



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

CAMILA BITENCOURT MENDES SILVERIO

**ATIVAÇÃO DA GUANILIL CICLASE SOLÚVEL ASSOCIADA À INIBIÇÃO DA
PROTEÍNA DE RESISTÊNCIA A MULTIDROGAS-4 (MRP4) COMO ESTRATÉGIA
ANTIPLAQUETÁRIA EM HUMANOS**

CAMPINAS

2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

CAMILA BITENCOURT MENDES SILVERIO

**ATIVAÇÃO DA GUANILIL CICLASE SOLÚVEL ASSOCIADA À INIBIÇÃO DA
PROTEÍNA DE RESISTÊNCIA A MULTIDROGAS-4 (MRP4) COMO ESTRATÉGIA
ANTIPLAQUETÁRIA EM HUMANOS**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutora
em Farmacologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Antunes

COORIENTADORA: Profa. Dra. Fabíola Taufic Mónica Iglesias

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR CAMILA BITENCOURT MENDES
SILVERIO, E ORIENTADA PELO PROF. DR. EDSON
ANTUNES E COORIENTADA PELA PROFA. DRA. FABÍOLA
TAUFIC MÓNICA IGLESIAS.

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si39a Silvério, Camila Bitencourt Mendes, 1984-
Ativação da Guanilil Ciclase Solúvel associada à inibição da proteína de resistência a multidrogas-4 (MRP4) como estratégia antiplaquetária em humanos / Camila Bitencourt Mendes Silvério. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Edson Antunes.

Coorientador: Fabíola Taufic Mônica Iglesias.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Agregação plaquetária. 2. Nucleotídeos cíclicos. 3. MRP4. 4. MK 571. 5. BAY 60-2770. I. Antunes, Edson, 1960-. II. Mônica, Fabíola Zakia Taufic, 1980-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Activation of Soluble Guanylyl Cyclase with inhibition of multidrug resistance protein inhibitor-4 (MRP4) as a new antiplatelet therapy

Palavras-chave em inglês:

Platelet aggregation

Nucleotides, Cyclic

MRP4

MK 571

BAY 60-2770

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutora em Farmacologia

Banca examinadora:

Edson Antunes [Orientador]

Alessandra Gambero

Claudio Chrysostomo Werneck

Sisi Marcondes Paschoal

Gerson Jhonatan Rodrigues

Data de defesa: 08-05-2018

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

CAMILA BITENCOURT MENDES SILVERIO

ORIENTADOR: EDSON ANTUNES

COORDINADORA: FÁBIO TAUFIC MÓNICA IGLESIAS

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. EDSON ANTUNES**
 - 2. PROFA. DRA. ALESSANDRA GAMBERO**
 - 3. PROF. DR. CLAUDIO CHRYSOSTOMO WERNECK**
 - 4. PROFA. DRA. SISI MARCONDES PASCHOAL**
 - 5. PROF. DR. GERSON JHONATAN RODRIGUES**
-

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 da aluna.

Data: 08/05/2018

Ao meu amigo e companheiro Luciano, extensivo à minha família, seja

ela por sangue ou não.

Agradeço ao Criador de tudo, meu Deus, Pai e Salvador.

Obrigada pela vida e pela graça de vivê-la inteiramente.

*Agradeço pelas muitas oportunidades e as difíceis decisões que me
fazem crescer cada dia.*

*Ao Prof. Dr. Edson, pela oportunidade e confiança, exemplo de
dedicação ao ensino e à pesquisa.*

*Agradeço pelas muitas conversas, não tantas como gostaria, aprendi
com todas elas, sejam sobre a pesquisa ou sobre a vida.*

*Agradeço pelo carinho e sabedoria. Minha admiração, respeito e
gratidão.*

À Profa. Dra. Fabíola, pela confiança e carinho.

*Agradeço pelas muitas conversas, e em muitas delas pelo incentivo à
pesquisa, caminho sempre difícil, mas recompensador.*

Levarei comigo seu exemplo profissional.

Minha admiração, respeito e gratidão.

*Ao Luciano, minha metade, meu marido, meu amigo, meu amor,
exemplo de cuidado, carinho e paciência. Obrigada por compartilhar sua vida.*

A minha mãe e pai, exemplos de amor, força e fé.

*Aos meus irmãos, Andréa, Patrícia, Priscila, Mateus, Fran, Tato, e
Samira pela cumplicidade. O meu amor e eterna gratidão.*

Aos meus sobrinhos: Pedro, Felipe, Sara, João Vitor, Davi, João Marcos,

Valentina e Alice. Amo estar com todos vocês.

*A minha família “presente” Seila, Gisele e Evandro, obrigada pelo amor
e consideração.*

Aos meus pais “adotivos” Mirian e Sebastião. Minha admiração e amor.

