



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

EVANDRO MARCOS DENONI ALEXANDRE

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO AGONISTA BETA3- ADRENÉRGICO,
MIRABEGRON EM PLAQUETAS HUMANAS ISOLADAS DE VOLUNTÁRIOS
SADIOS

CAMPINAS

2017

EVANDRO MARCOS DENONI ALEXANDRE

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO AGONISTA BETA3- ADRENÉRGICO,
MIRABEGRON EM PLAQUETAS HUMANAS ISOLADAS DE VOLUNTÁRIOS
SADIOS

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do
título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Fabíola Taufic Mônica Iglesias

Coorientador: Prof Dr Gilberto De Nucci

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO EVANDRO MARCOS DENONI ALEXANDRE, E
ORIENTADA PELA PROF^a DR^a FABÍOLA TAUFIC MÓNICA IGLESIAS.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 131907/2105-8

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

AL27c Alexandre, Evandro Marcos Denoni, 1975-
Caracterização farmacológica do agonista beta3- adrenérgico, Mirabegron em plaquetas humanas isoladas de voluntários sadios / Evandro Marcos Denoni Alexandre. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Fabíola Taufic Mônica Iglesias.

Coorientador: Gilberto de Nucci.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Agregação plaquetária. 2. Mirabegron. 3. Receptores adrenérgicos beta-3. 4. AMP cíclico. I. Iglesias, Fabíola Taufic Mônica, 1980-. II. De Nucci, Gilberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Pharmacological characterization of the beta3- adrenergic agonist, Mirabegron on isolated platelets of healthy volunteers

Palavras-chave em inglês:

Platelets aggregation

Mirabegron

Receptors, Adrenergic, beta-3

Cyclic AMP

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Fabíola Taufic Mônica Iglesias [Orientador]

Sisi Marcondes Paschoal

Carlos Alan Candido Dias Júnior

Data de defesa: 15-12-2017

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

EVANDRO MARCOS DENONI ALEXANDRE

ORIENTADOR: PROF. DR. FABÍOLA TAUFIC MÓNICA IGLESIAS

COORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

MEMBROS:

1. PROF. DR. FABÍOLA TAUFIC MÓNICA IGLESIAS

2. PROF. DR. SISI MARCONDES PASCHOAL

3. PROF. DR. CARLOS ALAN CANDIDO DIAS JÚNIOR

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 15/12/2017.

Dedico aos meus Pais; Gisele,
minha Esposa e Elisa, minha
filha- pelo que representam
para mim.

À Deus, pela sua magnitude e minha pequenez, meu humilde Obrigado!

Àos doadores que literalmente “deram o sangue” para que pudéssemos realizar esse trabalho...

Aos colegas da “cascata”, do “edema”, do “lab da Sisi”, do “lab do Gabriel”, em especial à Camila Mendes, Caroline, Eduardo, Fabiano, Mari, Júlio, Rafael, Dailson, Luis Ricardo, Sandra, Pedro pelo apoio, incentivo e atenção...

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia: Bruno, Gustavo, Cidinha, Maísa e também nossa querida Gláucia, por todos os socorros em diversos momentos e afazeres...

Aos Professores Doutores Stephen, Gabriel, Edson, Sisi, Ivani e Elen entre outros que contribuíram para meu crescimento, desenvolvimento acadêmico...

À Professora Dr^a Fabíola, primeiramente pela minha oportunidade, pela dedicação, apoio e críticas visando meu aprendizado e amadurecimento acadêmico, bem como pela disposição em me ouvir, corrigir e Orientar sempre quando precisei, solicitei ou quando fora necessário...

Enfim àos meus familiares: Gisele, Elisa, Ana, André, “Bisa”, Sebastião, Lourdes, Elaine e amigos que participaram de minha jornada sempre me apoiando, torcendo, sofrendo e convivendo comigo neste período...

À CNPq (N.131907/2015-8) pelo financiamento desta pesquisa...

À todos meus sinceros:

Muito obrigado!!!

RESUMO

Introdução: O mirabegron, é um agonista beta3-adrenérgico e foi aprovado em 2012 pelas agências regulatórias da comunidade européia, americana, canadense, japonesa para o tratamento da bexiga hiperativa. Em 2015, seu uso foi aprovado no Brasil. A ativação deste receptor pelas catecolaminas aumenta os níveis intracelulares do segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Estudos em cardiomiócitos e na musculatura lisa vascular mostraram que a ativação destes receptores também pode levar ao aumento dos níveis de óxido nítrico (NO)-GMPc pela ativação da via fosfoinositidina 3-quinase (PI3K)-proteína quinase B (PKB). Uma vez que i) o mirabegron é considerado um medicamento seletivo para o subtipo beta3 frente aos subtipos beta1 e beta2; ii) estudos clínicos envolvendo pacientes com bexiga hiperativa mostraram que a eficácia do mirabegron não foi inferior frente à terapia padrão e com pouca incidência de efeitos adversos e iii) substâncias que aumentam os níveis intracelulares de AMPc inibem as plaquetas, aventamos a hipótese de que o mirabegron poderia inibir a atividade plaquetária. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi o de caracterizar farmacologicamente o efeito do mirabegron em plaqueta isolada de voluntários sadios. **Material e Métodos:** Realizamos estudos de agregação plaquetária com os agonistas colágeno e trombina na ausência e na presença de antagonistas mais seletivos para os receptores beta1, beta2 e beta3, dos inibidores da adenilato ciclase, da sintase de óxido nítrico (NOS) e da guanilato ciclase solúvel (GCs). Posteriormente, os níveis dos nucleotídeos cíclicos AMPc, guanosina monofosfato cíclico (GMPc) e do tromboxano B2 (TXB2) foram determinados. Ensaio de fluorimetria utilizando o fluoróforo Fura 2AM foi realizado para determinação da mobilização de cálcio (Ca^{2+}) total e intracelular. **Resultados:** O mirabegron (10 – 300 μ M) produziu inibição significativa na agregação induzida pelo colágeno ou trombina. Uma vez que a trombina é um potente agregante plaquetário, todos os próximos protocolos foram realizados com este agonista. Posteriormente, pré-incubamos as plaquetas com o antagonista seletivo beta3, L 748,337 (1 μ M) e com o inibidor da adenilato ciclase solúvel, SQ 22,536 (100 μ M) e pudemos observar uma reversão do efeito inibitório do mirabegron para os mesmos níveis do controle. O mirabegron aumentou os níveis intracelulares do AMPc e diminui a liberação de TXB2. Para confirmar que o efeito do mirabegron não era devido à ativação dos receptores beta1 ou beta-2, realizamos a agregação plaquetária na presença dos antagonistas atenolol e ICI 118,551. Entretanto, o bloqueio dos receptores beta-1 e beta-2 não interfereu

na atividade inibitória induzida pelo mirabegron. Em plaquetas pré-incubadas com os inibidores da NOS (L-NAME, 100 μ M) e da GCs (ODQ, 10 μ M) observamos uma reversão parcial do efeito inibitório induzido pelo mirabegron, entretanto, os níveis intracelulares de GMPc não foram alterados. O mirabegron foi capaz de reduzir substancialmente os níveis totais e intracelulares de Ca^{2+} . **Conclusão:** o mirabegron inibiu a agregação plaquetária por um mecanismo dependente da ativação dos receptores beta3-adrenérgicos levando à maiores e menores níveis intracelulares de AMPc e Ca^{2+} , respectivamente. Nossos achados sugerem que agonistas beta3-adrenérgicos possam ser utilizados como adjuvantes da terapia antiplaquetária.

Palavras chave: agregação plaquetária; mirabegron; receptor beta-3 adrenérgico; AMPc.

Abstract

Introduction: Mirabegron is a beta3-adrenergic receptor agonist and was approved in 2012 by the regulatory agencies of the European, American, Canadian, Japanese community for the treatment of hyperactive bladder. In 2015, it was approved in Brazil. The activation of this receptor by the catecholamines increases the intracellular levels of the second messenger adenosine monophosphate (cAMP). Studies in cardiomyocytes and the smooth vascular musculature showed that activation of these receptors can also lead to increased levels of nitric oxide (NO)-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) by activating the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (PKB). Because i) mirabegron is considered selective for beta3-AR relative to the beta1- and beta2-AR, ii) clinical trials showed that mirabegron is noninferior to the standard therapy for the treatment of overactive bladder and induce low incidence of adverse effects and iii) substances that increase the levels of cAMP reduce platelets activity, we tested the hypothesis that mirabegron could inhibit platelet activity. Therefore, the aim of this project is to characterize pharmacologically the effect of mirabegron in isolated platelets from healthy volunteers. **Material and methods:** We conducted platelet aggregation studies with collagen agonists and thrombin in the absence and presence of beta1-, beta2- and beta3-ARs antagonists, inhibitors of adenylate cyclase, nitric oxide synthase (NOS) and soluble guanylate cyclase (sGS). The levels of cAMP, cGMP and thromboxane B2 (TXB2) and the total and intracellular calcium (Ca²⁺) mobilization were also determined. **Results:** Our results showed that mirabegron (10-300 µM) produced significant inhibitions on platelet aggregation induced by collagen- or thrombin. Thrombin is considered one of the most potent aggregating agents, and hence all the next protocols were carried out using this agonist. The β3-antagonist L 748,337 (1 µM) and the adenylate cyclase inhibitor, SQ 22,536 (100 µM) reversed the inhibition induced by mirabegron in thrombin-stimulated platelets. The selective antagonists for β1- and β2-ARs, atenolol and ICI 118,551 (3 µM), respectively did not interfere on the inhibition induced by mirabegron. In Fluo-4 loaded platelets, mirabegron reduced the total and intracellular Ca²⁺ levels. Pre-incubation with mirabegron almost abolished the levels of TXB2 and increased the levels of cAMP. Platelets were pre-incubated with L-NAME or PDQ and a partial reversion of the inhibition induced by mirabegron was observed; however, mirabegron was not able to increase the intracellular levels of cGMP. **Conclusion:** mirabegron

inhibited human platelet aggregation leading to greater and lower intracellular levels of cAMP and Ca²⁺, respectively. Our findings suggested that substances that activate β 3-AR could be used as adjuvant antiplatelet therapy.

Keywords: platelets aggregation; mirabegron; beta-3 adrenoceptor; cAMP.

