (XU; SUN, 2015).

1.7.1 β -Tromboglobulina

Algumas proteínas constituintes dos grânulos *alfa* como β tg e CXCL4 são consideradas específicas das plaquetas, uma vez que sua concentração é cerca de 20.000 vezes maior nas plaquetas que no plasma. Enquanto outras moléculas são produzidas em outros tipos celulares, não há indícios de qualquer outra célula ou fragmento celular que seja capaz de secretar quantidades consideráveis de β tg (BLUNK; SAUERSTEIN; SCHMELZ, 2011). Dessa forma a dosagem de β tg é usada para quantificar a ativação plaquetária (YASAR, et al., 2007).

A β tg é armazenada nos grânulos *alfa* e quando liberada apresenta papel inibidor na enzima prostaciclina sintase, levando a diminuição da síntese de prostaciclina I_2 (PGI₂) nas células endoteliais vasculares. A PGI₂ possui efeito inibitório na agregação plaquetária. Consequentemente, a β tg facilita a agregação plaquetária e acelera a trombose (ZHUANG et al., 2015). Além disso é responsável por ter efeitos quimiotáticos em leucócitos, propiciando o acúmulo e a ativação leucocitária nos locais de inflamação (IGNJATOVIC et al., 2012). Esse mediador mostrou ainda ter capacidade de quimioatração por fibroblastos e de estimular a mitogênese e síntese de matriz extracelular em culturas de fibroblastos humanos (RAVINDRAN; KRISHNAN, 2007). A β tg também está relacionado com a microangiopatia diabética, desordens isquêmicas e cerebrovasculares (ASAD; MUNIR; AFZAL, 2011).

1.7.2 Fator-4-plaquetário

O CXCL4 liberado pelas plaquetas após sua ativação possui importante papel na regulação de funções celulares, como trombose, modulação imune, angiogênese, aterosclerose, quimiotaxia, migração celular e em condições linfoproliferativas e inflamatórias (ZALDIVAR et al., 2010; WILSON et al., 2011; SANDSET, 2012).

O CXCL4 apresenta diversas funções dependendo do tipo celular que interaje, sugerindo que existam algumas variações do receptor responsável por suas ações (LI et al., 2015). Nos neutrófilos, esse mediador, induz efeito quimiotático, ativando essas células e causando a liberação de enzimas lisossomais como a mieloperoxidase, lisozima, beta-gucoronidase. Além disso, a aderência dos leucócitos às células endoteliais vasculares é mais firme, estimulando a resposta inflamatória local (KASPER et al., 2004).

Considerando sua capacidade de penetrar profundamente na camada de células musculares lisas vasculares (VSMC), o CXCL4, tem papel importante nas mudanças fenotípicas dessas células vasculares. Estas células contribuem substancialmente para o ambiente pró-inflamatório associado com a remodelação vascular após a lesão. As VSMCs, quando maduras são incapazes de se proliferar ou produzir mediadores inflamatórios, entretanto, em resposta a danos são capazes de alterar seu perfil genético para um estado mais imaturo (“desdiferenciado”) e podem apresentar fenótipos inflamatórios que possibilitam a proliferação e migração (SHI et al. 2013).

A presença de CXCL4 nas lesões ateroscleróticas está associada com parâmetros clínicos de evolução da lesão e presença de sintomas (AIDOUDI; BIKFALVI, 2010). O CXCL4 é quimiotático para fibroblastos e monócitos, induzindo a diferenciação de monócitos em macrófagos, estimulando a fagocitose, produção de EROs e prevenindo a apoptose (ERBEL et al., 2015a; YEO et al., 2016). Monócitos e macrófagos são importantes na geração de mediadores inflamatórios, também são responsáveis por muitas funções relacionadas a defesa do organismo, acumulando-se rapidamente nos locais de inflamação (KASPER et al., 2007).

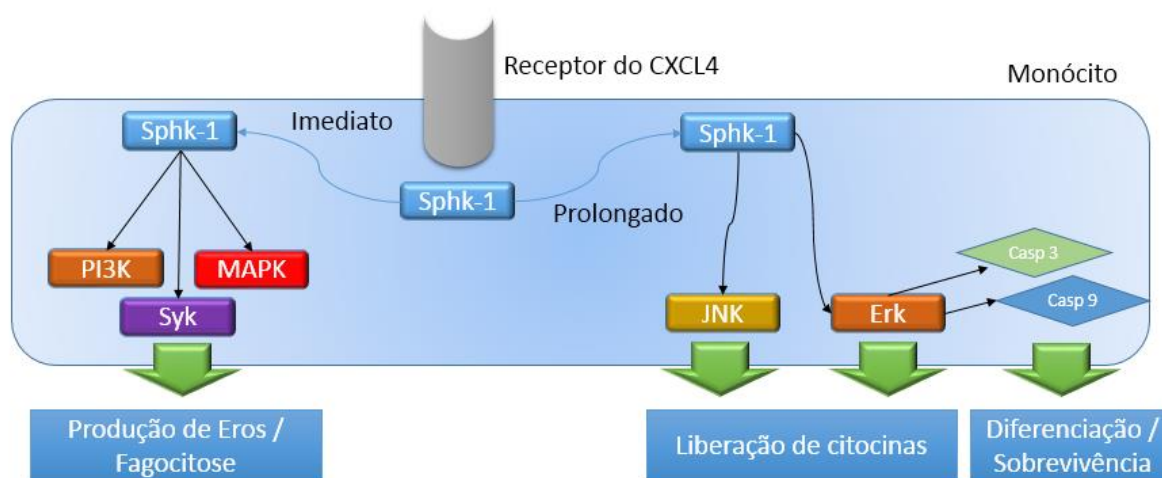
O recrutamento de monócitos para a parede endotelial é estimulado em conjunto com a quimiocina ligante 5 (CCL5) formando heterodímeros depositados na superfície das células endoteliais vasculares. Este complexo amplia a capacidade do CCL5 em se ligar com monócitos, bem como induz heterodimerização nos receptores de quimiocinas que modulam a sinalização intracelular (GLEISSNER; LEY, 2007; ERBEL et al., 2015a). A eliminação do CXCL4 reduziu o tamanho de lesão aterosclerótica, e já foi demonstrado em modelos animais

que a separação do complexo CCL5 / CXCL4 é capaz de reduzir a aterosclerose (KOENEN et al, 2009).

Nos monócitos o CXCL4 é capaz de induzir respostas a curto prazo como a formação de EROs, fagocitose e adesão, assim como respostas mais duradouras como a produção de citocinas, sobrevivência e diferenciação celular (KASPER; PETERSEN, 2011). A interação do CXCL4 com os monócitos resulta na translocação para membrana da esfingosina quinase (SphK1) e sua posterior ativação (Figura 2). Imediatamente a SphK1 induz a ativação da PI3K, da tirosina quinase esplênica (Syk) e p38 MAPK que iniciam a produção de EROs. Posteriormente a SphK1 controla a atividade da quinase regulada por sinal extracelular (Erk) e *c-Jun N-terminal kinase* (JNK). A Erk inibe as caspases 3 e 9 que são responsáveis por promover a apoptose. Enquanto a JNK é responsável pela transcrição de várias citocinas (KASPER; PETERSEN, 2011).

Foi demonstrado no estudo conduzido por Gleissner et al. (2010) que o CXCL4 é capaz de induzir um fenótipo de macrófago diferente dos originados pelo fator estimulador de colônias de macrófagos (MCSF) conhecidos como macrófagos M1 e M2. Esse macrófago possui aspecto fenotípico diferente não tendo a presença do receptor *scavenger* CD163 (ERBEL et al., 2015b). Foi mostrado que a presença desses macrófagos (chamados de M4) nas lesões ateroscleróticas está associado com a morfologia avançada da placa, indicando que o CXCL4 tem grande importância na aterogênese e propagação da aterosclerose (ERBEL et al., 2015a).

Figura 2 – Vias sinalizatórias CXCL4 em monócitos



Fonte: adaptado de KASPER; PETERSEN (2011)

CXCL4 – Fator-4-plaquetário; Sphk-1 – Esfingosina quinase-1; PI3K – Fosfatidilinositol-3-quinase; MAPK – Proteína quinase ativada por mitógenos; Syk - Tirosina quinase esplênica; JNK - *C-Jun N-terminal kinase*; Erk - Quinase regulada por sinal extracelular; Casp 3 - Caspase 3; Casp 9 - Caspase 9

O CXCL4 estimula o desenvolvimento da aterosclerose por promover a diferenciação de monócitos e posterior formação de *foam cells* (GLEISSNER; LEY, 2007). A eliminação do gene do CXCL4 em estudo com animais mostrou redução sensível na formação da lesão aterosclerótica (GLEISSNER et al., 2010). Liga-se ao receptor de LDL (LDL-R), inibindo a degradação deste receptor, também facilita a oxidação do LDL. Adicionalmente liga-se diretamente ao oxLDL e facilita a ligação deste com células vasculares e macrófagos, facilitando a esterificação do oxLDL nos macrófagos (GLEISSNER; LEY, 2007; GLEISSNER; HUNDELSHAUSEN; LEY, 2008).