*Aos meus queridos familiares, obrigada por contribuir para o meu
crescimento. Meu respeito e gratidão.*

*Aos meus queridos amigos da Farmacologia da UNICAMP, pela
amizade, companheirismo e boa convivência. Muito obrigada a todos.*

*Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico) pelo apoio financeiro.*

*A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste
trabalho.*

Resumo

É bem estabelecido que a ativação da via de sinalização óxido nítrico (NO) – guanilil ciclase solúvel (GCs) – GMP cíclico (GMPc) resulta em inibição plaquetária. Proteínas de resistência a multidrogas (MRP), incluindo MRP-4, estão presentes na membrana plasmática e nos grânulos densos plaquetários, sendo capazes de transportar ativamente nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc) do interior para o exterior celular. O efluxo de nucleotídeos cíclicos pelos MRPs supostamente contribui para a manutenção dos níveis basais dos mesmos em condições fisiológicas. Nesse estudo levantamos a hipótese que a associação do BAY 60-2770 (potente ativador da GCs) com o MK 571 (potente inibidor do MRP4) resulta em inibição sinérgica da ativação plaquetária, constituindo-se, portanto em nova estratégia farmacológica antiplaquetária. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar a agregação plaquetária induzida pelo colágeno ou trombina e marcadores de ativação plaquetária na presença de BAY 60-2770 e MK 571. Para tanto, utilizamos suspensões de plaquetas humanas de voluntários sadios ($1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL). As plaquetas foram incubadas com MK 571 (10 μ M) ou veículo (0,5% de DMSO) por 3 min, após os quais adicionaram-se BAY 60-2770 (0,001 a 10 μ M) por mais 3 min. Em seguida, as plaquetas foram ativadas com colágeno (2 μ g/mL) ou trombina (0,1 U/mL). Realizamos ensaios de agregação plaquetária, mobilização de Ca^{2+} e liberação de ATP. Quantificamos os níveis de GMPc, AMPc e tromboxano B_2 (TXB₂) por meio de kits ELISA. Determinamos o grau de ativação da integrina plaquetária, $\alpha\text{IIb}\beta 3$, utilizando-se anticorpo específico, PAC-1. Ensaios de Western blotting para a quantificação protéica da VASP, AKT, ERK, JNK e P38 foram também realizados. A pré-incubação com MK 571, nas concentrações de 10 μ M, não interferiu de modo significativo na agregação plaquetária induzida por colágeno ou trombina. Por outro lado, na concentração de 30 μ M, o MK 571 inibiu significativamente a agregação plaquetária. Concentrações de 10 e 30 μ M de MK 571 também não interferiram na atividade da PDE5A. Para os próximos experimentos, selecionamos a concentração de 10 μ M de MK 571. BAY 60-2770 (0,001 - 10 μ M) produziu inibição significativa da agregação plaquetária induzida pelo colágeno ou trombina, bem como da liberação de ATP. Ambos os efeitos (agregação e liberação de ATP) foram marcadamente potencializados pela pré-incubação com MK 571 (10 μ M). Pré-incubação das plaquetas com probenecida (inibidor inespecífico de MRP) também potencializou os efeitos antiagregantes do

BAY 60-2770 em plaquetas ativadas com colágeno e trombina. A associação do MK 571 com BAY 60-2770 também resultou em níveis menores de TXB₂, particularmente na ativação plaquetária pela trombina. O BAY 60-2770 (0,001 – 10 µM) aumentou os níveis de GMPc, sendo tal efeito potencializado pelo MK 571, para ambos os agonistas plaquetários. O BAY 60-2770 aumentou significativamente a fosforilação do resíduo de Ser239 da VASP, sendo potencializada pelo MK 571. Os níveis de AMPc não foram alterados de modo significativo quer pelo MK 571 quer pelo BAY 60-2770, individualmente ou associados. O BAY 60-2770 (0,01 a 10 µM) reduziu os níveis de Ca²⁺ (níveis totais e intracelulares) os quais foram potencializados pela pré-incubação com MK 571. A ativação da integrina $\alpha IIb\beta 3$ pelo colágeno ou trombina foi inibida significativamente pelo BAY 60-2770, e da mesma forma o grau de inibição da mudança de conformação desta integrina foi maior quando na presença de MK 571. BAY 60-2770 individualmente não alterou a fosforilação das AKT, ERK, P38. A associação MK 571 e BAY 60-2770 inibiram somente a fosforilação da JNK nas maiores concentrações de BAY 60-2770 estudadas. Assim, nosso estudo mostra que a associação do MK 571 e BAY 60-2770 podem ter grande interesse terapêutico na prevenção de doenças aterotrombóticas associadas a complicações tromboembólicas.

Abstract

It is well established that the activation of the signaling pathway nitric oxide (NO) - soluble guanylyl cyclase (GCs) - cyclic GMP (cGMP) results in platelet inhibition. Multidrug resistance proteins (MRPs), including MRP-4, are present in the plasma membrane and in dense granules, being able to actively transport cyclic nucleotides (cAMP and cGMP) from the inside to the cell exterior. The efflux of cyclic nucleotides by MRPs supposedly contributes to the maintenance of their basal levels under physiological conditions. In this study, we hypothesized that the association of BAY 60-2770 (potent GC activator) with MK 571 (potent inhibitor of MRP4) results in synergistic inhibition of platelet activation, thus constituting a new antiplatelet pharmacological strategy. Thus, the objective of the present study was to investigate collagen or thrombin-induced platelet aggregation and platelet activation markers in the presence of BAY 60-2770 and MK 571. For this, we used human platelet suspensions from healthy volunteers (1.5×10^8 platelets/ml). Platelets were incubated with MK 571 (10 μ M) or vehicle (0.5% DMSO) for 3 min, after which BAY 60-2770 (0.001 to 10 μ M) was added for a further 3 min. The platelets were then activated with collagen (2 μ g/ml) or thrombin (0.1 U/ml). We performed platelet aggregation assays, Ca^{2+} mobilization and ATP release. We quantified the levels of cGMP, cAMP and thromboxaneB₂ (TXB₂) by ELISA kits. We determined the degree of activation of the platelet integrin, $\alpha\text{IIb}\beta 3$, using specific antibody, PAC-1. Western blotting assays for the protein quantification of VASP, AKT, ERK, JNK and P38 were also performed. Preincubation with MK 571, at concentrations of 10 μ M, did not significantly interfere with collagen or thrombin-induced platelet aggregation. On the other hand, at the concentration of 30 μ M, MK 571 produced significant inhibition of platelet aggregation. Concentrations of 10 and 30 μ M of MK 571 also did not interfere with the activity of PDE5A. For the next experiments, we selected the 10 μ M concentration of MK 571. BAY 60-2770 (0.001 - 10 μ M) produced significant inhibition by collagen or thrombin-induced platelet aggregation, as well as the release of ATP. Both inhibition effects (aggregation and ATP release) were markedly potentiated by preincubation with MK 571 (10 μ M). Preincubation of platelets with probenecid (non-specific inhibitor of MRP) also potentiated the antiaggregant effects of BAY 60-2770 on platelets activated with collagen and thrombin. The association of MK 571 with BAY 60-2770 also resulted in lower levels of TXB₂, particularly platelet activation by thrombin. BAY 60-2770 (0.001 - 10 μ M)