LISTA DE DROGAS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
ADP	Sigma-Aldrich (EUA)
Atenolol	Sigma-Aldrich (EUA)
Colágeno	Chrono-log (EUA)
DMSO	Sigma-Aldrich (EUA)
EGTA	SigmaAldrich(EUA)
Fura 2 AM	Sigma-Aldrich (EUA)
IBMX	Sigma-Aldrich(EUA)
ICI 118,551	Sigma-Aldrich (EUA)
Iloprost	Schering (Alemanha)
Kit AMP/GMPc	Cayman Chemical (EUA)
Kit Tromboxano B2	Cayman Chemical (EUA)
L 748,337	Sigma-Aldrich (EUA)
L NAME	Sigma-Aldrich (EUA)
Mirabegron	Debye Scientific Co., Ltd. (China)
Nitroprussiato de sódio	Sigma-Aldrich (EUA)
ODQ	Sigma-Aldrich (EUA)
SNP	Sigma-Aldrich (EUA)
SQ 22,536	Sigma-Aldrich (EUA)
Triton-X-100	Sigma-Aldrich(EUA)
Trombina (plasma humano)	Sigma-Aldrich(EUA)

LISTA DE ABREVIACES:

AA	cido araquidnico
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ²⁺	Cálcio
COX1	Ciclooxigenase tipo 1
DMSO	Dimetil sulfóxido
EGTA	cido tetracético etileno glicol
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GPIIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
GTP	Guanosina trifosfato
IP3	Trifosfato de inositol
nNOS	Sintase de óxido nítrico neuronal
NO	xido nítrico
NOS	Sintase de óxido nítrico
ODQ	1-H-[1,2,4] oxidiazolo quinoxalin-1-one
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAR	Receptor ativado por protease
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PF-4	Fator plaquetário 4
PIP2	fosfatidil-inositol-2-fosfato
PKA	Proteína quinase tipo A
PKG	Proteína quinase tipo G
PLA2	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C

SNP	Nitroprussiato de sódio
TXA2	Tromboxano A2
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
vWF	Fator de von Willebrand
β-TG	Tromboglobulina beta

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1. Ativação plaquetária e principais alvos terapêuticos.	18
Figura 2. Efeito inibitório do NO e PGI ₂ na agregação plaquetária.	20
Figura 3. Ativação dos receptores beta-3 adrenérgicos.	22
Figura 4. Efeito do agonista Beta3 adrenérgico, mirabegron (MB) na agregação plaquetária induzida pelos agonistas trombina(A) ou colágeno(B)	30
Figura 5. Efeito do inibidor da adenilato ciclase (A) e do antagonista mais seletivo para o receptor Beta3(B) em plaquetas humanas.....	31
Figura 6. Traçados representativos mostrando a inibição do mirabegron em plaquetas ativadas com trombina ou colágeno (superiores) e a reversão deste efeito causada pelo L 748,337 e SG 22,536 (inferiores)	32
Figura 7. Efeitos do mirabegron na produção de AMPc em plaquetas humanas isoladas.	33
Figura 8. Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores beta1 e beta2- seletivos em plaquetas humanas.....	34
Figura 9. Efeitos do mirabegron nos níveis de Cálcio total (A) e intracelular (B).	35
Figura 10. Efeitos do mirabegron nos níveis de Tromboxano B ₂ em plaquetas isoladas de humanos.	36
Figura 11. Efeito dos inibidores da sintase de óxido nítrico e da guanilato ciclase solúvel em plaquetas humanas estimuladas com trombina e incubadas com mirabegron.....	38
Figura 12. Efeitos do mirabegron na produção de GMPc em plaquetas humanas isoladas.....	39

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Plaquetas	16
1.2 Ativação plaquetária	16
1.3 Inibição da agregação plaquetária	18
1.4 Papel do sistema nervoso simpático em plaquetas: enfoque nos receptores beta-adrenérgicos	20
1.5 Mirabegron.....	22
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivos específicos.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Coleta de Amostras	25
3.2 Protocolos experimentais	25
3.2.1. Obtenção das plaquetas isoladas.....	25
3.2.2. Agregação plaquetária	25
3.3 Quantificação do AMPc, GMPc e Tromboxano B2.....	26
3.4 Mensuração da mobilização de Ca^{2+} em plaquetas	27
3.5. Análise estatística.....	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Efeito do mirabegron na agregação plaquetária	30
4.2 Efeito dos bloqueadores dos receptores beta-adrenérgicos e da adenilato ciclase	31
4.3 Efeito do mirabegron na mobilização intracelular de cálcio.....	35
4.4 Efeito do mirabegron na liberação de tromboxano B2.....	36
4.5 Efeito dos inibidores na sintase de óxido nítrico e da guanilato ciclase solúvel na inibição induzida pelo mirabegron	37
5. DISCUSSÃO	40
6. Referência bibliográfica.....	43
7. Anexos.....	49

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plaquetas

As plaquetas são células anucleadas derivadas de fragmentos de citoplasma dos megacariócitos e migram para sítios danificados do sistema vascular participando do processo de formação de tampões hemostáticos ^{1,2}. O acúmulo de plaquetas é um dos primeiros eventos na formação de trombo arterial e componente crítico da formação da placa de ateroma. As plaquetas estão presentes no sangue em número aproximado de $150-400 \times 10^6/\text{mL}$ e possuem vida média de 8 a 10 dias³. Além do seu papel nos processos de homeostase e trombose, as plaquetas também podem participar do reparo tecidual ⁴, da inflamação ³, da angiogênese ⁵, do crescimento tumoral e da metástase ^{4,5}.

Apesar de serem anucleadas as plaquetas possuem estrutura funcional complexa contendo organelas comuns aos outros tipos celulares tais como mitocôndrias, complexo de Golgi, ribossomos, peroxissomos e microtúbulos ⁶. Ainda, as plaquetas possuem em seu citoplasma três tipos de grânulos classificados como denso, alfa e lisossomais ⁷. Os grânulos densos estocam, principalmente, serotonina (5-HT), adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), cálcio (Ca^{2+}) e os grânulos alfa moléculas de adesão tais como glicoproteína IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$), fator de von Willebrand (vWF), P-selectina, fator plaquetário-4 (PAF-4), trombospondina-1, fator de crescimento plaquetário (PDGF), beta-tromboglobulina (β -TG), fatores de coagulação (fibrinogênio, fator V, fator VII) e plasminogênio ⁸.

Na membrana plasmática das plaquetas estão expressos receptores que medeiam interações adesivas ⁹ e compreendem a família das integrinas (glicoproteínas), da leucina, as imunoglobulinas e as selectinas. As integrinas formam a maior família de receptores heterodiméricos que regulam a adesão plaquetária ¹⁰.

1.2 Ativação plaquetária

A ativação plaquetária compreende quatro principais etapas, a saber: i) “*shape change*”, ii) secreção, iii) adesão e iv) agregação.

Os receptores presentes na membrana plaquetária permitem a interação da plaqueta com fatores expostos do endotélio vascular, iniciando assim o processo de ativação plaquetária ⁹. O “*shape change*” envolve a mudança da forma discóide para a forma esférica, acompanhada de emissão de pseudópodes ¹¹. Quando as plaquetas se aderem às moléculas de superfícies presentes, principalmente, na camada endotelial, ocorrerá o processo de secreção, que envolve a extrusão do conteúdo dos grânulos, amplificando os processos de adesão e agregação e a formação do tampão hemostático. O endotélio não lesionado exerce um papel de regulação negativa na agregação plaquetária, uma vez que libera o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI₂) e expressa ecto-nucleotidase (CD39), uma proteína de membrana que degrada o ADP, levando assim à menor ativação plaquetária. (Figura 1)

A adesão das plaquetas no vaso lesionado é mediada, principalmente, pela interação entre o colágeno, a integrina $\alpha 2\beta 1$ e o fator von Willebrand, os quais se ligam às glicoproteínas VI (GPVI) e ao complexo 1b (GP1b)- IXV, respectivamente presentes na membrana das plaquetas ¹². Por outro lado, a agregação plaqueta-plaqueta se dá, principalmente, pelo fibrinogênio que se liga à integrina $\alpha IIb\beta 3$ (GP IIa/IIIa), a qual é um receptor com maior número de cópias (~80,000) por plaqueta ¹³.

De modo geral, a ativação plaquetária se dá através de uma seqüência de sinalização, a qual compreende a ligação de um agonista ao seu receptor específico, que, por sua vez, está ligado à proteína G, levando à ativação da fosfolipase C (PLC) e, conseqüentemente, ao aumento de Ca^{2+} intracelular e ativação de uma série de enzimas dependentes deste íon. Esta cascata de sinais intracelulares é responsável pela conversão do receptor $\alpha IIb\beta 3$ (GPIIb/IIIa) do estado de baixa afinidade para o de alta afinidade, permitindo assim a ligação de seu ligante ^{14,15}. A glicoproteína $\alpha IIb\beta 3$ é particularmente importante na interação plaqueta-plaqueta ⁹. A trombina (via receptores PAR 1 e PAR4), o ADP (via receptores P2Y1 e P2Y12), a serotonina (via receptores 5-HT2A), o tromboxano A2 (via receptor TP), oriundo da atividade da ciclooxygenase 1 (COX1) e o colágeno constituem os principais agonistas responsáveis pela ativação plaquetária (Figura 1).

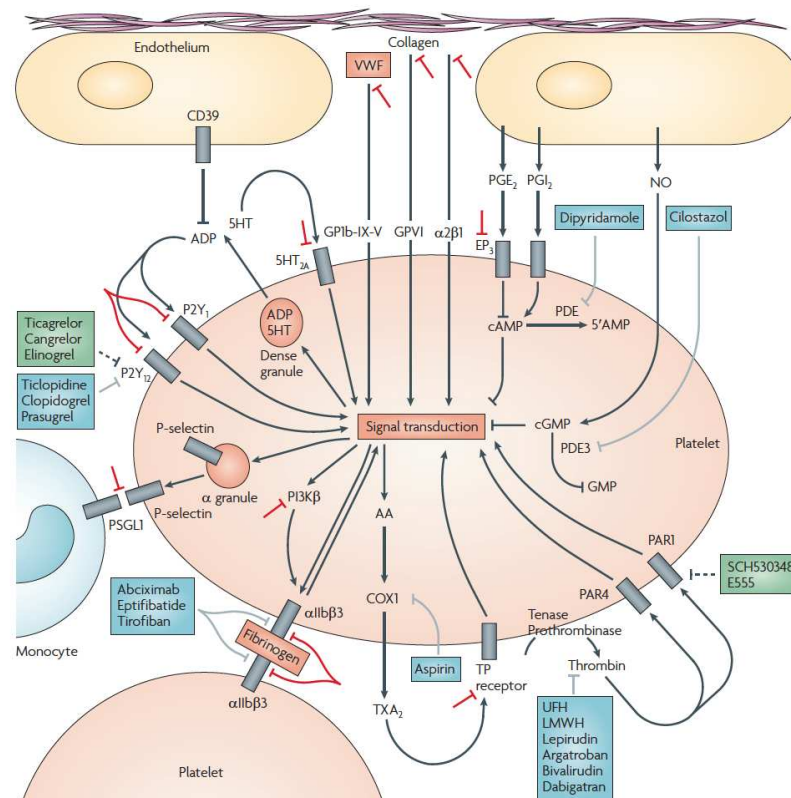


Figura 1. Ativação plaquetária e principais alvos terapêuticos. A adesão plaquetária na parede do vaso lesionado é mediada, principalmente, pelo colágeno e pelo fator de von Willebrand (vWF), os quais se ligam às glicoproteínas de superfícies GPIIb-IX-V e integrina $\alpha 2\beta 1$ e GPIb, respectivamente presentes na membrana das plaquetas. A tromboxano, oriunda da cascata de coagulação, é um potente agonista plaquetário e ativa os receptores PAR 1 e PAR4. Três outros receptores presentes nas plaquetas também contribuem para a ativação plaquetária, a saber: i) ADP via ativação dos subtipos P2Y1 e P2Y12, ii) a serotonina via receptores 5-HT2A e iii) o tromboxano A1, gerado a partir da atividade da ciclooxigenase tipo 1, ativando os receptores TP. De uma maneira geral, a ativação destes receptores levará ao aumento dos níveis intracelulares de cálcio, o qual levará à secreção de grânulos bem como à maior expressão da glicoproteína alfa2beta3. A agregação plaqueta-plaqueta se dá, principalmente, pela ação do fibrinogênio atuando na glicoproteína alfa2beta3. Neste esquema pode-se também observar as principais classes de antiplaquetários disponíveis clinicamente. Legenda: CD39, ecto-nucleotidase; vWF, fator de von Willebrand; PGE2, prostaglandina E2; PGI2, prostaciclina; 5-HT, serotonina; ADP, adenosina difosfato; COX1, ciclooxigenase tipo 1; TXA2, tromboxano A2; cAMP, adenosina monofosfato cíclico; cGMP, guanosina monofosfato cíclico, PDE3, fosfodiesterase tipo 3 ¹⁶.