1.8 TROMBOXANO A2 E TROMBOXANO B2

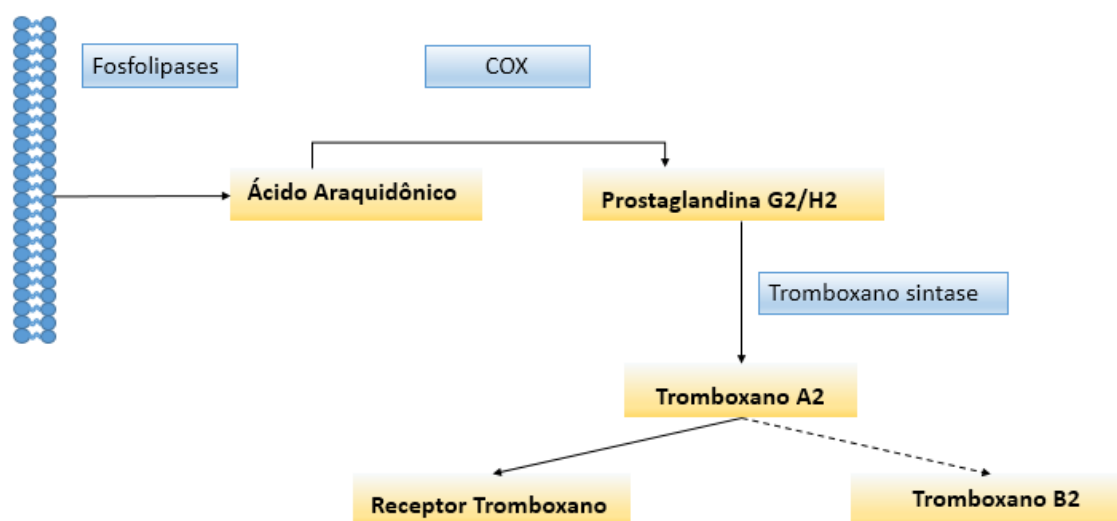
O tromboxano A2 (TxA2) possui efeitos vasoconstritores e induz a agregação plaquetária, tendo papel importante na homeostase vascular (SAADAWI et al., 2012; CATHCART et al., 2015). A produção de TxA2 pode ser estimulada pela ativação plaquetária e vasoconstrição (CHOU et al., 2014).

A ciclooxigenase-1 (COX-1) é a enzima responsável pela produção do TxA2. Em condições normais, após estímulo, o ácido araquidônico é liberado dos fosfolipídios de membrana devido o aumento intracelular de cálcio e a ação de fosfolipases. Quando liberado torna-se substrato para a COX-1 (Figura 3), que o converte em prostaglandina G2 (PGG2) a qual sofre ação de peroxidases originando a prostaglandina H2 (PGH2) e esta por fim é transformada em vários metabólitos incluindo o TxA2 (FONTANA et al., 2014).

Vários tipos celulares são capazes de gerar PGH2, entretanto seus metabólitos dependeram da presença de enzimas específicas. Nas plaquetas, a principal enzima que metaboliza a PGH2 é a tromboxano sintase, levando produção de TxA2 (FONTANA et al., 2014; LOPEZ et al., 2014).

A COX-1 é constantemente expressada em plaquetas, sendo considerada um dos maiores responsáveis pela produção de eicosanóides (SARASWATHI et al., 2013), entretanto em condições patológicas específicas, como em vias inflamatórias, o ácido araquidônico também é substrato da COX-2 que também irá gerar TxA2 através da mesma via semelhante a da COX-1 (LOPEZ et al., 2014).

Figura 3 – Síntese do tromboxano



Fonte: adaptado de FONTANA, P. et al (2014)
COX - Ciclooxigenase

O TxA2 contribui para a amplificação do processo inicial da ativação plaquetária, agregação e vasoconstrição, mediando seus efeitos através do receptor prostanóide de tromboxano (RTP), coordenando respostas fisiológicas e patológicas em diversos tipos celulares, como monócitos, macrófagos, células endoteliais, VSMC, células cardíacas, e plaquetas (MATSUMOTO et al., 2014).

Membro da superfamília de receptores acoplados a proteínas G, o RTP desenvolve várias vias sinalizatórias dependendo do tipo de proteína G que está acoplado, dessas proteínas podemos citar: Gq, G11, G12, G13, G15, G16, Gi, Gs, and Gh. Essas várias proteínas irão desencadear os diversos efeitos do RTP no citoesqueleto, adesão celular, motilidade, proliferação e sobrevivência celular (FONTANA et al., 2014).

Nas plaquetas a estimulação do RTP leva a estimulação da proteína Gq que ativa a fosfolipase C beta. Essa por sua vez promove o acúmulo de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) que induz a mobilização do cálcio intraplaquetário e formação de diacilglicerol (DAG) que ativará a proteína quinase C (PKC) facilitando a agregação e secreção plaquetária. Por outro lado, a estimulação da proteína G13 e G12 produzem alterações na estrutura plaquetária devido a ativação da via Rho-Rho kinase e subsequente fosforilação da cadeia leve de miosina (CAPRA et al. 2014). Moers et al (2004) mostrou em seu estudo que a deleção das proteínas Gq e G13 torna as plaquetas irresponsíveis ao TxA2.

Apesar da importância clínica do TxA2 atuando com características autocrinas e parácrinas nas células vizinhas apresenta tempo de meia vida curto, em torno de 30s, o que faz

com que sua quantificação direta seja dificultada devido a sua grande instabilidade. Por outro lado, é rapidamente hidrolisado de maneira não enzimática no metabólito inativo TxB2 que é mais estável, este por sua vez é metabolizado no fígado e eliminado na urina na forma de 2,3-dinor-TxB2 e 11-desidro-TxB2 (FONTANA et al., 2014; LOPEZ et al., 2014).

A determinação no soro do TxB2 quando acompanhada da determinação de características da coagulação sanguínea mostrou-se adequada para avaliação da atividade da COX-1 tanto em humanos quanto em outras espécies (SAADAWI et al., 2012). Sendo também usada para avaliação do efeito farmacológico de alguns medicamentos inibidores da COX-1 (SQUELLERIO et al., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a relação entre marcadores envolvidos nos processos de coagulação, fibrinólise e ativação plaquetária com o índice de HOMA em pacientes DM tipo 2 recentemente diagnosticados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os níveis de marcadores de coagulação e fibrinólise como Fibrinogênio e D-dímeros;
- Avaliar os níveis de marcadores de ativação plaquetária como tromboxano B₂, β -tromboglobulina e Fator-4-plaquetário nos pacientes DM tipo 2 recentemente diagnosticados;
- Verificar o estado de resistência a insulina dos pacientes com diabetes tipo 2 recentemente diagnosticados
- Estratificar os pacientes em quartis de acordo com o índice de HOMA, buscando estabelecer associação com os marcadores da coagulação e da ativação plaquetária.

3 MANUSCRITO

Increased platelet reactivity is associated with insulin resistance in recently diagnosed type 2 DM patients

Silvino Sasso-Robalo^{1*}, José A. Mainardi de Carvalho^{2,3}, Thiago Duarte⁴, Marta M. Medeiros Frescura Duarte^{4,5}, José E. Paz da Silva^{1,6*}

1-Pharmaceutical Sciences Postgraduate Program, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

2-Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

3-University Hospital, Santa Maria, RS, Brazil

4-Pharmacology Postgraduate Program, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

5-Department of Health Sciences, Lutheran University of Brazil, Santa Maria-RS, Brazil

6- Department of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

*Corresponding authors at: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/CCS/UFSM, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Prédio 26 – Sala 1357, Tel.: +55 55 32208940. E-mail addresses: silvinosr@hotmail.com (S. S. Robalo), jepazdasilva@gmail.com (J. E. P da Silva).

Abstract

Background: The number of patients with diabetes mellitus (DM) has grown. In this context, there is an increase of chronic complications of diabetes, such as a change in the hemostatic state of coagulation. This work aim to evaluate the coagulation status – by determining the concentrations of fibrinogen, D-dimer, and platelet activation through the assessment of the concentration of Tromboxane B2 (TxB2), β -thromboglobulin (β tg) and Platelet-4-factor (CXCL4) – and the association with Homeostasis Model Assessment Index (HOMA) values in recently diagnosed and untreated type 2 DM (DM2) patients.

Methods: Thirty-eight recently diagnosed and untreated DM2 patients and 38 healthy controls were stratified by quartiles of the HOMA-index in HOMA-1 (0.89 to 1.77), HOMA-2 (1.77 to 5.26), HOMA-3 (5.26 to 11.32) and HOMA-4 (11.32 to 18.56) groups. Levels of fibrinogen and D-dimer were assessed using the immunoturbidimetric method, while TxB2, β tg and CXCL4 were assessed using standard commercial ELISAs according to the manufacturers' recommended protocols.