increased total cGMP levels, and this effect was potentiated by MK 571 for both platelet agonists. BAY 60-2770 significantly increased the phosphorylation of the VASP Ser239 residue, which were potentiated by MK 571. The cAMP levels were not significantly altered by both MK 571 and BAY 60-2770, individually or in combination. BAY 60-2770 (0.01 to 10 μ M) reduced Ca^{2+} levels (total and intracellular levels) which were potentiated by preincubation with MK 571. Activation of $\alpha\text{IIb}\beta 3$ integrin by collagen or thrombin was significantly inhibited by BAY 60-2770, and likewise the degree of inhibition of this integrin was greater when in the presence of MK 571. BAY 60-2770 individually did not alter the phosphorylation of AKT, ERK, P38 and JNK. The association MK 571 and BAY 60-2770 inhibited only the phosphorylation of JNK in the highest concentrations of BAY 60-2770 studied. Thus, our study shows that the association of MK 571 and BAY 60-2770 may have great therapeutic interest in the prevention of atherothrombotic diseases associated with thromboembolic complications.

Lista de Materiais

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	
BAY 60-2770	Bayer AG	Wuppertal, Renânia, Alemanha
Colágeno	Chono-log Corporation	Havertown, PA, USA
DMSO	Sigma Chemical	St. Louis, MO, USA
EGTA	Sigma Chemical	St. Louis, MO, USA
FluoFort	Schering AG	Berlin, Wedding, Germany
IBMX	Sigma Chemical	St. Louis, MO, USA
MK571	Sigma Chemical	St. Louis, MO, USA
Iloprost	Sigma Chemical	St. Louis, MO, USA
Kits de GMPc, AMPc e TXB ₂	Cayman	Ann Arbor, MI, USA
Kit de PDE5A	BPS Bioscience Inc	San Diego, CA, USA
PAC-1	Enzo Life Sciences International	Butler Pike, PA, USA).
SNP	Sigma Chemical	St. Louis, MO, USA
Trombina (plasma humano)	Sigma Chemical	St. Louis, MO, USA
Ácido plurônico	Sigma Chemical	St. Louis, MO, USA
Enzima Luciferin-Luciferase	Chono-log Corporation	Havertown, PA, USA
Anticorpo VASP	Santa Cruz Biotechnologie	Santa Cruz, CA, USA
Anticorpo p VASP ser239, AKT, pAKT, ERK, pERK, JNK, pJNK, P38, pP38	Cell Signaling	Beverly, MA, USA
Anticorpo secundário IgG	Sigma Chemical	St. Louis, MO, USA

Lista de Abreviaturas

ADP	Adenosina difosfato
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Adenosina trifosfato
Ca²⁺	Cálcio
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetil sulfóxido
E.P.M	Erro padrão da média
EDTA	Ácido tetracético etilenodiamina
EGTA	Ácido tetracético etileno glicol
GCs	Guanilil ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPIIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
GTP	Guanosina trifosfato
IP₃	Trifosfato de inositol
min	Minuto (s)
MRP	Multidrug resistance protein
mL	Mililitro (s)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
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
PECAM-1	<i>Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PKC	Proteína kinase C
PKG	Proteína kinase G

PKA	Proteína kinase A
PF-4	Fator plaquetário 4
PIP₂	fosfatidil-inositol-2-fosfato
PLA₂	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
PRP	Plasma rico em plaquetas
SERCA	Enzima cálcio ATPase sarcoplasmática/endoplasmática
SNP	Nitroprussiato de sódio
TXA₂	Tromboxano A ₂
TXB₂	Tromboxano B ₂
U	Unidade
VASP	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
vWF	Fator de von Willebrand
β-TG	Tromboglobulina beta
μg	Micrograma
μL	Microlitro (s)
μM	Micromolar