1.3 Inibição da agregação plaquetária

O óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI2) constituem os principais agentes endógenos que contrabalançam o efeito pró-agregante do ADP, tromboxano, TXA2, colágeno, ácido araquidônico (AA), dentre outros. O NO gerado da atividade da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS), dos nitratos presentes na dieta ou da via S-nitrosotiol e S-nitrosohemoglobina difunde-se pela membrana celular das plaquetas e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC), a qual converte a guanosina trifosfato (GTP) em 3,5'-guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Este ativa a proteína quinase

tipo G I (PKGI), à qual fosforila a fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP) no resíduo de serina 239 (p-VASP ser 239), levando à inibição da atividade plaquetária ¹⁷. Similarmente, a PGI₂, oriunda do metabolismo do ácido araquidônico na camada endotelial, ativa receptores IP levando à maior atividade da adenilato ciclase e à maiores níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), o qual ativa a PKA que fosforila a VASP no resíduo 157 (p-VASP 157) ¹⁸. (Figura 2)

No contexto das doenças cardiovasculares, o equilíbrio entre agentes pro - e antiinflamatórios está comprometido, levando à hiperativação plaquetária. Esta hiperativação pode ser observada em pacientes com doença arterial coronariana ⁵, fibrilação atrial ¹⁹ e insuficiência cardíaca congestiva ²⁰. Importante reiterar que tanto o aumento do estímulo plaquetário como os menores níveis de NO e PGI₂ contribuem para a hiperativação plaquetária observada nestas desordens ⁵. É sabido que nestas desordens a via NO-GCs está alterada seja pela menor biodisponibilidade de NO e/ou menor expressão/atividade da GCs ²¹, o que também pode contribuir para a maior atividade residual das plaquetas. Em plaquetas de pacientes diabéticos a potência frente da PGI₂ e seus análogos se encontrou diminuída, levando à menores níveis basais e estimulados de AMPc ²². Respostas similares foram observadas em pacientes obesos ²³, em que os níveis plaquetários de AMPc também estão diminuídos após estímulo com PGI₂ ²⁴, reiterando assim a importância dos segundos mensageiros AMPc e GMPc como vias inibitórias.

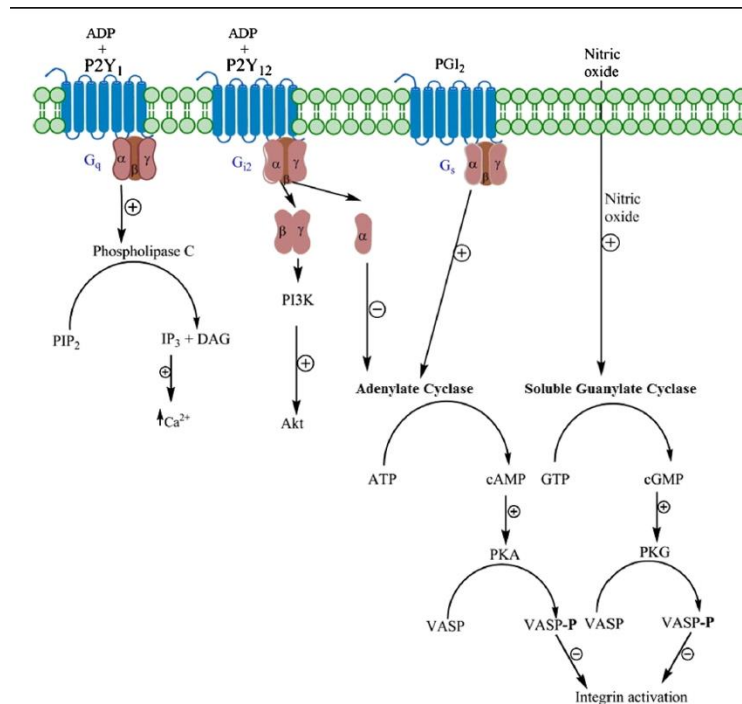


Figura 2. Efeito inibitório do NO e PGI₂ na agregação plaquetária. O AMPc e GMPc ativam as proteínas quinases tipo A (PKA) e G (PKG), as quais fosforilam a p-VASP no resíduo de serina ser157 (pVASP ser157) e p-VASP no resíduo de serina 239 (p-VASP ser239) levando à inibição plaquetária ²⁵.

1.4 Papel do sistema nervoso simpático em plaquetas: enfoque nos receptores beta-adrenérgicos

As catecolaminas possuem um importante papel no processo de trombogênese e seu efeito na atividade plaquetária é mediada, principalmente, pela ativação dos receptores alfa-2 adrenérgicos. Diversos estudos mostraram o papel da adrenalina, noradrenalina e outros agonistas alfa-2 adrenérgicos como agonistas plaquetários e o antagonista alfa-2 adrenérgico, mas não o alfa-1, atuando como agente antiagregante ²⁶. Estudo recente mostrou que em megacariócitos a noradrenalina e a adrenalina aumentaram a adesão, migração e a formação de novas plaquetas in vitro. A ativação dos receptores alfa-2 adrenérgicos pela noradrenalina e adrenalina levou à maior ativação da via da quinase regulada por sinal extracelular (ERK 1/2) nos megacariócitos a formarem mais plaquetas, sugerindo assim que a ativação dos receptores alfa-2 adrenérgicos pelas catecolaminas é um importante fator na regulação da trombopoiese ²⁷.

O papel dos receptores beta-adrenérgicos em plaquetas é menos estudado em comparação aos receptores alfa-adrenérgicos. Estudo de binding mostrou que o receptor beta-2 é o principal subtipo presente nas plaquetas ²⁸. A adição do isoproterenol em plaquetas humanas isoladas levou à inibição plaquetária sendo este efeito antagonizado pelo antagonista beta-2 seletivo (ICI 118,551), mas não pelo antagonista beta-1 (CGP20712A) ²⁹. Neste mesmo trabalho os autores mostraram que a atividade da sintase de óxido nítrico aumentou após a adição de isoproterenol ou forskolina, efeito esse antagonizado na presença do inibidor da NOS, L-NMMA (100 μ M) ou do antagonista ICI118,551, sugerindo assim que o aumento dos níveis de AMPc leva também à maior liberação de NO ³⁰. Até o momento nenhum estudo avaliou o papel dos receptores beta-3 adrenérgicos em plaquetas. Os receptores beta3-adrenérgicos estão expressos na musculatura lisa detrusora ³¹, no endotélio vascular, nos cardiomiócitos e nos adipócitos ³². Além dos maiores níveis de AMPc, estudos mostram que o estímulo dos receptores beta-3 adrenérgicos pode levar à maiores níveis de NO por um mecanismo dependente da ativação da via PI3K/Akt (**Figura 3**). Em modelo animal de infarto do miocárdio foi visto que a administração do agonista beta-3, BRL 37344 atenuou a fibrose e reduziu a área de cicatriz. Além disso, o tratamento com BRL 37344 aumentou a fosforilação da eNOS e a expressão nNOS, sugerindo assim que a ativação do receptor beta-3 em modelo de infarto leva à maior liberação de NO para contrabalancear o estado isquêmico ³³.

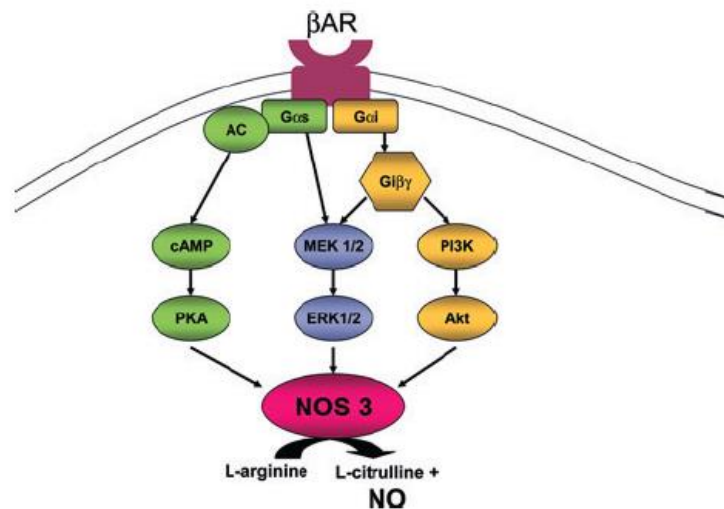


Figura 3. Ativação dos receptores beta-3 adrenérgicos. Dependendo do tecido, a ativação destes receptores ativa proteínas Gs e Gi/o. Esta última ativa a via PI3K/Akt e, portanto, à liberação de NO. βAR: receptores adrenérgicos β; AC: Adenilato ciclase; Gαs e Gαi: Proteína G subunidades alfa s e alfa i; AMPc: monofosfato de adenosina cíclico; PKA: proteína quinase dependente de AMPc; Gβγ: proteína G subunidades β e gama; PI3K: fosfatidilinositol; NOS3: óxido nítrico sintase tipo 3; NO: óxido nítrico ³⁴.

1.5 Mirabegron

Em 1989 o receptor beta-3 foi identificado como sendo o subtipo predominante na bexiga urinária e sua ativação levou ao relaxamento da bexiga e aumento da capacidade da bexiga, devido à abertura dos canais de potássio ativados pelo cálcio e aumento dos níveis intracelulares de AMPc pela maior ativação da enzima adenilato ciclase ³⁵. Em bexiga de humano dois tipos de contrações podem ser observadas, a voluntária levando ao esvaziamento da bexiga e as involuntárias observadas durante a fase de enchimento e que estão aumentadas em pacientes com bexiga hiperativa ³⁶. Estudos pré-clínicos e clínicos mostraram que os agonistas beta-3 adrenérgicos aumentam a capacidade de estocagem da bexiga com poucos efeitos na pressão de esvaziamento, minimizando, portanto, o aparecimento de retenção urinária ³⁷. Estudo com células embrionárias de rim (HEK 293) que superexpressam os receptores beta-1 ou beta-2 ou beta-3 mostrou que o agonista beta-3, mirabegron somente aumentou os níveis de AMPc nas células contendo o receptor beta-3, mas não nas contendo os subtipos beta-1 ou beta-2, mostrando assim a alta seletividade deste agonista para subtipo beta-3 ³⁸. *In vitro*, os agonistas beta-3 adrenérgicos reduziram substancialmente a amplitude de frequência das contrações involuntárias, reduzindo o tônus da bexiga ³⁹.