Results: HOMA was positively correlated with TxB2 ($r = 0.75$, $p < 0.001$), β tg ($r = 0.75$, $p < 0.001$), CXCL4 ($r = 0.68$, $p < 0.001$), fibrinogen ($r = 0.54$, $p < 0.001$) and D-dimer ($r = 0.52$, $p < 0.001$). Newly diagnosed patients with diabetes show insulin resistance and related markers changes involved in blood homeostasis process and the release of platelet granule components capable of stimulating cell response which can cause atherosclerosis.

Conclusions: High levels of HOMA can serve as an alert for possible future complications in recently diagnosed diabetic patients. We find that the recently diagnosed diabetic presents evidence that leads us to suppose that the process of atherosclerosis may already be starting. This may lead to the development of complications that will affect the quality of life of these patients.

Keywords: recently diabetic. insulin resistance. HOMA index. coagulation. platelet granule. atherosclerosis.

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease and a growing epidemic that has become a concern for global public health [1]. Approximately 415 million people worldwide have DM, and this number will increase to 642 million adults in 2040 [2]. Diabetes has many complications [3] that can be divided into microvascular (retinopathy, nephropathy, neuropathy) and macrovascular, among which stand out heart attacks and circulatory changes in coagulation. Furthermore, hyperglycemia promotes glycation of several proteins involved in the coagulation mechanisms, resulting in disorders of platelet function, modifications in endothelial metabolism, changes in leukocyte migration stages [4, 5], resistance to increased degradation fibrin [6] and decreases the ability of the fibrinolytic system [7].

In patients with DM, circulatory disorders may occur since there is an increased probability of thrombosis due to hyper-reactivity of platelets. Concomitantly, there are increases in the adhesion, activation and aggregation of platelets, resulting in the release of the contents of the alpha granules, including β -Thromboglobulin (β tg), platelet factor 4 (CXCL4) and thromboxane B2 (TxB2) [8–10]. In this context, there is also increased activation of prothrombotic coagulation factors with decreased fibrinolysis [11]. The risk of developing peripheral, coronary or cerebrovascular diseases is increased four times in diabetic patients, and these diseases are the leading cause of death in these patients [12].

In many countries, the increasing incidence of insulin resistance (IR), defined as the inefficiency of plasma insulin in promoting adequate glucose homeostasis, has been observed [13]. Furthermore, IR has been shown to be a predictor of DM, endothelial dysfunction and atherosclerosis, and the relationship between IR and endothelial dysfunction is also an indicator of the development of cardiovascular disease [13, 14].

The glycemic control in diabetic patients can be performed by measuring glucose and glycated hemoglobin (HbA1c), as well as assessing the level of IR using the Homeostasis Model Assessment Index (HOMA) as a method that is easy to apply, fast and low-cost [15].

Since there is an increase in complications associated with DM, among which we can highlight modifications in the homeostasis, the aim of this study was to determine the levels of markers associated with clotting in male patients with recently diagnosed type 2 diabetes (DM2) and seek an association with HOMA values.

Materials and Methods

Study population

The study population comprised 76 men (38 DM type 2 patients and 38 healthy controls), recruited between November 2015 and January 2016, in the Labimed, clinical laboratory, located in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. DM2 patients included in the study were recruited at the first medical appointment. The samples were collected after confirmation of DM2 diagnosis, according to the criteria of the American Diabetes Association [16], and before the patients started the use of hypoglycemic drugs.

Patients were stratified by quartiles of HOMA, being divided into the following groups: HOMA-1 (0.89 to 1.77), HOMA-2 (1.77 to 5.26), HOMA-3 (5.26 to 11.32), and HOMA-4 (11.32 to 18.56).

Exclusion criteria were: aged < 18 years old, previous coronary disease, stroke, malignant disease, morbid obesity, metabolic syndrome and smokers, as well the use of anti-inflammatory, hypoglycemic or hypolipemic treatments, and carriers of other chronic diseases or dysfunctions that could influence the data obtained.

The Institutional Ethics Committee approved this study (number 49617115.2.0000.5346) and a written informed consent was obtained from all participants prior to inclusion in the study.

Laboratory analysis

Blood samples were collected from all participants after an overnight fast by venous puncture technique into Vacutainer® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with sodium fluoride plus EDTA, citrate, EDTA or no anticoagulants. The samples were routinely centrifuged at 2500g for 15 min.

Plasma was used to measure the glucose concentration and serum to determine total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and triglyceride concentrations. All determinations were measured by standard enzymatic methods on the fully automated analyzer (Ortho *VITROS 5.1 FS*, dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was estimated using the Friedewald et al. equation [17].

Serum insulin was measured by two-site sandwich immunoassay using direct chemiluminescent technology (ADVIA Centaur® XP, Siemens Healthcare Diagnostics, New

York, USA) and the HbA1c was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) on an automated analyzer (D-10 analyzer, Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

Serum TxB2 (Oxford Biomedical Research, Inc. Oxford, USA), CXCL4 (R&D Systems, Inc, McKinley Place, Minneapolis, USA) and β tg (MyBioSource, San Diego, CA, USA) were assessed by use of standard commercial ELISAs according to the manufacturers' recommended protocols (TxB2 intra-assay CV and inter-assay CV were < 8%; CXCL4 intra-assay CV 11.8%, inter-assay CV 6.9%; β tg intra-assay CV < 10%, inter-assay CV <8%).

D-dimer and fibrinogen concentration were determined in citrated plasma using the immunoturbidimetric method on Cobas INTEGRA 400® (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Hemoglobin (Hb) and platelets (Plt) were determined in whole blood by an autoanalyzer XE-2100 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

Clinical measurement

Body mass index (BMI) was calculated by dividing the weight (kg) by height² (m). Insulin resistance was evaluated by the HOMA: (fasting insulin (μ U/mL) \times fasting plasma glucose (mmol/L))/22.5 [18].

Statistical analysis

Distributions of continuous variables were examined for skewness and kurtosis by the Kolmogorov-Smirnov normality test. Data was presented as mean \pm standard deviation (SD) for parametric variables, median and interquartile range (IQR) for nonparametric variables. Comparisons between two groups were performed with Student's t test for parametric values and Mann-Whitney to nonparametric variables. Statistical differences between quartiles was performed using the Kruskal-Wallis test. Spearman's correlation coefficient was calculated between HOMA, TxB2, β tg, CXCL4, fibrinogen and D-dimer. Statistical significance was assumed at p <0.05. Data were analyzed using GraphPad Prism® version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

The baseline characteristics of all participants in the study are provided in Table 1. No significant differences in BMI, systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP), platelet and hemoglobin were found when groups were compared. Significant

differences in the values of fasting plasma glucose, fasting plasma insulin, HbA1c, total cholesterol, LDL-C and triglyceride levels were found between groups, these being higher in DM patients than in healthy controls ($p < 0.001$). HDL-C was shown to be decreased in diabetic patients compared with the control group ($p < 0.001$).

An overview of the coagulation parameters observed in the study population is shown in Table 2. The study patients were classified into four groups according to the HOMA index to investigate the plasma levels of fibrinogen, CXCL4, TxB2, β tg, D-dimer and platelet in patients with DM2. This classification was adapted to check whether there are significant changes in these biomarkers, as shown in Table 3. When the association between coagulation markers and HOMA was analyzed, it was observed that HOMA was positively correlated with TxB2 ($r = 0.75$, $p < 0.001$), β tg ($r = 0.75$, $p < 0.001$), CXCL4 ($r = 0.68$, $p < 0.001$), fibrinogen ($r = 0.54$, $p < 0.001$) and D-dimer ($r = 0.52$, $p < 0.001$).

Discussion

In this study DM2 patients with higher HOMA values, presented an increased coagulation and platelet activation profile when compared to the control group. Results obtained for the coagulation markers (D-dimer, fibrinogen) showed higher levels of these analytes in patients with DM2, which corroborates previous studies carried out in populations of patients with DM2. Bembde et al. [19] showed that diabetic patients had higher levels of fibrinogen, having greater cardiovascular risk than patients without DM. Hong Li-Feng et al. [20] also suggest that elevated fibrinogen levels are indicative of the severity of coronary artery disease in these patients. In addition, Alzahrani et al. [21] noted that clots in DM patients have a more compact structure with lower pore size, thereby increasing the strength of the formed network. The formation of thicker structures increases resistance to lysis, and this contributes to the increase in thrombotic burden in diabetic patients [22]. The increased levels of D-dimer, which are related to atherothrombotic conditions and can lead to heart disease and infarction, are an important marker of thrombosis and venous thromboembolism [23]. Furthermore, increased levels of D-dimer are an important plaque rupture indicator [24]. Levels of D-dimer indicate a large formation of fibrin due to the hypercoagulable state. The use of D-dimer ends up serving as a tool for the determination of subclinical cardiovascular complications in diabetic patients [25, 26].