Lista de Figuras

Figura 1	Sinalização do cálcio em plaquetas.	24
Figura 2	Estrutura química dos ativadores e estimuladores da GCs.	28
Figura 3	Representação gráfica do transporte ativo do MRP4 em plaquetas.	30
Figura 4	Efeito do MK 571 na agregação de plaquetas humanas induzida pelo colágeno ou trombina e na atividade da PDE5.	41
Figura 5	Efeito inibitório do BAY 60-2770 na agregação de plaquetas humanas induzida pelo colágeno (2 µg/mL), na ausência ou presença de MK 571 (10 µM) ou probenecida (100 µM).	42
Figura 6	Efeito inibitório do BAY 60-2770 na agregação de plaquetas humanas induzida pela trombina (0,1 U/mL), na ausência ou presença de MK 571 (10 µM) ou probenecida (100 µM).	43
Figura 7	Traçados originais referentes a agregação de plaquetas humanas estimuladas com trombina ou colágeno.	44
Figura 8	Efeito do BAY 60-2770 na liberação de ATP de plaquetas isoladas humanas ativadas por colágeno (2 µg/mL) ou trombina (0,1 U/mL) na ausência e presença de MK 571 (10 µM).	45
Figura 9	Efeito da associação MK 571 e BAY 60-2770 sobre a produção de TXB ₂ em plaquetas isoladas humanas ativadas com colágeno (2 µg/mL) ou trombina (0,1 U/mL).	46

Figura 10	Efeito do BAY 60-2770 sobre os níveis de GMPc em plaquetas humanas ativadas com colágeno (2 µg/mL).	48
Figura 11	Efeito do BAY 60-2770 sobre os níveis de GMPc em plaquetas humanas ativadas com trombina (0,1 U/mL).	49
Figura 12	Efeito do BAY 60-2770 sobre os níveis de AMPc em plaquetas isoladas humanas ativadas com colágeno (2 µg/mL) ou trombina (0,1 U/mL).	50
Figura 13	Efeito do BAY 60-2770 sobre os níveis de Ca ²⁺ intracelular e total em plaquetas humanas ativadas com colágeno (2 µg/mL).	52
Figura 14	Efeito do BAY 60-2770 sobre os níveis de Ca ²⁺ intracelular e total em plaquetas humanas ativadas com trombina (0,1 U/mL).	54
Figura 15	Efeito inibitório do BAY 60-2770 sobre a mudança de conformação da glicoproteína <i>αIIbβ3</i> em plaquetas, ativadas com colágeno ou trombina.	56
Figura 16	Efeito da associação MK 571 e BAY 60-2770 sobre a fosforilação da VASP Ser 239.	58
Figura 17	Efeito da associação MK 571 e BAY 60-2770 sobre a fosforilação da AKT.	59
Figura 18	Efeito da associação MK 571 e BAY 60-2770 sobre a fosforilação da ERK, P38 e JNK em plaquetas ativadas com colágeno.	61
Figura 19	Efeito da associação MK 571 e BAY 60-2770 sobre a fosforilação da ERK, P38 e JNK em plaquetas ativadas por trombina.	62
Figura 20	Efeito inibitório do BAY 60-2770 na ativação de plaquetas é potencializado pelo MK 571.	69

Sumário

1.	Introdução	20
1.1.1.	Plaquetas	20
1.1.2.	Agonistas plaquetários	21
1.1.3.	Ativação plaquetária	22
1.1.4.	Mecanismos de mobilização citosólica de Ca^{2+} em plaquetas.....	24
1.1.5.	Proteínas que participam da ativação plaquetária.....	25
1.2.	Mecanismos de inibição da ativação plaquetária.....	25
1.3.	Guanilil ciclase solúvel (GCs)	26
1.4.	Moduladores da GCs	27
1.5.	BAY 60-2770.....	29
1.6.	Proteínas de resistência a multidrogas (<i>Multidrug resistance proteins</i> , (MRPs) ...	29
2.	Justificativa e hipótese	32
3.	Objetivo	33
3.1.	Dos objetivos específicos.....	33
4.	Materiais e Métodos.....	34
4.1.	Obtenção de plaquetas isoladas	34
4.2.	Protocolo experimental	34
4.3.	Agregação plaquetária	35
4.4.	Avaliação da atividade da PDE-5	35
4.5.	Quantificação dos nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc).....	36
4.6.	Quantificação de tromboxano B_2 (TXB ₂).....	36
4.7.	Marcação de Ca^{2+} plaquetário com FluoForte e medida de Ca^{2+} citosólico.....	37
4.8.	Mudança da conformação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (GPIIb/IIIa)	38
4.9.	Western blotting.....	38
4.10.	Análise estatística	39
5.	Resultados.....	40
5.1.	Agregação de plaquetas humanas	40
5.1.1.	Efeito do MK 571 sobre a agregação de plaquetas induzida por colágeno e trombina e atividade da PDE-5.....	40

5.1.2.	Efeito da associação do MK 571 ou probenecida e BAY 60-2770 sobre a agregação de plaquetas induzida por colágeno.....	40
5.1.3.	Efeito da associação de MK 571 ou probenecida e BAY 60-2770 sobre a agregação de plaquetas induzida por trombina.....	43
5.2.	Liberação de ATP e TXB ₂ de plaquetas isoladas	44
5.2.1.	Liberação de ATP	44
5.2.2.	Níveis de TXB ₂	45
5.3.	Análise quantitativa de nucleotídeos cíclicos em plaquetas isoladas	47
5.3.1.	GMPc	47
5.3.2.	AMPc	50
5.4.	Mobilização citosólica de Ca ²⁺ plaquetário	51
5.4.1.	Plaquetas estimuladas por colágeno.....	51
5.4.2.	Plaquetas estimuladas por trombina.....	53
5.5.	Análise da conformação da integrina $\alpha IIb\beta 3$ através da ligação com PAC-1	55
5.6.	Fosforilação protéica da VASP, AKT, ERK, JNK, P38 em plaquetas humanas isolada	57
5.6.1.	Fosforilação da subunidade de serina 239 da VASP.....	57
5.6.2.	Fosforilação protéica da AKT.....	59
5.6.3.	Fosforilação protéica das MAPKs	60
6.	Discussão	63
7.	Sumário e Conclusão	70
8.	Referências Bibliográficas	71
9.	Anexos	82
9.1.	Protocolo CAAE: n.º 46832315.8.0000.5404 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Humana	82
9.2.	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (modelo)	83