O mirabegron foi estudado em três estudos clínicos principais com uma inclusão de 4611 pacientes com síndrome da bexiga hiperativa. Os pacientes foram divididos em grupo placebo e tratado com mirabegron (25, 50 ou 100 mg) durante 3 meses. O desfecho de eficácia avaliado foi a alteração do número de episódios de micção e incontinência por dia. Na dose de 50 mg foi observado uma redução do número de episódios de micção em 1,8 por dia em comparação com uma redução de 1,2 por dia no grupo placebo. Achado semelhante foi observado nos episódios de incontinência (1,5 por dia versus 1,1 por dia em comparação ao placebo) ⁴⁰. O mirabegron é rapidamente absorvido após administração oral com valores de T_{max} , meia-vida plasmática e biodisponibilidade de 3-4 horas, 40 horas e 35 %, respectivamente quando administrado em dose única de 50 mg. Grande parte do mirabegron é excretado de maneira inalterada na urina (55%) e nas fezes (34%) ⁴¹. Em 2012, as agências regulatórias dos Estados Unidos, Canadá, Japão, Austrália e Comunidade Européia concederam a autorização de comercialização do mirabegron em seus mercados. Em 2015, o Comitê dos Medicamentos para Uso Humano emitiu parecer favorável à concessão de autorização de introdução do mirabegron (nome comercial Betmiga) no mercado brasileiro.

Além do tratamento da bexiga hiperativa, estudo recente avaliou o papel do mirabegron no tecido adiposo marrom. Voluntários que receberam mirabegron (200 mg) tiveram uma atividade metabólica aumentada do tecido adiposo marrom como evidenciada pela tomografia de emissão de pósitron acoplada à tomografia computadorizada após injeção do radiotraçador fluordeoxiglicose (^{18}F -FDG) além de maior atividade metabólica basal em comparação ao grupo placebo.

Justificativa e hipótese

Este estudo sugere que a indicação terapêutica do mirabegron poderia ser ampliada para o tratamento das desordens metabólicas ⁴². Sabendo que i) substâncias que aumentam os níveis plaquetários de AMPc levam à menor atividade plaquetária, ii) que o mirabegron apresenta maior seletividade para o subtipo beta-3 frente aos subtipos beta-1 ou beta-2 e iii) é um medicamento disponível clinicamente e com poucos efeitos adversos cardiovasculares, aventamos a hipótese de que o mirabegron possa atuar como um inibidor da atividade plaquetária.

2. OBJETIVOS

Caracterizar farmacologicamente o agonista beta-3 adrenérgico, mirabegron em plaquetas isoladas de voluntários sadios.

2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar o efeito do mirabegron em plaquetas estimuladas com os agonistas trombina ou colágeno.
- Caracterizar o efeito do mirabegron na presença dos antagonistas seletivos para os receptores beta1-, beta2- e beta3-adrenérgicos e dos inibidores da adenilato ciclase, da sintase de óxido nítrico e da guanilato ciclase solúvel (ODQ) em plaquetas estimuladas com o agonista trombina.
- Quantificar os nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc em plaquetas incubadas com mirabegron.
- Avaliar a mobilização de cálcio na presença de mirabegron.
- Avaliar a liberação de tromboxano B2 na presença de mirabegron.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de Amostras

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Humana da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob Protocolo nº 835.659/2014. Somente os voluntários que aceitaram assinar o termo de consentimento livre e esclarecido participaram deste estudo e a pesquisa foi conduzida de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975 (revisada em 2008) e a resolução 466/12 (CNS-CONEP). Foram realizadas coletas de sangue venoso (30 mL) de voluntários sadios de ambos os sexos com idade entre 21 e 62 anos, sem uso prévio de quaisquer medicamentos durante pelo menos 10 dias que antecederam a coleta.

3.2 Protocolos experimentais

3.2.1. Obtenção das plaquetas isoladas

O sangue foi coletado em ACD-C (citrato de sódio 13 mM, ácido cítrico 13 mM e glicose 11 mM, na proporção de um volume de ACD-C para nove volumes de sangue). A amostra de sangue foi centrifugada em temperatura ambiente (400 *g*, durante 12 min) obtendo-se o plasma rico em plaqueta (PRP). O PRP foi centrifugado novamente à 800 *g* durante 12 min. As plaquetas foram ressuspensas cuidadosamente em solução de Krebs sem cálcio, contendo (mM) 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 1.2 KH₂PO₄, 1.7 MgSO₄, e 5,6- glicose (pH 7.4). O número de plaquetas foi ajustado para 1.5×10^8 plaquetas/mL, em alíquotas de 400 µL, na presença de CaCl₂ na concentração final de 1 mM.

3.2.2. Agregação plaquetária

A suspensão plaquetária (1.5×10^8 platelets/mL) foi pré-incubada por 3 min com os antagonistas beta 1- (atenolol, 3 µM), beta 2- (ICI 118,551, 3 µM) e beta 3- (L 748,334, 1 µM) adrenérgicos, com inibidores da adenilato ciclase solúvel (SQ 22,536, 100 µM), da guanilato ciclase solúvel (ODQ, 10 µM) e da sintase de óxido nítrico (L-NAME, 100 µM), ou seu veículo correspondente DMSO (0.5% v/v). Em seguida, as plaquetas foram incubadas com mirabegron (MB) (10, 30, 100 e 300 µM) ou DMSO (0.5% v/v) durante 3 min. As plaquetas foram então estimuladas com colágeno (2

$\mu\text{g/mL}$) ou trombina (0.1 U/mL). A agregação plaquetária foi monitorada utilizando-se um agregômetro de dois canais Chrono-log Lumi-Aggregometer modelo 560-Ca, Havertown, PA, USA) calibrado para 0% com solução de plaquetas isoladas e 100 % com solução Krebs-Ringer. Em cada ensaio foram utilizados $400 \mu\text{L}$ de plaquetas isoladas em cubetas siliconadas, mantidas sob agitação constante à 37°C no agregômetro.

3.3 Quantificação do AMPc, GMPc e Tromboxano B2

Para a quantificação do TXB₂, a suspensão de plaquetas (1.5×10^8 plaquetas/mL) foi pré-incubada com mirabegron (3 min) e estimuladas com trombina. A reação foi interrompida pela adição de EGTA gelado e posteriormente centrifugada à 4000 g por 30 minutos (4°C) para obtenção do sobrenadante. As amostras foram estocadas à -20°C até a quantificação.

Para a quantificação dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc, a suspensão de plaquetas foi pré-incubada com o inibidor não-seletivo da fosfodiesterase, 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX, 1 mM) por 20 min, posteriormente com mirabegron ou seu respectivo veículo por 3 minutos e em seguida estimulada com trombina (0.1 U/mL). A suspensão foi centrifugada (4000 g , 4°C , 30 min), o sobrenadante descartado e ao pellet adicionou-se etanol acidificado gelado (67%, v/v) com posterior agitação (30 segundos). As amostras foram centrifugadas (4.000 g , 30 min at 4°C) e o sobrenadante coletado. As amostras foram submetidas à secagem a 55 a 60°C com nitrogênio líquido e estocados à -70°C até a quantificação. A preparação dos tampões e dos padrões foi realizada seguindo-se as instruções do fabricante (Cayman Chemical Cyclic AMP e GMP ou TXB₂ EIA kit, Ann Arbor, MI, USA). Cada ensaio foi realizado em duplicata. A leitura foi realizada à 412 nm . Os limites de detecção para GMPc e AMPc são, respectivamente, 1 pmol/mL e $0,1 \text{ pmol/mL}$. O Iloprost ($0.1 \mu\text{M}$) e SNP ($3 \mu\text{M}$) foram utilizados como controles positivos para a quantificação do AMPc e GMPc, respectivamente.

3.4 Mensuração da mobilização de Ca^{2+} em plaquetas

A mensuração dos ensaios de Ca^{2+} intracelular foi realizada de acordo com estudos prévios (Donato et al., 1996). O PRP foi incubado com Fura 2 AM (1 μM) por 30 min à temperatura ambiente e isento de luz. Após a incubação foram adicionados tampão de lavagem (140 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 12 mM citrato tri-sódio, 10 mM glicose, 12.5 mM sacarose, pH 6.0) na proporção de 5 (PRP) para 7 (tampão) e centrifugou-se (800 g por 12 min). O pellet foi cuidadosamente ressuspendido em solução de Krebs e o número de plaquetas ajustado para 1.5×10^8 plaquetast/mL. As alíquotas de plaquetas contendo 300 μL foram incubadas com Mirabegron (ou DMSO). As amostras foram analisadas utilizando Fluorímetro (Synergy™ H1 Hybrid Reader, Biotek, USA). A concentração de Ca^{2+} externa foi ajustada em 1 mM com CaCl_2 . Após o equilíbrio durante pelo menos 3 minutos, a trombina (0,1U/mL) foi adicionada à suspensão plaquetária. Para cada experimento, inicialmente, uma alíquota (300 μL) foi destinada para a calibração da concentração de Ca^{2+} , adicionando-se triton-X (0,1 %) e Ca^{2+} (CaCl_2 1 mM) para se obter o valor de F_{max} . Em seguida, na mesma alíquota, foram adicionados EGTA (10 mM) e trizma (20 mM), obtendo-se assim o valor de F_{min} .

A fluorescência foi monitorada continuamente com monocromator ajustado em 505 nm de emissão e 340 ou 380 nm de excitação. Os níveis de concentração de Ca^{2+} intracelular foi determinado pela aplicação da equação (Pollock et al., 1986): $(\text{Ca}^{2+})_i = [K_d \times (F - F_{\text{min}})] / (F_{\text{max}} - F)$, onde $K_d = 224$, é a constante de dissociação do marcador fluorescente (FURA 2- AM); F é a fluorescência da amostra, F_{min} é a fluorescência mínima e F_{max} é a fluorescência máxima. Para estimar a concentração dos estoques de Ca^{2+} plaquetário, foram adicionados o quelante de Ca^{2+} , EGTA (10 μM) às alíquotas (300 μL) da suspensão plaquetária, permitindo-se estabilização por 1 minuto. Após a incubação com Mirabegron, na presença ou na ausência de ODQ, L-NAME e SQ, as plaquetas foram estimuladas com Trombina, obtendo-se valores de fluorescência pós-estímulos de mobilização interna de Ca^{2+} . O influxo total de Ca^{2+} foi estimado em nM, utilizando-se 300 μL da suspensão plaquetária. Após 1 minuto de incubação com Ca^{2+} (CaCl_2 1 mM), as plaquetas foram novamente incubadas com mirabegron e então estimuladas com trombina, obtendo-se valores de fluorescência

pós estímulo de mobilização total (influxo externo + mobilização dos estoques internos de Ca^{2+}).