Platelets exhibit alpha granules that store molecules that act on coagulation, inflammation, angiogenesis and on platelet activation, such as β tg, TxA₂, and CXCL4 [27]. β tg and CXCL4 are considered markers of platelet activation [28, 29]. TxA₂ acts on the responses of platelets, macrophages and smooth muscle cells, among others [30]. Several studies show changes in the platelet activation and levels of these markers in diabetic patients [31–33].

In a recent study, Lopez-Villodres et al. [34] showed that there is an increase in platelet activity caused by an increase in aggregation and TxB₂ production in diabetic rats. Asad et al. [35] showed in diabetic rats the presence of a significant elevation of β tg when compared to controls. Platelet activation (β tg, TxB₂ and CXCL4), was also elevated in diabetic patients in our study.

β tg is known to reduce the production of prostacyclin that have inhibitory effects on platelet aggregation, thus accelerating thrombosis [35]. TxB₂ is a biologically inactive metabolite that can be used to indirectly quantitate levels of Thromboxane A₂ (TxA₂) [36]. TxA₂ derived from the conversion of arachidonic acid through the action of COX-1 amplifies the response of platelet aggregation and granular release reaction [37]. CXCL4 interacts with endothelial and immune cells promoting greater location of platelets and the release of inflammatory molecules, increasing vascular inflammation [38], as well as induces the differentiation of monocytes into macrophages [19, 39] and limits apoptosis thereof [40, 41]. CXCL4 prevents LDL-C from binding to its receptor, facilitates the formation of oxidized LDL (oxLDL) and stimulates macrophages binding to oxLDL, accelerating the formation of foam cells involved in atherosclerosis [42–44].

The HOMA index was proposed by Matthews et al. [18]. It is a simple but particularly robust tool for monitoring insulin resistance. Due to the simplicity of its determination, it is widely used in clinical practice and in epidemiological studies including patients with glucose intolerance, diabetes and other metabolic disorders [45, 46].

The patients in this study were classified in quartiles according to the HOMA index. A positive association between HOMA values and coagulation markers (fibrinogen, D-dimer) and evaluated platelet activation (β tg, TxB₂ and CXCL4) were checked. By stratifying patients into quartiles of HOMA, it was found that the quartiles with the highest HOMA had higher levels of these markers. It is known that IR is also reflected in platelets promoting platelet activation [47, 48]. This activation includes an increase in primary and secondary aggregation and a release of the contents of the granules- α , and increased expression in activating surface

platelet glycoproteins [49]. These alterations are being related to the development of vascular complications [50], which may increase the predisposition to atherosclerosis [49, 51].

To our knowledge, this is the first study to link the HOMA values categorized into quartiles with coagulation and platelet activation markers in recently diagnosed diabetic patients. The newly diabetic patients in this study show the presence of IR and high levels of markers related with changes involved in the blood homeostasis process, from the initial phase (platelet activation) [52] until the final stage of the coagulation cascade (formation of clot), as well as in the fibrinolysis process [53]. The study also shows that increased HOMA values are related to the release of platelet granule components capable of stimulating a cell response, which might cause vascular alterations [54–56].

This study has some limitations, such as the small number of subjects studied, the absence of female individuals.

In conclusion, a high score of HOMA values serves as an alert for possible future complications in recently diagnosed diabetic patients. Although atherosclerosis is a silent disease that often takes years to appear [57, 58], we find that the recently diagnosed diabetic presents evidence that leads us to suppose that the process of atherosclerosis may already be starting. And this may lead to the development of complications that will affect the quality of life of these patients. Further studies are needed on the subject seeking a possible cutoff point indicator of the imminent risk of developing atherosclerosis according to the IR state, and evaluating the time required for substantial damage to be observed, which can be used in new strategies to combat vascular complications afflicting patients with diabetes.

Acknowledgments

The authors are grateful to Laborsys Roche (Porto Alegre, RS, Brazil) and Siemens (Porto Alegre, RS, Brazil) for providing biochemical reagents. The authors wish to thank the team of the Labimed Análises Clínicas of Santa Maria for the support provided.

References

1. Huri HZ, Ling DYH, Wan Ahmad WA. Association between glycemic control and antidiabetic drugs in type 2 diabetes mellitus patients with cardiovascular complications. *Drug Des Devel Ther* 2015;9:4735–4749 (PMC: 4547657)
2. IDF International Diabetes Federation. *IDF DIABETES ATLAS*. International Diabetes Federation 2015;7:1-144 <http://www.diabetesatlas.org/>
3. Diabetes Programie. http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/en/index3.html.
4. Ouviña SM, La Greca RD, Zanaro NL, Palmer L, Sasseti B. Endothelial dysfunction, nitric oxide and platelet activation in hypertensive and diabetic type II patients. *Thromb Res* 2001;102:107–114 (PMID: 11323020)
5. Carrizo TR, Prado MM, Velarde MS, Diaz EI, Bazan MC AA. E-selectina soluble en una poblacion infanto-juvenil con diabetes tipo 1. *Med (Buenos Aires)* 2008;68:193–197 <http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v68n3/v68n3a01.pdf>
6. Soares AL, Sousa MDO, Fernandes APSM, Carvalho MDG. Alterações do sistema hemostático nos pacientes com diabetes melito tipo 2. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2010;32:482–488 http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842010000600013&lng=en&nrm=iso&tlng=en
7. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12222–6 (PMID: 11050244)
8. Kasperska-zajac A, Rogala B, Assessment NM. Assessment of platelet activity as expressed by plasma levels of platelet factor 4 and b -thromboglobulin in patients with chronic idiopathic urticaria. 2005;515–518 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0906-6705.2005.00311.x/full>
9. Kim JH, Bae HY, Kim SY. Clinical marker of platelet hyperreactivity in diabetes mellitus. *Diabetes Metab J* 2013;37:423–428 (PMC: 3881326)
10. Alexandru N, Badila E, Weiss E, Cochior D, Stepien E, Georgescu A. Vascular complications in diabetes: Microparticles and microparticle associated microRNAs as active players. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;472:1–10 (PMID: 26891868)
11. Alzahrani S, Ajjan R. Coagulation and fibrinolysis in diabetes. *Diabetes Vasc Dis Res* 2010;7:260–273 (PMID: 20847109)
12. Duarte RC, Goncalves LH, Campos FM, et al. Effect of acetylsalicylic acid on platelet activation and oxidative profile in a set of Brazilian patients with type 2 diabetes mellitus. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2015;26:123–130 (PMID: 25325344)

13. Vasques A, Rosado L, Alfenas R, Geloneze B. Análise Crítica do Uso dos Índices do Homeostasis Model Assessment (HOMA) na Avaliação da Resistência à Insulina e Capacidade Funcional das Células- β Pancreáticas. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2008;52:32–39 http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302008000100006
14. Anan F, Masaki T, Umeno Y, et al. Correlations between homocysteine levels and atherosclerosis in Japanese type 2 diabetic patients. *Metab Clin Exp* 2007;56:1390–1395 (PMID: 17884450)
15. Morais PRS de, Sousa ALL, Jardim T de SV, et al. Correlation of Insulin Resistance with Anthropometric Measures and Blood Pressure in Adolescents. *Arq Bras Cardiol* 2016;106:319–26 http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2016000400319
16. ADA American Diabetes Association. STANDARDS OF MEDICAL CARE IN DIABETES - 2016. *Diabetes Care* 2016;39:S1–S112 http://care.diabetesjournals.org/content/suppl/2015/12/21/39.Supplement_1.DC2
17. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502 (PMID: 4337382)
18. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412–419 (PMID: 3899825)
19. Bembde AS. A study of plasma fibrinogen level in type-2 diabetes mellitus and its relation to glycemic control. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2012;28:105–108 (PMC:3332265)
20. Hong L-F, Li X-L, Luo S-H, et al. Association of fibrinogen with severity of stable coronary artery disease in patients with type 2 diabetic mellitus. *Dis Markers* 2014;2014:485687 <https://www.hindawi.com/journals/dm/2014/485687/>
21. Alzahrani SH, Ajjan RA. Coagulation and fibrinolysis in diabetes. *Diabetes Vasc Dis Res* 2010;7:260–73 (PMID: 20847109)
22. Ariëns RAS. Fibrin(ogen) and thrombotic disease. *J Thromb Haemost* 2013;11:294–305 (PMID: 23809133)
23. Folsom AR, Alonso A, George KM, Roetker NS, Tang W, Cushman M. Prospective study of plasma D-dimer and incident venous thromboembolism: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Thromb Res* 2015;136:781–785 (PMID: 26337932)
24. Corban MT, Hung OY, Mekonnen G, et al. Elevated Levels of Serum Fibrin and Fibrinogen Degradation Products Are Independent Predictors of Larger Coronary Plaques and Greater Plaque Necrotic Core. *Circ J* 2016;80:931–937 (PMID: 26911453)
25. Soares AL, Rosario PW, Borges MAR, Sousa MO, Fernandes APS, Carvalho MGM. PAI-1 and D-dimer in type 2 diabetic women with asymptomatic macrovascular disease

assessed by carotid Doppler. *Clin Appl Thromb Hemost* 2010;16:204–208
<http://cat.sagepub.com/content/16/2/204.abstract>