Introdução

1.1.1. Plaquetas

As plaquetas são formadas a partir de pequenos fragmentos de células hematopoiéticas oriundas de megacariócitos da medula. As plaquetas têm a forma de discos diminutos e são consideradas corpúsculos celulares e não células propriamente ditas, uma vez que não possuem núcleo. As plaquetas estão presentes no sangue em número de 150 a 400 x 10⁶ por mL de sangue e possuem meia-vida na circulação sanguínea de 8 a 14 dias, quando então são retiradas do sangue, principalmente pelo baço e fígado (1-3).

Embora as plaquetas sejam anucleadas, estes elementos possuem organelas comuns a outros tipos celulares como mitocôndrias, sistemas de Golgi, ribossomos e microtúbulos. A função primordial das plaquetas é manter a hemostasia formando “tampões” capazes de ocluir os sítios danificados do sistema vascular, contendo a perda sanguínea (4-5).

Em condições basais, as plaquetas permanecem na forma “inativada”, entretanto, após a transecção de vasos sanguíneos, estas se tornam “ativas”, quando então são capazes de aderir ao tecido conectivo às margens da lesão. Depois de alguns minutos, forma-se um tampão hemostático plaquetário que oclui a lesão e detém a perda de sangue, restabelecendo-se a hemostasia (2, 4, 6).

As plaquetas possuem três tipos de grânulos morfologicamente distintos, classificados como grânulos densos, grânulos alfa e lisossomos. Pequenas moléculas não protéicas como serotonina, ATP, ADP, Ca²⁺ e pirofosfato ficam estocadas nos grânulos densos (7-8). Os grânulos alfa possuem fatores de reparação e adesão, importantes para a interação plaqueta-plaqueta (ou plaqueta com outras células sanguíneas), como o fator de von Willebrand (vWF), P-selectina (CD62P), fator plaquetário-4 (PF-4), beta-tromboglobulina (β -TG), trombospondina-1, o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), e fatores de coagulação, como o fibrinogênio, o fator V, o fator VII e o plasminogênio (8). Nos grânulos lisossomais encontram-se algumas hidrolases ácidas como a β -glucuronidase e β -galactosidase, as quais são capazes de desfazer agregados plaquetários circulantes (9-12).

Quando ativadas, as plaquetas secretam o conteúdo dos seus grânulos denso e alfa, que facilitam sua interação com outras plaquetas, assim como com células endoteliais e leucócitos. As plaquetas também sintetizam e liberam o tromboxano A₂ (TXA₂) e o fator de

ativação plaquetária (PAF), dois mediadores conhecidos pela capacidade de liberarem o conteúdo granular para o meio externo, amplificando a ativação plaquetária (4, 13-15).

Estão presentes na membrana plasmática das plaquetas receptores que medeiam às interações adesivas. Estes receptores de adesão são estruturalmente diversos e compreendem a família das integrinas ($\alpha IIb\beta 3$, $\alpha_1\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$), leucina (GPIb/IX), imunoglobulina (PECAM-1) e selectina (P-selectina) (12, 16-17). As integrinas formam a maior família de receptores heterodiméricos $\alpha\beta$ transmembranares que regulam a adesão plaquetária (18). A integrina $\alpha IIb\beta 3$ (GPIIb/IIIa) é a mais detalhadamente estudada, representando cerca de 17% do total de proteínas da membrana plaquetária. É um heterodímero dependente de Ca^{2+} que medeia agregação, adesão firme e estabilização do trombo plaquetário (19). A $\alpha IIb\beta 3$ foi identificada como o principal receptor plaquetário para adesão plaquetária seletiva e irreversível ao fibrinogênio, sendo que esta ligação não requer necessariamente a ativação da plaqueta. Normalmente, o complexo $\alpha IIb\beta 3$ está no estado de baixa afinidade, incapaz de se ligar a ligantes solúveis, mas pode se ligar ao fibrinogênio e ao vWF imobilizados em plaquetas não ativadas (19-20).

1.1.2. Agonistas plaquetários

Há várias substâncias capazes de se ligar às plaquetas e desencadear uma cascata de reações bioquímicas que culminam na ativação plaquetária, secreção granular, formação de agregados de plaquetas e finalmente a formação do trombo. Como exemplos destas substâncias têm a trombina, ADP, TXA_2 , serotonina e colágeno (21).

O ADP é um agonista plaquetário de baixo peso molecular que atua em dois receptores acoplados à proteína G, o P_2Y_1 , que está acoplado à proteína G_q , e o P_2Y_{12} , que está acoplado à proteína G_i . A ativação de ambos os receptores é necessária para induzir a secreção plaquetária e agregação irreversível em resposta ao ADP (22-23). O receptor P_2Y_{12} exerce um papel importante na amplificação da agregação plaquetária induzida por outros agentes, como o TXA_2 , serotonina e trombina. Uma vez ativada pelo ADP, a plaqueta libera TXA_2 , bem como o seu conteúdo granular, que ampliam a adesão plaquetária, assim como o recrutamento e agregação plaquetária (24).