3.5. Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ Erro Padrão da Média (E.P.M.) e n indica o número de indivíduos humanos. A análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey foi realizada. O teste t de Student's de duas caudas para experimentos pareados ou não pareados foi utilizado quando apropriado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito do mirabegron na agregação plaquetária

Primeiramente avaliamos o efeito do mirabegron (10 - 300 μ M) frente à agregação induzida por dois agonistas plaquetários, a trombina (0.1 U/mL) e o colágeno (2 μ g/mL). Como observado na Figura 4A, o mirabegron (10 - 300 μ M) inibiu significativamente em 22, 37 e 54 % nas concentrações de 30, 100 e 300 μ M a agregação induzida pela trombina. Em relação ao efeito do mirabegron na agregação induzida pelo colágeno, observamos uma redução de, aproximadamente, 48 % na concentração de 100 μ M, enquanto que na concentração de 300 μ M este efeito foi abolido (Figura 4B).

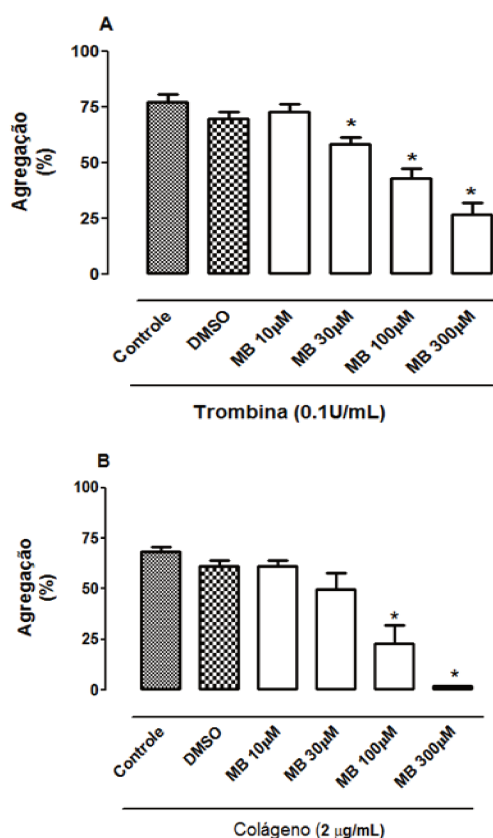
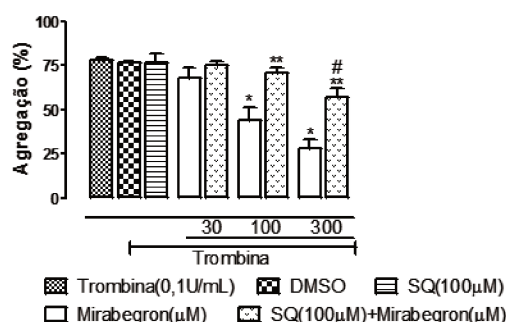


Figura 4. Efeito do agonista Beta3 adrenérgico, mirabegron (MB) na agregação plaquetária induzida pelos agonistas trombina(A) ou colágeno(B) A suspensão de plaquetas ($1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com o mirabegron (10 – 300 μ M) por 3 minutos. Em seguida, as plaquetas foram estimuladas com trombina (0,1 U/mL, N=11) ou colágeno (2 μ g/mL, N=5). Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M, N=número de voluntários. *P < 0,05 comparado com o controle (trombina ou colágeno).

4.2 Efeito dos bloqueadores dos receptores beta-adrenérgicos e da adenilato ciclase

Uma vez que observamos que o mirabegron inibiu a agregação plaquetária induzida pela trombina ou colágeno, o próximo passo foi avaliar as vias envolvidas nesta inibição. É sabido que a ativação da via beta-adrenérgica leva ao aumento dos níveis intracelulares de AMPc pela ativação da adenilato ciclase (AC), a qual converte a adenosina trifosfato em AMPc. Sendo assim, nesta etapa usamos o antagonista mais seletivo para o receptor beta 3, L 748,337 (1 μ M) e o inibidor da AC, SQ 22,536 (100 μ M). Podemos observar que o L 748,337 (Figura 5A, Figura 6) e o SQ 22,536 (Figura 5B, Figura 6) reverteram o efeito inibitório do mirabegron para os mesmos níveis do controle. Além disso, em todas as concentrações estudadas observamos um aumento significativo nos níveis intracelulares do AMPc (Figura 7), mostrando assim que em plaquetas a ativação do receptor beta-3 aumenta os níveis de AMPc pela ativação da adenilato ciclase.

A



B

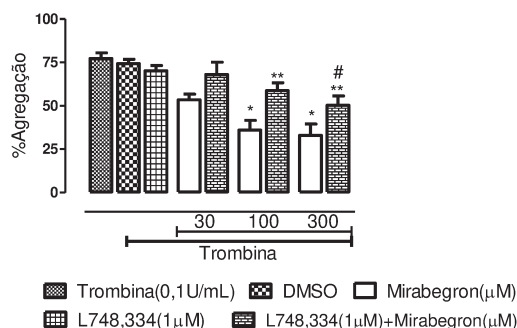


Figura 5. Efeito do inibidor da adenilato ciclase (A) e do antagonista mais seletivo para o receptor Beta3(B) em plaquetas humanas A suspensão plaquetária ($1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com o mirabegron (MB, 30 – 300 μ M) por 3 min, na presença ou na ausência do inibidor/antagonistas. Em seguida, as plaquetas foram estimuladas com trombina (0,1 U/mL). Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. (n=9). #p<0,05 em comparação ao controle. *P<0.05 em comparação ao mirabegron incubado sozinho.

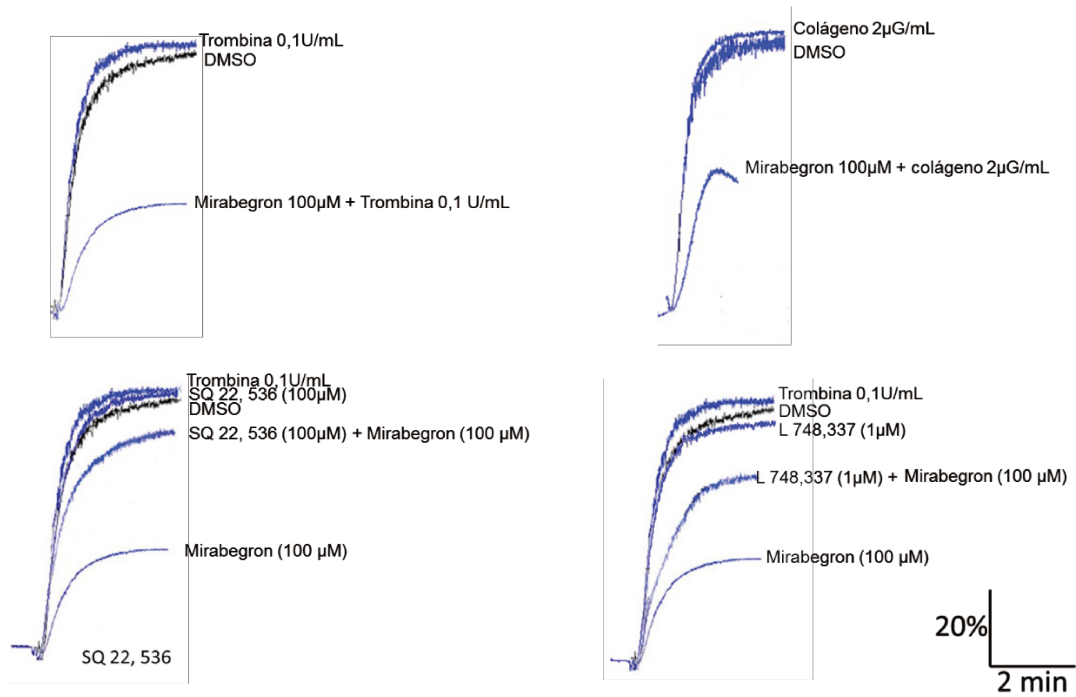


Figura 6. Traçados representativos mostrando a inibição do mirabegron em plaquetas ativadas com trombina ou colágeno (superiores) e a reversão deste efeito causada pelo L 748,337 e SG 22,536 (inferiores)

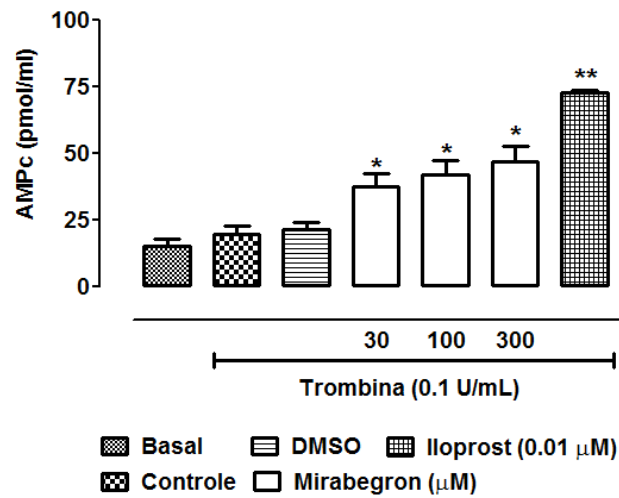


Figura 7. Efeitos do mirabegron na produção de AMPc em plaquetas humanas isoladas. As plaquetas isoladas (1.5×10^8 células/mL) foram pré-incubadas com mirabegron (30 - 300 μ M), estimuladas em seguida com 0.1 U/mL de trombina. Os dados foram mensurados como a média de valores $\pm$ E.P.M. ($n=5-6$ indivíduos). * $P < 0.05$ comparado com valores controles. ** $P < 0.001$ comparado com valores controles. O Iloprost (1 μ M) foi utilizado como controle positivo.

Uma vez que trabalho recente mostrou que o mirabegron ativou o receptor beta-1 em átrio isolado de humano, levando à maior força de contração,⁴³ avaliamos se os antagonistas beta-1 e beta-2 mais seletivos atenolol e ICI 118,551, respectivamente poderiam interferir no efeito do mirabegron em plaquetas. Entretanto, nenhum dos antagonistas reverteu o efeito inibitório do mirabegron (100 μ M) (Figura 8), confirmando o papel inibitório do subtipo beta-3 em plaquetas.