26. Nwose EU, Jelinek HF, Richards RS, Tinley P, Kerr PG. Atherothrombosis and oxidative stress: the connection and correlation in diabetes. *Redox Rep* 2009;14:55–60 (PMID: 19389272)
27. Windeløv NA, Ostrowski SR, Johansson PI, et al. Circulating levels of platelet α -granule cytokines in trauma patients. *Inflamm Res* 2015;64:235–241 (PMID: 25697747)
28. Zyl LT, Lespérance F, Frasure-Smith N, et al. Platelet and endothelial activity in comorbid major depression and coronary artery disease patients treated with citalopram: The Canadian Cardiac Randomized Evaluation of Antidepressant and Psychotherapy Efficacy Trial (CREATE) biomarker sub-study. *J Thromb Thrombolysis* 2009;27:48–56 (PMID: 18188512)
29. Aidoudi S, Bujakowska K, Kieffer N, Bikfalvi A. The CXC-chemokine CXCL4 interacts with integrins implicated in angiogenesis. *PLoS One* 2008;3 (PMID: 18648521)
30. Capra V, Bäck M, Angiolillo DJ, Cattaneo M, Sakariassen KS. Impact of vascular thromboxane prostanoid receptor activation on hemostasis, thrombosis, oxidative stress, and inflammation. *J Thromb Haemost* 2014;12:126–137 (PMID: 24298905)
31. Tang WH, Stitham J, Gleim S, et al. Glucose and collagen regulate human platelet activity through aldose reductase induction of thromboxane. *J Clin Invest* 2011;121:4462–4476 (PMID: 22005299)
32. Schäfer A, Bauersachs J. Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 2008;6:52–60 (PMID: 18220940)
33. Ferroni P, Basili S, Falco a, Davì G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost* 2004;2:1282–1291 (PMID: 15304032)
34. Lopez-Villodres JA, Abdel-karim M, Rodr D, Rodriguez-gutierrez G, Fern J. Effects of hydroxytyrosol on cardiovascular biomarkers in experimental diabetes mellitus. - PubMed - NCBI. *J Nutr Biochem* (in press) 2016 (PMID: 27648880)
35. Asad M, Munir TA, Afzal N. Acacia nilotica leave extract and glyburide: comparison of fasting blood glucose, serum insulin, beta-thromboglobulin levels and platelet aggregation in streptozotocin induced diabetic rats. *J Pak Med Assoc* 2011;61:247–51 (PMID: 21465938)
36. Lopez LR, Guyer KE, Torre IG, Pitts KR, Matsuura E, Ames PR. Platelet thromboxane (11-dehydro-thromboxane B2) and aspirin response in patients with diabetes and coronary artery disease. *World J Diabetes* 2014;5:115–27 (PMC:3990310)
37. Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C, et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for simultaneous measurement of thromboxane B2 and 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid in serum. *J Pharm Biomed Anal* 2014;69:1366–1372
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708514001861>

38. Wilson NO, Jain V, Roberts CE, et al. CXCL4 and CXCL10 predict risk of fatal cerebral malaria. *Dis Markers* 2011;30:39–49 (PMID: 21508508)
39. Schwartzkopff F, Grimm T a, Lankford CSR, et al. Platelet factor 4 (CXCL4) facilitates human macrophage infection with HIV-1 and potentiates virus replication. *Innate Immun* 2009;15:368–79 (PMID: 19773294)
40. Scheuerer B, Ernst M, Dürrbaum-Landmann I, et al. The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood* 2000;95:1158–1166 (PMID: 10666185)
41. Hartwig H, Drechsler M, Lievens D, et al. Platelet-derived PF4 reduces neutrophil apoptosis following arterial occlusion. *Thromb Haemost* 2013;111:562–564 (PMID: 24258616)
42. Nassar T, Sachais BS, Akkawi S, et al. Platelet factor 4 enhances the binding of oxidized low-density lipoprotein to vascular wall cells. *J Biol Chem* 2003;278:6187–6193 (PMID: 12466273)
43. Aidoudi-Ahmed S, Bikfalvi A. Interaction of PF4 (CXCL4) with the vasculature: A role in atherosclerosis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 2010;104:941–948 (PMID: 20806113)
44. Erbel C, Wolf A, Lasitschka F, et al. Prevalence of M4 macrophages within human coronary atherosclerotic plaques is associated with features of plaque instability. *Int J Cardiol* 2015;186:219–225 (PMID: 25828120)
45. Salgado ALFDA, Carvalho L, Oliveira AC, Dos Santos VN, Vieira JG, Parise ER. Insulin resistance index (HOMA-IR) in the differentiation of patients with non-alcoholic fatty liver disease and healthy individuals. *Arq Gastroenterol* 2010;47:165–169 (PMID: 20721461)
46. Tang Q, Li X, Song P, Xu L. Optimal cut-off values for the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and pre-diabetes screening: Developments in research and prospects for the future. *Drug Discov Ther* 2015;9:380–385 (PMID: 26781921)
47. Dunn EJ, Grant PJ. Type 2 diabetes: an atherothrombotic syndrome. *Curr Mol Med* 2005;5:323–32 (PMID: 15892651)
48. Grant PJ. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J. Intern. Med.* 2007. pp 157–172 (PMID: 17645584)
49. Fateh-Moghadam S, Li Z, Ersel S, et al. Platelet degranulation is associated with progression of intima-media thickness of the common carotid artery in patients with diabetes mellitus type 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1299–1303 (PMID: 15817881)
50. Demirtunc R, Duman D, Basar M, Bilgi M, Teomete M, Garip T. The relationship between glycemic control and platelet activity in type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2009;23:89–94 (PMID: 18358749)

51. Gresele P, Marzotti S, Guglielmini G, et al. Hyperglycemia-Induced Platelet Activation in Type 2 Diabetes Is Resistant to Aspirin but Not to a Nitric Oxide–Donating Agent. *Diabetes Care* 2010;33:1262–1268 (PMID: 20299485)
52. Huo Y, Schober A, Forlow SB, et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med* 2003;9:61–67 (PMID: 12483207)
53. Bochenek M, Zalewski J, Sadowski J, Undas A. Type 2 diabetes as a modifier of fibrin clot properties in patients with coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis* 2013;35:264–270 (PMID: 23086579)
54. Shi G, Field DJ, Long X, et al. Platelet factor 4 mediates vascular smooth muscle cell injury responses. *Blood* 2013;121:4417–4427 (PMID: 23568488)
55. Okon EB, Colbabaie A, Van Breemen C. Paracrine effects of endothelial cells in a diabetic mouse model: Capacitative calcium entry stimulated thromboxane release. *Horm Metab Res* 2008;40:645–650 (PMID: 18792877)
56. Zhuang P, Wo D, Xu ZG, Wei W, Mao HM. Dynamic changes in plasma tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1 and beta-thromboglobulin content in ischemic stroke. *J Clin Neurosci* 2015;22:1123–1127 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0967586815000764>
57. Raggi P, Baldassarre D, Day S, de Groot E, Fayad Z. Non-invasive imaging of atherosclerosis regression with magnetic resonance to guide drug development. *Atherosclerosis* (in press) 2016;1–7 (PMID: 27341753)
58. Selwaness M, Bos D, van den Bouwhuijsen Q, et al. Carotid Atherosclerotic Plaque Characteristics on Magnetic Resonance Imaging Relate With History of Stroke and Coronary Heart Disease. *Stroke* (in press) 2016;47:1542–1547 (PMID: 27165952)

Table 1. Clinical and biochemical characteristics of the participants

	Control (n=38)	DM (n=38)	p
Age (years)	49.5 ± 12.2	48.3 ± 12.3	0.641
BMI (kg/m²)	25.0 (22.0 - 30.3)	25.5 (22.5 - 29.7)	0.751
SBP (mmHg)	139.0 (137.0 - 140.0)	140.0 (137.0 - 142.0)	0.240
DBP (mmHg)	80.0 (78.0 - 80.2)	80.0 (79.0 - 82.0)	0.098
HbA1c (%)	4.5 (4.1 - 5.0)	10.0 (9.6 - 10.7)	<0.001
HbA1c (mmol/mol)	25.7 (21.3 - 32.2)	85.7 (81.4 - 93.4)	<0.001
FPG (mmol/L)	4.4 (4.2 - 4.8)	11.5 (10.5 - 13.5)	<0.001
Fasting insulin (µUI/mL)	9.6 (6.7 - 11.7)	20.9 (19.4 - 22.9)	<0.001
HOMA	1.8 (1.2 - 2.4)	11.3 (9.3 - 14.0)	<0.001
TC (mmol/L)	3.8 (3.4 - 4.1)	6.1 (5.1 - 7.2)	<0.001
HDL-C (mmol/L)	1.3 (1.1 - 1.4)	0.8 (0.7 - 0.9)	<0.001
LDL-C (mmol/L)	2.0 (1.8 - 2.2)	3.9 (3.0 - 5.0)	<0.001
TG (mmol/L)	0.9 (0.7 - 1.3)	2.7 (2.2 - 3.3)	<0.001
Hb (g/dL)	13.8 (13.1 - 14.8)	14.5 (13.3 - 15.6)	0.142

BMI - body mass index; SBP - systolic blood pressure; DBP - diastolic blood pressure; HbA1c - glycated hemoglobin; FPG – Fasting plasma glucose; HOMA- Homeostasis Model Assessment; TC - total cholesterol; HDL-C - high-density lipoprotein; LDL-C - low-density lipoprotein; TG - triglycerides; Hb – hemoglobin; Results were shown as median (interquartile range). The groups were compared by Mann-Whitney test. Age were shown as mean ± standard derivation and was compared by Student's t test.