A trombina é considerada um dos agonistas plaquetários mais potentes, sendo capaz de ativar plaquetas em concentrações da ordem de nanomolar. A ativação plaquetária induzida por trombina é mediada pela interação com a família de receptores acoplados à

proteína G, denominadas PARs (protease-activated receptors; receptor ativado por protease) (25). São conhecidos quatro receptores PARs denominados PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4, sendo que o PAR 1 e PAR 4 expressos em plaquetas humanas. A trombina ativa os receptores PARs através da clivagem de um sítio específico do resíduo N-terminal, que expõe um novo domínio N-terminal, capaz de se ligar e ativar o receptor anteriormente clivado, promovendo então a ativação da fosfolipase C (PLC β) através da proteína Gq, desencadeando uma cascata de sinalização que resulta na ativação plaquetária (25-28).

O colágeno é a maior molécula subendotelial capaz de oferecer substrato à adesão de plaquetas, bem como de induzir ativação plaquetária. É considerado o principal componente da matriz trombogênica, sendo também considerado um agonista plaquetário muito potente. O colágeno induz tanto a ativação plaquetária pela ligação aos receptores do tipo GPVI, quanto a firme adesão de plaquetas, através da interação com a integrina $\alpha_2\beta_1$. O GPVI está associado à cadeia de heterodímeros FcR γ , sendo que após a ativação, dois resíduos de tirosina de sua cadeia são fosforilados por proteínas da família Src, ativando a proteína p72 Syk. A Syk promove a ativação da PLC γ_2 (10, 29-31).

Duas formas de PLC são reconhecidas nas plaquetas, β e γ , as quais são moduladas por diferentes mecanismos envolvendo proteínas G e proteína kinase tirosina (PKT), respectivamente. Trombina e TXA₂ atuam em receptores acoplados a proteínas G, que ativam PLC β . O colágeno induz mecanismos dependentes de PKT, que por sua vez fosforilam PLC γ (32). A PLC γ não é ativada pela trombina, confirmando que os diferentes agonistas plaquetários operam através de diferentes vias de sinalização (10).

1.1.3. Ativação plaquetária

A ativação plaquetária é um mecanismo complexo em resposta a injúria vascular e doenças aterotrombóticas, que levam à formação do trombo. Como citado acima, vários são os receptores e moléculas que regulam a ativação plaquetária. Dessa forma, as plaquetas são classicamente alvos da terapia antiplaquetária para a prevenção e tratamento da trombose arterial (33).

A ativação plaquetária compreende quatro diferentes fenômenos, a saber: *shape change*, secreção, adesão e agregação. O *shape change* envolve a mudança da plaqueta da forma discóide para a forma esférica que é acompanhada de emissão de pseudópodes. A secreção compreende a extrusão do conteúdo granular durante a adesão e agregação, ou

mesmo na ausência de ambas. A adesão plaquetária é o primeiro evento resultante da ligação das plaquetas aos componentes da matriz extracelular e celular da parede vascular danificada. A adesão plaquetária é o processo no qual as plaquetas se juntam às superfícies que não a de outras plaquetas, normalmente à membrana de outras células e aos componentes da matriz extracelular. A agregação é o processo no qual as plaquetas se juntam e se ligam às superfícies de outras plaquetas (34-35).

A ativação plaquetária se dá através da sequência de sinalização denominada *inside-out* e *outside-in*. Esta primeira sinalização é responsável por promover a mudança de estado de baixa afinidade para o estado de alta afinidade do receptor $\alpha IIb\beta 3$ pelo seu ligante, o fibrinogênio. A segunda sinalização (*outside-in*) é, caracterizada pela ligação do fibrinogênio ao receptor glicoprotéico $\alpha IIb\beta 3$ plaquetário, provocando uma segunda onda de agregação, reorganização e estabilização do trombo. A sinalização *inside-out* é iniciada a partir da ativação da PLC pela subunidade α da proteína G acoplada aos receptores dos agonistas plaquetários (36-37).

A PLC cliva o fosfatidil-inositol-2-fosfato (PIP₂) na membrana plasmática gerando dois segundos mensageiros intracelulares, o trifosfato de inositol (IP₃) e o diacilglicerol (DAG). O IP₃ libera Ca²⁺ do sistema tubular denso da plaqueta, permitindo a fosforilação da miosina de cadeia leve e ativação de enzimas dependentes de Ca²⁺, como a proteína quinase C (PKC) e a fosfolipase A₂ (PLA₂) (38). O DAG ativa a PKC que, por sua vez, regula a formação do citoesqueleto da plaqueta, e ao mesmo tempo ativa o complexo $\alpha IIb\beta 3$, provocando mudanças conformacionais (39). Assim, a integrina $\alpha IIb\beta 3$ expõe seu sítio de ligação, passando de um estado de baixa afinidade ao ligante (plaqueta em repouso), para o estado de alta afinidade ao ligante (plaqueta ativada) (40).

A integrina $\alpha IIb\beta 3$ participa dos processos de agregação e adesão sendo responsável pela ligação das plaquetas ao fibrinogênio, vWF, vitronectina e fibronectina (12, 41). Após a ligação da integrina $\alpha IIb\beta 3$ ao seu ligante, inicia-se a segunda etapa de sinalização denominada *outside-in*, responsável pela segunda onda da agregação e reorganização do citoesqueleto, sendo esta última importante para a firme adesão, bem como, para a estabilização dos grandes agregados de plaquetas (36, 42). O agregado plaquetário é formado por um mecanismo de *feedback* entre dois mediadores o ADP (liberado pelos grânulos densos) e TXA₂ (sintetizado a partir do ácido araquidônico) (43). Na adesão, o processo de ativação plaquetária começa a partir da etapa *outside-in* enquanto que na agregação, geralmente, inicia-se pela sinalização *inside-out* (6, 12, 41).