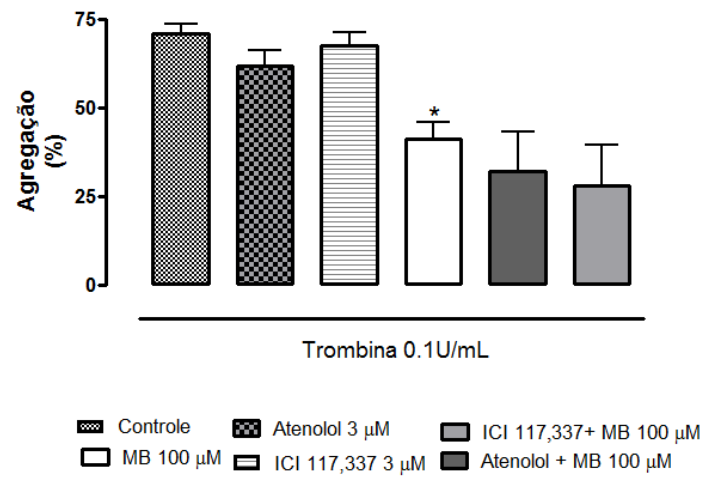


Figura 8. Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores beta1 e beta2- seletivos em plaquetas humanas. A suspensão plaquetária ($1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com o mirabegron (MB, 30 – 300 µM) por 3 min, na presença ou na ausência dos antagonistas. Em seguida, as plaquetas foram estimuladas com trombina (0,1 U/mL). Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. (n=9). * $p < 0,05$ comparado com os controles.

4.3 Efeito do mirabegron na mobilização intracelular de cálcio

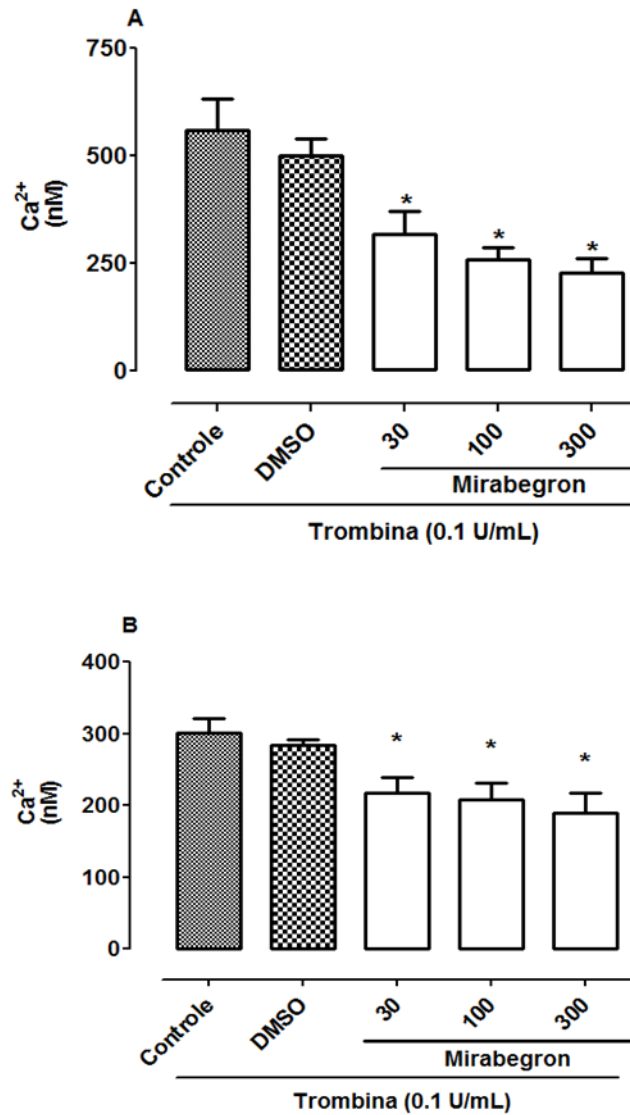


Figura 9. Efeitos do mirabegron nos níveis de Cálcio total (A) e intracelular (B). As plaquetas isoladas (1.5×10^8 céls/mL) foram pré-incubadas com MB (30 - 300 μ M), tratadas em seguida com 0.1 U/mL de trombina para estimular agregação plaquetária. Os dados foram calculados como a média dos valores $\pm$ E.P.M. (n= 6-8 indivíduos). * $P < 0.05$ comparado com valores controles.

4.4 Efeito do mirabegron na liberação de tromboxano B₂

Uma vez que substâncias presentes nos grânulos densos como ATP e ADP, cálcio, magnésio, serotonina bem como a liberação de TXA₂, oriundo da atividade da COX1, aumentam a agregação plaquetária e como o mirabegron reduziu este efeito, nesta etapa procuramos avaliar o efeito no mirabegron na liberação de ATP e TXB₂, o metabólito inativo do TXA₂. Um dos problemas que encontramos nos ensaios do ATP foi que em todos os voluntários testados o veículo DMSO (0,05%) aboliu a liberação de ATP (dados não mostrados). Sendo assim, não foi possível avaliar o efeito do mirabegron neste ensaio. Por sua vez, na presença de mirabegron (100 µM) observamos uma redução de, aproximadamente, 75 % na concentração de TXB₂ em comparação às plaquetas estimuladas com trombina. (Figura 10).

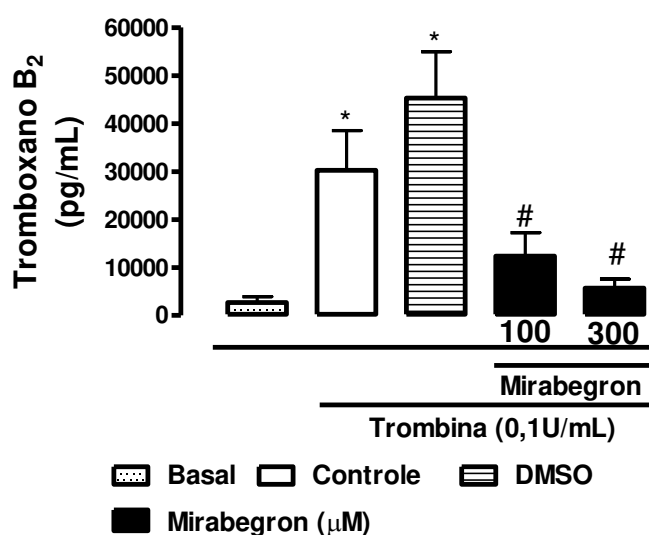


Figura 10. Efeitos do mirabegron nos níveis de Tromboxano B₂ em plaquetas isoladas de humanos.

As plaquetas isoladas (1.5×10^8 céls/mL) foram pré-incubadas com MB (100 e 300µM), tratadas em seguida com 0.1 U/mL de trombina para estimular a agregação plaquetária. Os dados foram calculados pelos valores médios $\pm$ SEM (n=4-5 indivíduos). *P < 0.05 comparados com valores controles.

4.5 Efeito dos inibidores na sintase de óxido nítrico e da guanilato ciclase solúvel na inibição induzida pelo mirabegron

No sistema cardiovascular alguns estudos mostraram que a ativação do receptor beta-3 adrenérgico em cardiomiócito e em musculatura lisa vascular ⁴³, levou à maior liberação de NO, por um mecanismo dependente da ativação da via da PI3K/Akt ⁴³. Para testar esta hipótese em plaquetas, previamente à incubação com mirabegron incubamos os inibidores da sintase de óxido nítrico (L-NAME, Figura 11A) e da guanilato ciclase solúvel (ODQ, Figura 11B) e avaliamos a agregação plaquetária. Interessante notar que estes inibidores reverteram a inibição induzida pelo mirabegron, sugerindo neste momento que em plaquetas a ativação beta-3 adrenérgica pode levar à maiores aumentos dos níveis de GMPc. Sobre a inibição induzida pelo L-NAME, fica mais difícil explicar uma vez que trabalhos mostraram que não existe NOS plaquetária, ou seja, o NO que inibe a plaqueta é oriundo da camada endotelial ³². Posteriormente, quantificamos os níveis intracelulares de GMPc na presença de diferentes concentrações de mirabegron (Figura 12) e nenhum aumento foi observado. Apesar de claro os efeitos do L-NAME e do ODQ na inibição plaquetária induzida pelo mirabegron, não podemos afirmar que a ativação beta-3 leva à maiores níveis de GMPc. O doador de NO, nitroprussitato de sódio foi utilizado como controle positivo e promoveu um aumento significativo nos níveis intracelulares de GMPc (de 4.5 para 9 pmol/mL).

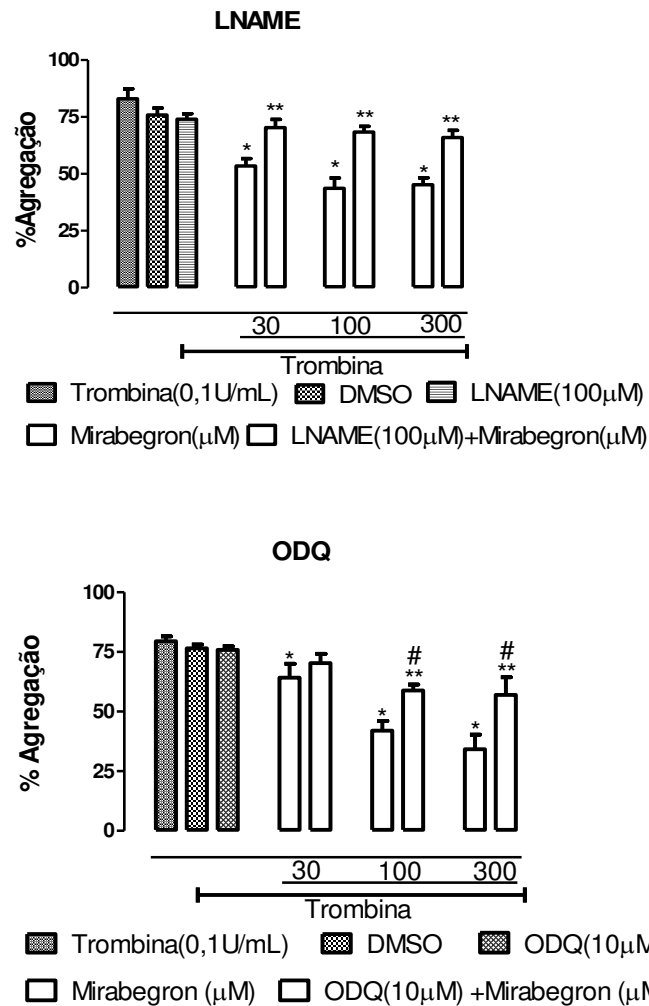


Figura 11. Efeito dos inibidores da sintase de óxido nítrico e da guanilato ciclase solúvel em plaquetas humanas estimuladas com trombina e incubadas com mirabegron. *Efeito dos inibidores da sintase de óxido nítrico (L-NAME) e da guanilato ciclase solúvel (ODQ) em plaquetas humanas estimuladas com trombina e incubadas com mirabegron.* A suspensão plaquetária ($1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com o mirabegron (30 – 300 µM) por 3 minutos, na presença ou ausência do L NAME (100 µM) ou ODQ (10 µM) previamente incubado por 3 minutos. Em seguida, as plaquetas foram estimuladas com trombina (0,1 U/mL). Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. (n=6). #p<0,05 comparado com o controle. p<0,05 em comparação às plaquetas incubadas somente com mirabegron.