Table 2. Laboratory characteristics of the study group in relation to Fibrinogen, D-dimer CXCL4, TxB2, β tg and platelets.

	Control (n= 38)	DM (n=38)	p
Fibrinogen (mg/dL)	175.5 (94.7 - 232.0)	318.0 (300.8 - 398.3)	< 0.001
D-Dimer (ng/mL)	267.0 (254.0 - 399.3)	498.0 (452.8 - 684.0)	< 0.001
CXCL4 (ng/mL)	39.0 (32.0 - 44.2)	75.0 (67.0 - 82.2)	< 0.001
ThromboxaneB2 (ng/mL)	49.0 (40.7 - 52.0)	90.5 (83.0 - 97.5)	< 0.001
β-thromboglobulin (ng/mL)	66.0 (57.0 - 80.0)	121.0 (111.0 - 129.8)	< 0.001
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	225.0 (187.0 - 262.0)	219.0 (184.3 - 256.3)	0.567

CXCL4 – Platelet factor 4; PLT - platelet count. Results were shown as median (interquartile range). The groups were compared by Mann-Whitney test.

Table 3. Coagulation and platelet activation markers stratified by HOMA index.

	HOMA-1 (0.89-1.77)	HOMA-2 (1.77-5.26)	HOMA-3 (5.26-11.32)	HOMA-4 (11.32-18.56)	p
Fibrinogen (mg/dL)	172.0 (94.0 - 259.0)	178.0 (95.0 - 212.0)	315.0 (301.0 - 345.0)	321.0 (300.0 - 402.0)	<0.001
D-DIMER (ng/mL)	267.0 (254.0 - 396.0)	267.0 (254.0 - 412.0)	498.0 (477.0 - 502.0)	498.0 (413.0 - 712.0)	<0.001
CXCL4 (ng/ml)	39.0 (28.0 - 45.0)	40.0 (35.0 - 44.0)	75.0 (60.0- 82.0)	75.0 (69.0 - 83.0)	<0.001
TxB2 (ng/ml)	47.0 (37.0 - 51.0)	49.0 (44.0- 55.0)	91.0 (80.0 - 99.0)	90.0 (85.0 - 97.0)	<0.001
βtg (ng/ml)	65.0 (57.0- 78.0)	69.0 (57.0 - 84.0)	119.0 (114.0 - 138.0)	121.0 (107.0 - 129.0)	<0.001
Platelet (10³/μL)	223 (187 - 258)	247 (187-275)	219 (187 - 300)	219 (165 - 228)	0.745

CXCL4 – Platelet factor 4, TxB2 – Thromboxane B2, βtg – β-thromboglobulin. Results were shown as median (interquartile range). The groups were compared by Kruskal-Wallis test.

4 CONCLUSÕES

- Os níveis de marcadores de coagulação (D-dímeros e fibrinogênio) encontram-se mais elevados em pacientes DM tipo 2 recentemente diagnosticados quando comparados ao grupo controle;
- Os níveis de marcadores de ativação plaquetária (tromboxano, β -tromboglobulina, e Fator-4-plaquetário) também encontram-se mais elevados nos pacientes DM tipo 2 recentemente diagnosticados;
- Os pacientes DM tipo 2 recentemente diagnosticados apresentaram resistência a insulina em níveis elevados enquanto o grupo controle não apresentou esse dado clínico;
- A estratificação dos indivíduos do estudo demonstrou que nos quartis mais elevados de HOMA (HOMA 3 e HOMA 4) os marcadores da coagulação (D-dímeros e fibrinogênio) e de ativação plaquetária (CXCL4, TxB2 e β tg) apresentaram-se em maior concentração em relação aos quartis mais baixos (HOMA 1 e HOMA 2) o que nos permitiu especular a associação de HOMA com os marcadores da coagulação e da ativação plaquetária. Verificamos que existe correlação positiva do HOMA com os marcadores da ativação plaquetária, o que vem a reforçar estes achados.

5 REFERÊNCIAS

- ABBATE, R. et al. Thrombosis and Acute coronary syndrome. **Thromb Res**, Elmsford, v.129, n.3, p.235-240, 2012
- ADA. American Diabetes Association, **ADA Standards of medical care in diabetes – 2016**. New York, v. 39, sup. 1, Jan. 2016
- ADA, American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Definition and description of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, New York, v. 33, supp. 1, p. s62-s69, Jan. 2010.
- ADA, American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, New York, v. 25, supp. 1, p. s5-s20, Jan. 2002.
- ADAMS, R. L. C.; BIRD, R. J. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. **Nephrology**, Carlton, v. 15, n. 5, p. 462-470, Aug. 2009
- AGUIAR, L. G. K.; VILLELA, N. R.; BOUSKELA, E. A microcirculação no Diabetes: Implicações nas Complicações Crônicas e Tratamento da Doença. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 51, n. 2, p. 204-211, Mar. 2007
- AHRANI, S. H.; AJJAN, R. A. Coagulation and fibrinolysis in diabetes. **Diab Vasc Dis Res**, Edgbaston, v. 7, n. 4, p. 260-273, Oct. 2010
- AIDOUDI, S.; BIKFALVI, A. Interaction of PF4 (CXCL4) with the vasculature: A role in atherosclerosis and angiogenesis. **Thrombo Haemost**, Stuttgart, v. 104, n. 5, p. 941-948, Nov. 2010
- ALEXANDRU, N. et al. Vascular complications in diabetes: Microparticles and microparticle associated microRNAs as active players. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 472, n. 1, p. 1-10, Mar. 2016
- ASAD, M.; MUNIR, T. A.; AFZAL, N. Acacia Nilotica Leave Extract and Glyburide: Comparison of Fasting Blood Glucose, Serum Insulin, β -Thromboglobulin Levels and Platelet Aggregation in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. **J Pak Med Assoc**, Karachi, v. 61, p. 247-251, Mar. 2011
- ASSMANN, T. S. et al. Nitric oxide levels in patients with diabetes mellitus: A systematic review and metaanalysis. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 61, p. 1-9, Sep, 2016
- BLUNK, J. A.; SAUERSTEIN, K.; SCHMELZ, M. Experimental thermal lesions induce beta-thromboglobulin release from activated platelets. **Eur J Pain**, London, v. 15, n. 1, p. 23-28, Jan. 2011
- BODEN, G. 45Obesity, Insulin Resistance and Free Fatty Acids. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, Massachusetts, v. 18, n. 2, p. 139-143, Apr. 2011

CAPRA, V. et al. Impact of vascular thromboxane prostanoid receptor activation on hemostasis, thrombosis, oxidative stress, and inflammation. **J Thromb Haemost**, England, v. 12, n. 2, p. 126-137, Feb. 2014

CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **J Bras Patol Med Lab**, [S.l.], v. 42, n.5, p. 312-332, Out. 2006

CATHCART, M. C. et al. Thromboxane synthase expression and correlation with VEGF and angiogenesis in non-small cell lung cancer. **Bioch Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1842, n. 5, p. 747-755, May. 2015

CERSOSIMO, E. Acute insulin resistance stimulates and insulin sensitization attenuates vascular smooth muscle cell migration and proliferation. **Physiol Rep**, Massachusetts, v. 2, n. 8, e12123, Aug. 2014

CHAROENSRI, N.; PORNRATANARANGSI, S. D-dimer plasma levels in NSTEMI-ACS patient. **J Med Assoc Thai**, Thailand, v.94, n.1, p. S39-S45, 2011

CHOPRA, N. et al. An elevated D-dimer value: a burden on our patients and hospitals. **Int J Gen Med**, Auckland, v. 5, n. 1, p. 87-92, 2012

CHOU, Y. I. et al., Correlations of platelet-derived microparticles with thromboxane B2, platelet-activating factor, endothelin-1, and neutrophil to lymphocyte ratio in patients with coronary intermediate lesions. **Biomarkers**, London, v. 19, n. 8, p. 684-692, Dec. 2014

COOPER, J. N. et al. Associations between arterial stiffness and platelet activation in normotensive overweight and obese young adults. **Clin Exp Hypertens**, New York, v. 36, n. 3, p. 115-122, May. 2014

CRAIG, M.E.; HATTERSLEY, A.; DONAGHUE, K.C. Definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents. **Pediatr Diabetes**, Denmark, v. 10, supp. 12, p. 3-12, Sep. 2009

CUSI, K. et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. **J Clin Invest**, [S.l.], v. 105, n. 3, p. 311-320, Feb. 2000

DEMIRTAS, L. et al. Association of hematological indices with diabetes, impaired glucose regulation and microvascular complications of diabetes. **Int J Clin Exp Med**, Rootstown, v. 8, n. 7, p. 11420-11427, Jul. 2015

Diabetes Programme. In: world health organization. Disponível em:
<http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/en/index3.html> Acesso em 31 de Out. 2016.