1.1.4. Mecanismos de mobilização citosólica de Ca^{2+} em plaquetas

Em geral, todos os agonistas plaquetários, mesmo atuando em distintos receptores, desencadeiam diferentes cascatas de sinalização que levam ao aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (38) (Figura 1).

Em plaquetas, a elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ contribui para diversos passos que levam à sua ativação, como a reorganização do citoesqueleto de actina (necessário para a mudança de forma plaquetária; *shape-change*), degranulação e ativação *inside-out* da integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, indispensável para adesão firme e agregação (36, 38, 44).

A liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares é um processo bem estabelecido que envolve a ativação da PLC que, por sua vez, hidrolisa PIP_2 a IP_3 (induz principalmente a liberação de Ca^{2+} dos estoques) e DAG (envolvida na entrada de Ca^{2+} do meio extracelular) (Figura 1) (38, 44-46).

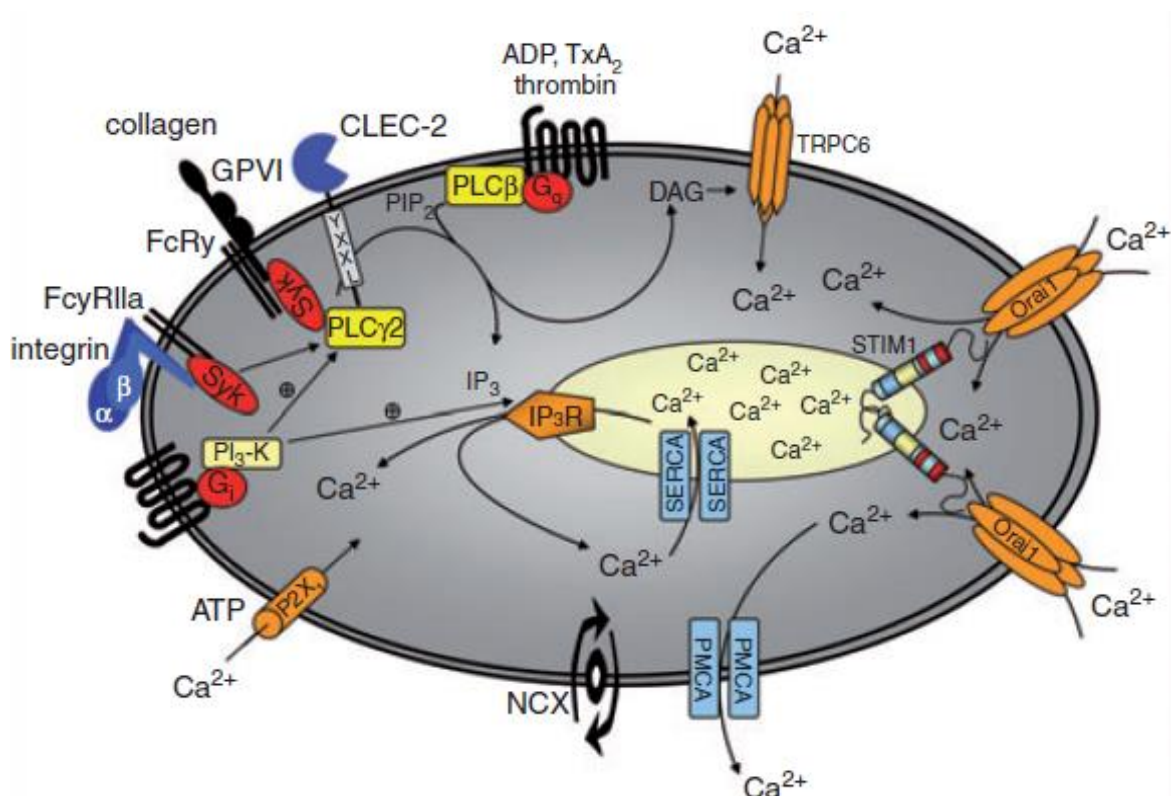


Figura 1. Sinalização do cálcio em plaquetas (38).

O IP_3 promove liberação de cálcio dos estoques intracelulares atuando diretamente sobre receptores de IP_3 (canais permeáveis ao Ca^{2+}) presentes no retículo endoplasmático, também conhecido como sistema tubular denso, considerado o maior

reservatório de Ca^{2+} plaquetário. A regulação dos receptores de IP_3 se dá através da fosforilação destes por diversas proteínas quinases (38).

A manutenção estável dos níveis $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é essencial para manter as plaquetas em estado de repouso na circulação. Assim, dois mecanismos reguladores são conhecidos em plaquetas: as enzimas Ca^{2+} ATPases sarcoplasmáticas/endoplasmáticas (SERCAs) que bombeiam Ca^{2+} para os estoques intracelulares e as enzimas Ca^{2+} ATPases de membranas (PMCAs), que são responsáveis por bombear o Ca^{2+} para fora da célula (38, 47-48).

1.1.5. Proteínas que participam da ativação plaquetária

Diversos estudos mostram que a via PI3K/AKT desempenha papel importante na agregação de plaquetas, ativação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ e formação do trombo. A ativação de receptores plaquetários, como a GPVI e P_2Y_{12} , leva a fosforilação da PI3K, que ativa a AKT (49). Kim e colaboradores mostraram que a ativação da AKT é parcialmente dependente da liberação de ADP, e que inibidores da PI3K, inibem significativamente a agregação, secreção de grânulos e mobilização intracelular de cálcio (50).