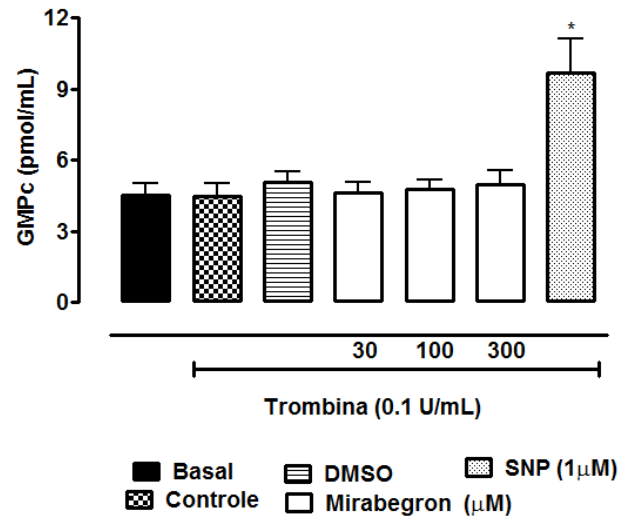


Figura 12. Efeitos do mirabegron na produção de GMPc em plaquetas humanas isoladas. As plaquetas isoladas (1.5×10^8 células/mL) foram pré-incubadas com mirabegron (30 - 300 μ M), estimuladas em seguida com 0.1 U/mL de trombina. Os dados foram mensurados como a média de valores $\pm$ E.P.M. (n=5-6 indivíduos). O SNP (1 μ M) foi utilizado como controle positivo. * $P < 0.05$ comparado com valores controles.

5. DISCUSSÃO

Nossos achados mostraram que o mirabegron inibiu a agregação plaquetária induzida pelos agonistas trombina e colágeno em plaquetas isoladas de humano acompanhado de aumento e diminuição dos níveis intracelulares de AMPc e Ca^{2+} , respectivamente.

Um dos grandes desafios em estudar os receptores beta3-adrenérgicos é em relação às limitações das ferramentas farmacológicas disponíveis comercialmente. Por exemplo, o agonista (BRL 37,344), o antagonista (SR 59,230), anticorpos e radioligantes comumente citados nos trabalhos como “altamente” seletivos interagem com regiões comuns presentes nos subtipos beta-1 e beta-2, gerando assim resultados falsos-positivos ⁴⁵. Dentre os antagonistas beta-3 disponíveis foi visto que o L 748,337 e L 748,328 constituem as melhores ferramentas farmacológicas mais adequadas para se estudar o subtipo beta-3. Como dito na parte introdutória, em células de ovário de hamster chinês que superexpressam os receptores beta-1, beta-2 e beta-3, os antagonistas L 748,328 e L 748,337 apresentaram uma afinidade maior para o receptor beta-3 (3.7 ± 1.4 e 4 ± 0.4 nM, respectivamente) quando comparado aos receptores beta-1 (467 ± 89 e 390 ± 154 nM) e beta-2 (99 ± 43 nM e 204 ± 75 nM) ⁴⁶. É sabido que, geralmente, agonistas e antagonistas são mais potentes e eficazes com receptores recombinantes do que com receptores naturalmente expressos em células e tecidos, devido a diferenças na expressão e/ou no acoplamento e, por isso, normalmente, concentrações mais elevadas são utilizadas para protocolos com receptores nativos.

Nossos passos iniciais se concentraram em i) avaliar se o mirabegron possuía algum efeito em plasma rico em plaqueta (PRP) e em plaquetas isoladas e ii) caracterizar se o antagonista beta-3 adrenérgico interferia neste efeito. Em PRP vimos um efeito inibitório do mirabegron discreto, porém, o mesmo não ocorreu em plaquetas isoladas, uma vez que observamos uma inibição concentração-dependente após ativação com trombina e colágeno, sendo este efeito revertido na presença do antagonista L 748,337, mas não do atenolol ou ICI 118,551. Baseado nestes achados, todos os protocolos experimentais foram realizados em plaquetas isoladas. Uma das possíveis explicações pela baixa eficácia do mirabegron em PRP é devido ao fato deste medicamento ter uma alta ligação às proteínas plasmáticas (>90%) ⁴⁷. Uma vez

que nossos ensaios de agregação duram por volta de 6 minutos, provavelmente, o equilíbrio entre a fração de mirabegron ligada e livre não foi atingido. Poderíamos ter expandindo o tempo dos experimentos envolvendo agregação com PRP, porém, a viabilidade das plaquetas ficou prejudicada.

Como mostrado anteriormente, a ativação dos receptores beta-2, mas não do subtipo beta-1, inibe a agregação plaquetária ²⁹. Com a introdução do mirabegron em 2012, o papel dos receptores beta3 no sistema cardiovascular e nas células sanguíneas poderá ser melhor explorada.

Uma vez caracterizado o efeito antiplaquetário do mirabegron, o próximo passo foi o de avaliar os níveis intracelulares dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc. O racional de se quantificar os dois mediadores foi o fato do agonista beta3 estar vinculado à proteína Gs e Gi/o, levando ao aumento do AMPc e NO, respectivamente. Como esperado, o mirabegron aumentou os níveis intracelulares de AMPc ⁵⁰. Nossos resultados mostraram que o inibidor da NOS (L-NAME) reverteu o efeito inibitório do mirabegron sugerindo que, assim como observado em cardiomiócitos ⁴³ e na musculatura lisa vascular ⁴³, a liberação de NO aumenta os níveis intraplaquetários de GMPc. Em relação a este resultado temos que olhar com cautela porque os estudos são contrastantes quanto à expressão de NOS plaquetária, ou seja, alguns grupos propõem que a principal fonte de NO para inibir a atividade plaquetária é oriunda do endotélio vascular ⁴⁸ e não da plaqueta ⁴⁹. Posteriormente, utilizamos o inibidor da GCs, ODC e novamente o efeito inibitório do mirabegron foi revertido, sugerindo assim que o mirabegron eleva os níveis de GMPc. Porém, quando quantificamos os níveis intracelulares de GMPc não observamos nenhum aumento, o que fica difícil afirmar que o GMPc participa do efeito inibitório induzido pelo mirabegron.

A elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} é um evento primordial para promover o “shape change”, secreção de grânulos e ativação das integrinas ³. A trombina ativa os receptores PAR-1, PAR-3 e PAR-4 para produzir a agregação ⁵⁰. Após a ativação pela trombina haverá a clivagem do fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP₂) no segundo mensageiro inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ aumenta a concentração citosólica de Ca^{2+} pela liberação de mais Ca^{2+} dos estoques intracelulares e pela ativação da proteína quinase C (PKC) ³. No presente

estudo pudemos observar que o mirabegron reduziu os níveis intracelulares de Ca^{2+} em todas as concentrações estudadas em plaquetas ativadas por trombina.

Dentre os metabólitos do ácido araquidônico, sabe-se que o Tromboxano A2 é um potente indutor tanto da agregação como da secreção plaquetária ⁵¹, também devemos salientar que estudos realizados com indução de agregação plaquetária sob estímulo da trombina, demonstraram a interação da Trombina ao Tromboxano A2 no aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , shape change e a agregação plaquetária ⁵²; em nossos ensaios, analisando o principal metabólito inativo do Tromboxano A2, o Tromboxano B2, observamos que o Mirabegron reduziu significativamente a atividade do Tromboxano B2, sugerindo desta forma que o agonista B3, reduziu a atividade de ativação plaquetária.

Conclusão: Nossos achados mostraram que o mirabegron inibiu a agregação plaquetária pelo maior acúmulo de AMPc e menores níveis intracelulares de cálcio, sugerindo assim que agonistas dos receptores beta3-adrenérgicos têm efeito antiagregante. Entretanto, estudos clínicos precisam ser realizados para avaliar a eficácia do mirabegron como antiplaquetário em pacientes com eventos isquêmicos.

6. Referência bibliográfica

1. Mustard, J. F., Packham, M. A. Platelet function and myocardial infarction. *Circulation* 40 (Suppl.4): 20-30 (1969).
2. Jorgenson, L., et al. The role of platelet embolism from crumbling thrombi and platelet aggregates arising in flowing blood, thrombosis. *National Academy of Sciences*, 506-33 (1969).
3. Varga-Szabo, D., Braun, A. & Nieswandt, B. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost.*; 7(7):1057-66 (2009).
4. Ferroni, P., Vazzana, N., Riondino, S., Cuccurullo, C., Guadagni, F. & Davi, G. Platelet function in health and disease: from molecular mechanisms, redox considerations to novel therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, Comprehensive invited review vol 00, n 00 (2012).
5. Broos, K., Feys, H.B., De Meyer, S.F., Vanhoorelbeke, K. & Deckmyn, H. Platelets at work in primary hemostasis. Review. *Blood Reviews*, v25, Issue 4, 155-167, july (2011).
6. Acikel, S. & Akdemir, R. The relationship between inflammation, platelet activation and antiplatelet resistance. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 9(5): 364-81 (2010).
7. Blockmans, D., Deckmyn, H. & Vermylen, J. Platelet activation. *Blood Rev*. 9(3): 143-56 (1995).
8. Rendu, F. & Brohard- Bohn, B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 12(5): 261-73 (2001).
9. Shattil, S. J., Ginsberg, M. H. & Brugge, J. S. Adhesive signaling in platelets. *Curr Opin Cell Biol*. 6(5): 695-704 (1994).

10. Clark, E. A. & Brugge, J. S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*. 268 (5208): 233-9 (1995).
11. Bodie, S. L., Ford, I., Greaves, M. & Nixon, G.F. Thrombin – induced activation of RhoA in platelet shape change. *Biochem Biophys Res Commun*. 287(1): 71-6 (2001).
12. Alberio, L. & Dale, G. L. Review article: platelet-collagen interactions: membrane receptors and intracellular signalling pathways. *European Journal of Clinical Investigation*. 29 (12):1066-76 (1999).
13. Savage, B., Shattil, S. J. & Ruggeri, Z. M. Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib- von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 267(16): 11300-6 (1992).
14. Abrams, C. S., Ellison, N., Budzynski, A. Z. & Shattil, S. J. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood*: 75 (1):128-38 (1990).
15. Levy-Toledano, S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a 'hierarchy'? *Haemostasis*. 29(1):4-15 (1999).
16. Michelson, A.D. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. Review. Feb, 9 (2):154-69 (2010).
17. Lessiani, G., et al. Inflammation, oxidative stress and platelet activation in aspirin-treated critical limb ischaemia: beneficial effects of iloprost. *Thromb Haemost* ;105 (2):321-8 (2011).
18. Smolenski, A., et al. Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem*. 273 (32):20029-35 (1998).