DUARTE, R. C. F. et al. Effect of acetylsalicylic acid on platelet activation and oxidative profile in a set of Brazilian patients with type 2 diabetes mellitus. **Blood Coagul Fibrinolysis**, London, v. 26, n. 2, p. 123-130, Mar. 2015

- ERBEL, C. et al. CXCL4-induced plaque macrophages can be specifically identified by co-expression of MMP7+S100A8+ in vitro and in vivo. **Innate Immun**, Los Angeles, v. 21, n. 3, p. 255-265, Apr. 2015b
- ERBEL, C. et al. CXCL4 Plasma Levels Are Not Associated with the Extent of Coronary Artery Disease or with Coronary Plaque Morphology. **Plos One**, San Francisco, v. 10, n. 11, p. 1-11, Nov. 2015a
- FATEH-MOGHADAM, S. et al. Platelet Degranulation Is Associated With Progression of Intima-Media Thickness of the Common Carotid Artery in Patients With Diabetes Mellitus Type 2. **Arterioscl Thromb Vasc Biol**, Dallas, v. 25, n. 6, p. 1299-1303, Jun. 2005
- FERREIRA, C. N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Rev Bras Hematol Hemoter**, São Paulo, v. 32, n. 5n p. 416-421, 2010
- FONTANA, P. et al. Antiplatelet Therapy: Targeting the TxA2 Pathway. **J Cardiovasc Transl Res**, New York, v. 7, n. 1, p. 29-38, Feb. 2014
- FRANCHINI, M. et al. The metabolic syndrome and the risk of arterial and venous thrombosis. **Thromb Res**, Elmsford, v. 122, n. 6, p. 725-870, 2008
- GAJOS, G.; PIŁACIŃSKI, S.; ZOZULIŃSKA-ZIÓŁKIEWICZ, D. Controversies in diabetes in 2013 - A brief update. **Adv Clin Exp Med**, Poland, v. 22, n. 6, p. 777-784, 2013.
- GIMBRONE, M. A. et al. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. **Ann N Y Acad Sci**, Malden USA, v. 902, p. 230-239, May. 2000
- GLEISSNER, C. A. et al. CXCL4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived Macrophages. **J Immunol**, Bethesda, v. 184, n. 9, p. 4810-4818, May. 2010
- GLEISSNER, C. A.; HUNDELSHAUSEN, P.; LEY, K. Platelet chemokines in vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, Dallas, v. 28, n. 11, p. 1920 -1927, Nov. 2008
- GLEISSNER, C. A.; LEY, K. CXCL4 in atherosclerosis: Possible roles in monocyte arrest and macrophage foam cell formation. **Thromb Haemost**, Stuttgart, v. 98, n. 5, p. 917-918, Nov. 2007
- GRANT, P. J. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. **J Inter Med**. Sweden, v. 262, n. 2, p. 157-172, Aug. 2007
- GROSS, J. L et al. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, São Paulo, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.
- HAOUARI, M.; ROSADO, J. A. Platelet signalling abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus: a review. **Blood Cells Mol. Dis**, La Jolla, v. 41, p. 119-123, 2008.
- HERDER, C.; CARSTENSEN, M.; OUWENS, D. M. Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes. **Diabetes Obes Metab**, England, v. 15 Supp. 3, p. 39-50, Sep. 2013.

- HESS, K. The vulnerable blood: Coagulation and clot structure in diabetes mellitus. **Hamostaseologie**, Stuttgart, v. 35, n. 1, p. 25-33, Nov. 2015
- HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. Coagulation 2006: A Modern View of Hemostasis. **Hematol Oncol Clin N Am**, Massachusetts, v. 21, n. 1, p. 1-11, Feb. 2007
- HUANG, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. **Dis Model Mech**, United Kingdom, v. 2, n. 5-6, p. 231-237, May. 2009
- HURI, Z.; LING, D. Y. H.; WAN AHMAD, W. A. Association between glycemic control and antidiabetic drugs in type 2 diabetes mellitus patients with cardiovascular complications. **Drug Des Devel Ther**, Auckland, v. 9, p. 4735-4749, Aug. 2015.
- IGNJATOVIC, V. et al. The Quantitative and Qualitative Responses of Platelets in Pediatric Patients Undergoing Cardiopulmonary Bypass Surgery. **Pediatr Cardiol**, New York, v. 33, n. 1, p. 55-59, Jan. 2012
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 7 ed. Brussels, Belgium, 2015. Disponível em: < <http://www.diabetesatlas.org/> >. Acesso em: 16 de jun 2015
- KASPER, B. et al. Platelet Factor 4 (CXC Chemokine Ligand 4) Differentially Regulates Respiratory Burst, Survival, and Cytokine Expression of Human Monocytes by Using Distinct Signaling Pathways. **J Immunol**, Baltimore, v. 179, n. 4, p. 2584-2591, Aug. 2007
- KASPER, B. et al. Platelet factor 4 (PF-4)-induced neutrophil adhesion is controlled by src-kinases, whereas PF-4-mediated exocytosis requires the additional activation of p38 MAPkinase and phosphatidylinositol 3-kinase. **Blood**, New York, v. 103, n. 5, p. 1602-1610, Mar. 2004
- KASPER, B.; PETERSEN, F. Molecular pathways of platelet factor 4/CXCL4 signaling. **Eur J Cell Biol**. Jena, v. 90, n. 6-7, p. 521-526, Jun.-Jul. 2011
- KEATING, F. K; SOBEL, B.E; SCHNEIDER, D. J. Effects of increased concentrations of glucose on platelet reactivity in healthy subjects and in patients with and without diabetes mellitus. **Am J Cardiol**, Philadelphia, v. 92, n. 11, p. 1362-1365, Dec. 2003
- KESIEME, E. et al.. Deep vein thrombosis: a clinical review. **J Blood Med**, Auckland, v. 2, n. 1, p. 59-69, Apr. 2011
- KIM, J. H.; BAE, H. Y.; KIM, S. Y. Clinical Marker of Platelet Hyperreactivity in Diabetes Mellitus. **Diabetes Metab J**, Seoul, v. 37, n. 6, p. 423-428, Dec. 2013
- KING, R. J.; GRANT, P. J. Diabetes and cardiovascular disease: pathophysiology of a life-threatening epidemic. **Herz**, Munchen, v. 41, n. 3, p. 184-192, May. 2016
- KOENEN, R. R. et al. Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice. **Nat Med**, New York, v. 15, n. 1, p. 97-103, Jan. 2009

LANN, D.; LeROITH, D. Insulin Resistance as the Underlying Cause for the Metabolic Syndrome. **Med Clin N Am**, Philadelphia, v. 91, n.6 ,p. 1063-1077, Nov. 2007

LEVI, M.; POLL, T. Inflammation and coagulation. **Crit Care Med**, Philadelphia, v. 38, sup. 2, p. S26-S34, Feb. 2010

LI, J. et al. The roles and potential therapeutic implications of CXCL4 and its variant CXCL4L1 in the pathogenesis of chronic liver allograft dysfunction. **Cytokine Growth Factor Rev**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 67-74, Feb. 2016

LOPEZ, L. R. et al. Platelet thromboxane (11-dehydro-Thromboxane B2) and aspirin response in patients with diabetes and coronary artery disease. **World J Diabetes**, Beijing, v. 5, n. 2, p. 115-127, Apr. 2014

MADEIRA, I. R. et al. Ponto de Corte do Índice Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) Avaliado pela Curva Receiver Operating Characteristic (ROC) na Detecção de Síndrome Metabólica em Crianças Pré-Púberes com Excesso de Peso. **Arq Bras Endocrinol & Metabol**, São Paulo, v. 52, n. 9, Dec. 2008

MATSUMOTO, T. et al. Enhanced uridine adenosine tetraphosphate-induced contraction in renal artery from type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats due to activated cyclooxygenase/thromboxane receptor axis. **Pflugers Arch**, Berlin, v. 466, n. 2, p. 331-342, Feb. 2014

MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, Bernlin, v. 28, n. 7, p. 412-419, Jun. 1985

MOERS, A. et al. Unresponsiveness of Platelets Lacking Both $G\alpha_q$ and $G\alpha_{13}$. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 279, n. 44, p. 45354-45359, Oct. 2004

MORAIS, P. R. S. DE et al. Correlation of Insulin Resistance with Anthropometric Measures and Blood Pressure in Adolescents. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, v. 106, n. 4, p. 319–26, Mar. 2016.