19. Procter, N.E., et al. Platelet hyperaggregability in patients with atrial fibrillation. Evidence of a background proinflammatory milieu. *Herz*. Feb, 41 (1):57-62 (2016).
20. Chirkov, Y.Y., Holmes, A.S., Martelli, J.D. & Horowitz, J.D. Effect of perindopril on platelet nitric oxide resistance in patients with chronic heart failure secondary to ischemic left ventricular dysfunction. *Am J Cardiol*. Jun 1; 93 (11):1438-40, A10 (2004).
21. Queen, L. R., Ji,Y., Goubareva, I. & Ferro, A. Nitric oxide generation mediated by β -adrenoceptors is impaired in platelets from patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 46:1474–82 (2003).
22. Hu,L., et al. Platelets Express Activated P2Y₁₂ Receptor in Patients With Diabetes Mellitus. *Circulation*. Aug 29;136(9):817-33 (2017).
23. Calmasini, F.B., et al. Long-term treatment with the beta-3 adrenoceptor agonist, mirabegron ameliorates detrusor overactivity and restores cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels in obese mice. *Neurourol Urodynam* 9999:1–8 (2016).
24. Anfossi, G., et al. Impaired synthesis and action of antiaggregating cyclic nucleotides in platelets from obese subjects: possible role in platelet hyperactivation in obesity. *Eur J Clin Invest*. Jul; 34(7):482-9 (2004).
25. Procter, N.E., et al. New Developments in Platelet Cyclic Nucleotide Signalling: Therapeutic Implications. *Cardiovasc Drugs Ther*. Oct; 30(5):505-13 (2016).
26. Marketou, M.E., et al. Blockade of platelet α_2B -adrenergic receptors: a novel antiaggregant mechanism. *Int J Cardiol*. Oct 3; 168(3):2561-6 (2013).

27. Chen, S., et al. Sympathetic stimulation facilitates thrombopoiesis by promoting megakaryocyte adhesion, migration, and proplatelet formation. *Blood*, v127, (8) 1024-35 february (2016).
28. Winther, K., Klysner, R., Geisler, A. & Andersen, P. H. Characterization of human platelet beta- adrenoceptors. *Thromb Res.* Dec 15; 40 (6): 757-67 (1985).
29. Queen, R. L. & Xu, B.; Horinouchi, K.; Fisher, I.; Ferro, A. β 2-Adrenoceptors Activate Nitric Oxide Synthase in Human Platelets. *Circ Res* 87: 39-44 (2000).
30. Otsuki, H.; Kosaka, T.; Nakamura, K.; Mishima, J.; Kuwahara, Y. & Tsukamoto, T. β 3-Adrenoceptor agonist mirabegron is effective for overactive bladder that is unresponsive to antimuscarinic treatment or is related to benign prostatic hyperplasia in men. *Int Urol Nephrol*, Feb; 45(1):53-60 (2012).
31. Ursino, M. G., Vasina, V., Raschi, E., Crema, F. & De Ponti, F. The β 3-Adrenoceptor as a therapeutic target: current perspectives, Review, *Pharmacological Research* 59, 221-34 (2009).
32. Niu, X., et al. β 3-Adrenoreceptor Stimulation Protects against Myocardial Infarction Injury via eNOS and nNOS Activation. *PLoS ONE* 9 (6): e98713 (2014).
33. Queen, L.R. & Ferro, A. β – adrenergic receptors and nitric oxide generation in the cardiovascular system. Review. *Cell Mol Life Sci.* 63, 1070 – 83 (2006).
34. Cirino, G., et al. Involvement of β 3 – adrenergic receptor activation via cyclic GMP – but not NO – dependent mechanisms in human corpus cavernosum function. *PNAS* vol 100, n9, april (2003).
35. Herschorn, S., et al. A phase III, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled, multicentre study to assess the efficacy and safety of the β_3 adrenoceptor agonist, mirabegron, in patients with symptoms of overactive

- bladder. *Urology*. Aug; 82(2):313-20. Erratum in: *Urology*. Dec;82 (6):1457 (2013).
36. Michel, M. C., Ochodnický, P., Homma, Y. & Igawa, Y. β - adrenoceptor agonist effects in experimental models of bladder dysfunction. *Pharmacology & Therapeutics* 131, 40-49 (2011).
 37. Takasu, T., et al. Effect of (R)-2-(2-Aminothiazol-4-yl)-4'-{2-[(2-hydroxy-2-phenylethyl)amino]ethyl} Acetanilide (YM178), a Novel Selective Beta3-Adrenoceptor Agonist, on Bladder Function. *JPET* 321:642–47 (2007).
 38. Andersson, K.E., Martin, N. & Nitti, V. Selective β_3 -adrenoceptor agonists for the treatment of overactive bladder. *J Urol*. Oct, 190(4):1173-80 (2013).
 39. Warren, K., Burden, H. & Abrams, P. Mirabegron in overactive bladder patients: efficacy review and update on drug safety. *Ther Adv Drug Saf*. Oct; 7(5):204-16. Epub 2016 Jul 19 (2016).
 40. Sharaf, A. & Hashim, H. Profile of mirabegron in the treatment of overactive bladder: place in therapy. *Drug Des Devel Ther*. Feb 20; 11:463-67 (2017).
 41. Cypess, A. M., et al. Activation of human brown adipose tissue by a beta 3 – adrenergic receptor agonist. *Cell Metab*; 21: 33-38 (2015).
 42. Mo, W., Michel, M.C., Lee, X.W., Kaumann, A.J. & Molenaar, P. The β_3 - adrenoceptor agonist mirabegron increases human atrial force through β_1 - adrenoceptors: an indirect mechanism? *Br J Pharmacol*. Aug; 174(16):2706-15 (2017).
 43. Balligand, J-L. β_3 - adrenoceptors in cardiovascular diseases: new roles for an “old” receptor. *Current Drug Delivery*, 10, 64-6 (2013).

44. Brixius, K., et al. Beta3-adrenergic eNOS stimulation in left ventricular murine myocardium. *Can J Physiol Pharmacol.* Oct; 84(10):1051-60 (2006).
45. Vrydag, W. & Michel, M. C. Tools to study beta3-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* Feb; 374(5-6):385-98 (2007).
46. Candelore, M.R., Deng, L., Tota, L., Guan, X.-M., Amend, A. & Liu, Y. Potent and selective human b3-adrenergic receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 649–55 (1999).
47. Sacco, E. & Bientinesi, R. Mirabegron: a review of recent data and its prospects in the management of overactive bladder. *Ther Adv Urol.* Dec; 4(6):315-24 (2012).
48. Smolenski A. Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. *J Thromb Haemost*,10: 167–76 (2012).
49. Böhmer, A., Gambaryan, S. & Tsikas, D. Human blood platelets lack nitric oxide synthase activity. *Platelets*; 26(6):583-8 (2015).
50. Offermanns, S. Activation of Platelet Function Through G Protein–Coupled Receptors. *Reviews.Circ Res.*99:1293-1304 (2006).
51. Pollock,W.K., Armstrong, R.,A., Brydon, L.J., Jones, R. L. & MacIntyre, D. E. Thromboxane- induced phosphatidate formation in human platelets. *Biochem. J.* 219 (3):833-42 (1984).
52. Yun,J.C.H., Öhman, K.P., Jr Gill, J.R. & Keiser, H. Effects of prostaglandins, cAMP and changes in cytosolic calcium on platelet aggregation induced by a thromboxane A2 mimic(U46619). *Can.J. Physiol. Pharmacol* vol 69; 599-604 (1991).

Anexo 1: Parecer consubstanciado do CEP

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - UNICAMP (CAMPUS CAMPINAS) 										
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP										
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: Caracterização farmacológica do agonista beta3-adrenérgico, mirabegron em plaquetas humanas isoladas de voluntários saudáveis. Pesquisador: EVANDRO MARCOS DENONI ALEXANDRE Área Temática: Versão: 2 CAAE: 34390614.0.0000.5404 Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP Patrocinador Principal: Financiamento Próprio DADOS DO PARECER Número do Parecer: 835.659 Data da Relatoria: 13/10/2014 Apresentação do Projeto: O projeto encontra-se muito bem redigido e deixa clara a necessidade de se usar sujeitos humanos como doadores de plaquetas para a realização do desenho experimental. Objetivo da Pesquisa: Avaliar se o agonista beta3 adrenérgico mirabegron modifica in vitro a adesão e agregação plaquetária de plaquetas obtidas a partir de doadores saudáveis. Avaliar a participação da via NO/GCs nestes eventos. Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os riscos são mínimos e compatíveis com a punção venosa de 60 mL de sangue. Não há exposição a nenhum agente químico ou biológico. Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Adequada do ponto de vista do desenho experimental e do uso de sujeitos como voluntários. Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O TCLE foi adequado de acordo com as sugestões do parecer.										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td colspan="2">Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126</td></tr><tr><td>Bairro: Barão Geraldo</td><td>CEP: 13.083-887</td></tr><tr><td>UF: SP</td><td>Município: CAMPINAS</td></tr><tr><td>Telefone: (19)3521-8936</td><td>Fax: (19)3521-7187</td></tr><tr><td colspan="2">E-mail: cep@fcm.unicamp.br</td></tr></table>	Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126		Bairro: Barão Geraldo	CEP: 13.083-887	UF: SP	Município: CAMPINAS	Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fcm.unicamp.br	
Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126										
Bairro: Barão Geraldo	CEP: 13.083-887									
UF: SP	Município: CAMPINAS									
Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187									
E-mail: cep@fcm.unicamp.br										

**FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)**



Continuação do Parecer: 835.659

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pode ser aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a um evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 835.659

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

CAMPINAS, 17 de Outubro de 2014

Assinado por:

Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Anexo 2:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

EFEITO DO MIRABEGRON, INIBIDOR ADRENÉRGICO SELETIVO β_3 , NA FUNÇÃO PLAQUETÁRIA HUMANA.

Identificação do voluntário:

- Nome: _____
- Idade: _____
- Sexo: _____
- RG: _____

O abaixo assinado,

_____, RG _____,

Declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade da coordenadora deste, Dr^a Fabíola Iglesias Mônica Taufic, do departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. O abaixo assinado está ciente que

1. O objetivo do estudo é investigar os efeitos induzidos pelo Mirabegron na agregação e na adesão plaquetária, bem como o mecanismo de ação envolvido nestas respostas.
2. A participação neste estudo é voluntária e a recusa não terá qualquer prejuízo.
3. A participação neste estudo não tem nenhum benefício terapêutico ao participante.
4. Será coletado da veia do braço, 60mL de sangue. A coleta será feita por profissional treinado e todo material utilizado será estéril e descartável. Os riscos são mínimos, mas caso haja algum problema, será atendido pelo médico responsável e encaminhado ao serviço de Pronto Socorro da Unidade Hospitalar da Unicamp, se necessário.
5. As informações e os resultados obtidos no decorrer do estudo serão secretos, zelando-se pela privacidade do voluntário. Seu nome, ou do seu protocolo de pesquisa, ou qualquer identificação pessoal, não serão utilizados nesse estudo e, portanto não será incluído em qualquer resultado ou publicação resultante deste.
6. Será garantida a cada participante uma cópia do TCLE.

Nome e assinatura do Participante

Nome e assinatura do Responsável

Maiores esclarecimentos sobre este estudo poderão ser obtidos com:

Evandro M. D. Alexandre ou Dr^a Fabíola I. M. Taufic

Departamento de Farmacologia, FCM; UNICAMP

13084-971 – Campinas (SP). Fone: (19) 3521-9557