NICHOLS, T. C. et al. Oxidized LDL and fructosamine associated with severity of coronary artery atherosclerosis in insulin resistant pigs fed a high fat/high NaCl diet. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 7, p. 1–26, 2015.

OSORIO, J. H.; QUENÁN, Y. E.; GÓMEZ, W. B. Evolución y cambios en el sistema de la coagulación sanguínea. Una reflexión. **Univ Salud**, Colombia, v. 15, n. 2, p. 225-237, 2013

PANENI, F.; BECKMAN, J. A.; CREAGER, M. A. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. **Eur Heart J**, London, v. 34, n. 31, p. 2436-2443, Aug. 2013

PEREIRA, R. S. et al. Assessment of Oxidative, Inflammatory, and Fibrinolytic Biomarkers and DNA Strand Breakage in Hypercholesterolemia. **Inflammation**, New York, v. 36, n. 4, p. 869-877, Aug. 2013

- PIETERS, M. et al. Glycaemic control improves fibrin network characteristics in type 2 diabetes – A purified fibrinogen model. **Thromb Haemost**, Stuttgart, v. 99, n. 4, p. 691-700, Apr. 2008
- POSMA, J. J.; POSTHUMA J. J.; SPRONK, H. M. Coagulation and non-coagulation effects of thrombin. **J Thromb Haemost**, Oxford, v. 14, n. 10, p. 1908-1916, Oct. 2016
- RADZIUK, J. Homeostatic model assessment and insulin sensitivity/resistance. **Diabetes**, [S.I.], v. 63, n. 6, p. 1850–1854, Jun. 2014.
- RAVINDRAN, R.; KRISHNAN, L. K. A Biochemical Study on the Effect of Proteolysis of Beta-Thromboglobulin Proteins Released from Activated Platelets on Fibroblast Proliferation. **Pathoph Haemost Thromb**, Switzerland, v. 38, n. 8, p. 285-289, 2007-2008
- ROGALA, B.; ASSESSMENT, N. M.; KASPERSKA-ZAJAC, A. Assessment of platelet activity as expressed by plasma levels of platelet factor 4 and b -thromboglobulin in patients with chronic idiopathic urticaria. **Exper dermatol**, Denmark, n. 9, p. 515–518, Jul. 2005.
- ROOY, M. J; PRETORIUS, E. Obesity, hypertension and hypercholesterolemia as risk factors for atherosclerosis leading to ischemic events. **Curr Med Chem**, Netherlands, v. 21, n. 19, p. 2121 – 2129, 2014
- SAADAWI, S. et al. Inhibitory Effects of Acetylmelodorinol, Chrysin and Polycarpol from *Mitrella kentii* on Prostaglandin E2 and Thromboxane B2 Production and Platelet Activating Factor Receptor Binding. **Molecules**, Switzerland, v. 17, n. 5, p. 4824- 4835, May. 2012
- SABOOR, M. et al. Functional status of vascular endothelium in diabetes Mellitus. **J Ayub Med Coll Abbottabad**, Abbottabad, v. 26, n. 2, p. 239-246, Apr-Jun, 2014
- SALVADOR, B. et al. Modulation of endothelial function by Toll like receptors. **Pharmacol Res**, San Diego, v. 108, n. 1, p. 46-56, Jun. 2016
- SANDSET, P. M. CXCL4-platelet factor 4, heparin-induced thrombocytopenia and cancer. **Thromb Res**. Elmsford, v. 129, s. 1, p. S97-S100, Apr. 2012
- SARASWATHI, V. et al. Impact of hematopoietic cyclooxygenase-1 deficiency on obesity-linked adipose tissue inflammation and metabolic disorders in mice. **Metab Clin Exp**, Naples, v. 62, n. 11, p. 1673-1685, Nov. 2013
- SCHNEIDER, D. J. Factors contributing to increased platelet reactivity in people with diabetes. **Diabetes Care**, New York, v. 32, n. 4, p. 525-527, abr. 2009.
- SELVIN, E. et al. Glycated Hemoglobin, Diabetes, and Cardiovascular Risk in Nondiabetic Adults. **N Engl J Med**, Massachusetts, v. 362, n. 9, p. 800-811, Mar. 2010
- SENA, C. M.; PEREIRA, A. M.; SEIÇA, R. Endothelial dysfunction — A major mediator of diabetic vascular disease. **Bioch Bioph Acta**, Amsterdam, v. 1832, n. 7, p. 2216-2231, Jul. 2014

SENZEL, L.; GNATENKO, D. V.; BAHOU, W. F. The Platelet Proteome. **Curr Opin Hematol**, Philadelphia, v. 16, n. 5, p. 329-333, Sep. 2009

SHI, G. et al. Platelet factor 4 mediates vascular smooth muscle cell injury responses. **Blood**, New York, v. 121, n. 21, p. 4417-4427, May. 2013

SINGH, P. et al. Diabetes to cardiovascular disease: Is depression the potential missing link?. **Med Hypotheses**, Philadelphia, v. 84, n. 4, p. 370-378, Apr. 2015

SMYTH, S. S. et al. Platelet functions beyond hemostasis. **J Thromb Haemost**, Massachusetts, v. 7, n. 11, p. 1759-1766, Nov. 2009

SOARES, A. L., et al. Alterações do sistema hemostático nos pacientes com diabetes melito tipo 2. **Rev Bras Hematol Hemoter**, São Paulo, v. 32, n.6, p. 482-488, 2010

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **SBD Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**, 2016. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/sbdonline/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2015-2016.pdf>>. Acesso em: 13 Nov. 2016

SQUELLERIO, I. et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for simultaneous measurement of thromboxane B2 and 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid in serum. **J Pharm Biomed Analysis**, [S.l.], v. 96, p. 256-262, Aug. 2014

TOUSOULIS, D. et al. Diabetes Mellitus-Associated Vascular Impairment: Novel Circulating Biomarkers and Therapeutic Approaches. **J Am Coll Card**, Washington, v. 62, n. 8, p. 667-676, Aug, 2013

TSO, T. K.; HUANG, W.-N. Elevation of fasting insulin and its association with cardiovascular disease risk in women with systemic lupus erythematosus. **Rheumatol Int**, v. 29, n. 7, p. 735–42, Nov. 2009.

VASQUES, A. C. J. et al. Análise crítica do uso dos índices do Homeostasis Model Assessment (HOMA) na avaliação da resistência à insulina e capacidade funcional das células-beta pancreáticas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 52, n.1, p.32-39, Fev. 2008

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks**. Switzerland, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf>. Acesso em: 20 Aug. 2016.

WILSON, N. O. CXCL4 and CXCL10 predict risk of fatal cerebral malaria. **Dis Markers**, Chichester, v. 30, n. 1, p. 39-49, Apr. 2011

WINDELOV, N. A. et al. Circulating levels of platelet a-granule cytokines in trauma Patients. **Inflamm Res**, Basel, v.64, n. 3-4, p. 235-241, Apr. 2015

XU, J.; ZOU, M. Molecular Insights and Therapeutic Targets for Diabetic Endothelial Dysfunction. **Circulation**, Dallas, v. 120, n. 3, p. 1266-1286, Sep. 2009

XU, X.; SUN, B. Platelet granule secretion mechanisms: Are they modified in sepsis?. **Thromb Res**, Elmsford, v. 136, n. 5, p. 845-850, Nov. 2015

YASAR, A. S. et al. Increased platelet activity in patients with isolated coronary artery ectasia. **Coron Artery Dis**, Philadelphia, v. 18, n. 6, p. 451-454, Sep. 2007

YEO, L. et al. Expression of chemokines CXCL4 and CXCL7 by synovial macrophages defines an early stage of rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, London, v. 75, n. 4, p. 763-771, Apr. 2016

ZALDIVAR, M. M. et al. CXC Chemokine Ligand 4 (CXCL4) Is a Platelet-Derived Mediator of Experimental Liver Fibrosis. **Hepatology**, Baltimore, v. 51, n. 4, p. 1345-1353, Apr. 2010

ZHUANG, P. et al. Dynamic changes in plasma tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1 and beta-thromboglobulin content in ischemic stroke. **J Clin Neurosc**, [S.l.], v. 22, n.7, p. 1123-1127, Jul. 2015