As MAPKs consistem em três proteínas, ERK, P38 e JNK, as quais estão envolvidas em diversos mecanismos celulares. Entretanto, pouco se sabe da sua influência em plaquetas. Todas as MAPKs estão presentes em plaquetas e podem ser ativadas por vários agonistas plaquetários. A ERK e a P38 possuem papel importante nos mecanismos de secreção granular e estão envolvidas da retração do coágulo, enquanto que a JNK participa na agregação de plaquetas e formação do trombo (51-54).

1.2. Mecanismos de inibição plaquetária

A ativação plaquetária pode ser inibida em diferentes etapas, tais como na ligação do agonista aos respectivos receptores de membrana, na liberação de TXA_2 ou do conteúdo de seus grânulos, na conformação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ e na translocação de Ca^{2+} . Contudo, uma das principais vias de inibição das plaquetas se dá através da elevação dos níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos, GMPc e AMPc (55).

A prostaciclina e o óxido nítrico (NO) são mediadores produzidos a partir das células endoteliais, sendo capazes de estimular a produção de AMPc e GMPc, respectivamente, nas plaquetas circulantes. O AMPc e o GMPc ativam proteínas quinases

dependentes, PKA e PKG, respectivamente, desencadeando uma cascata de reações resultando na redução da mobilização de Ca^{2+} intracelular e inibição da ativação de plaquetas (56-57).

A proteína de adesão focal VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*) é constituída por 46 kDa e é um substrato comum tanto para PKA quanto para PKG. A PKA fosforila a VASP, principalmente no resíduo de serina 157, enquanto que a PKG fosforila o resíduo de serina 239 (58-59). Massberg e colaboradores demonstraram que há um aumento de adesão plaquetária em camundongos deficientes de VASP, comprovando que a mesma está envolvida na regulação negativa da adesão plaquetária à parede vascular sob condições fisiológicas (60). Nas plaquetas, a VASP, participa das duas maiores vias inibitórias. Assim, a ativação da PKA ou da PKG leva à fosforilação da VASP, sendo esta intimamente relacionada à regulação negativa da adesão plaquetária (60-61), à inibição da ligação do fibrinogênio com o receptor $\alpha\text{IIb}\beta 3$ plaquetário, e por fim a inibição da ativação de plaquetas (59).

1.3. Guanilil ciclase solúvel (GCs)

A GCs está amplamente distribuída no organismo sendo responsável por diversas funções fisiológicas, através da conversão de GTP em seu segundo mensageiro, o GMPc. A GCs é uma proteína citosólica heterodimérica que apresenta quatro subunidades, sendo duas maiores α (α_1 e α_2) e duas menores β (β_1 e β_2). A melhor caracterização dos heterodímeros em humanos são α_1/β_1 e α_2/β_1 . Cada subunidade contém um domínio regulatório N-terminal (grupo prostético heme), uma região de dimerização e um domínio catalítico C-terminal, sendo necessária a expressão das duas subunidades para a atividade catalítica da GCs (62).

O NO é a principal molécula endógena que ativa a GCs por ligar-se diretamente ao grupo heme formando um complexo heme-ferrosonitrosil. A ligação do NO promove mudanças conformacionais que levam à ativação da GCs e, conseqüentemente, à elevação nos níveis de GMPc (63-64).

São propostos vários mecanismos para explicar a atividade inibitória resultante do aumento nos níveis de GMPc induzido pelo NO. Estes incluem: (1) inibição da geração de IP_3 ; (2) aumento do sequestro de Ca^{2+} citosólico; (3) desfosforilação da cadeia leve da miosina; (4) inibição do influxo de Ca^{2+} ; (5) ativação de Proteínas Kinases; (6) estimulação da Ca^{2+} -ATPase de membrana (7) e abertura de canais de potássio (65-68).

Nitrovasodilatadores, como o nitroprussiato de sódio (SNP), são doadores de NO bastante utilizados como ferramenta para se entender o papel fisiológico e patológico da via do NO-GMPc (69). Outra droga utilizada como ferramenta no estudo desta via de sinalização é o ODQ (1-H-[1,2,4] oxidiazolo quinoxalin-1-one), reconhecido como inibidor potente e seletivo da GCs (70-71). O mecanismo de ação do ODQ em GCs purificada de pulmão bovino foi investigado por Schrammel e colaboradores (1996), que demonstraram que a incubação desta enzima com doadores de NO, na presença de ODQ, resulta na diminuição dos níveis de GMPc. Os autores relataram que a atividade desta enzima, medida na ausência de NO ou na presença de doadores de NO, também foi inibida pelo ODQ. Assim sugeriram que a inibição da GCs se faz de modo competitivo com o NO, resultado na oxidação do grupo heme ferroso à forma férrica, que apresenta baixa afinidade pelo NO, contribuindo deste modo para a inativação da enzima.

1.4. Moduladores da GCs

Durante a década passada muito se estudou sobre a atividade da GCs. As recentes descobertas de moduladores da GCs independentes de NO permitiram uma abordagem farmacológica sob uma perspectiva diferente (72). Duas classes de moléculas, denominadas “estimuladores” e “ativadores” da GCs, emergiram como valiosas ferramentas que permitiram elucidar, com riqueza de detalhes, tanto a fisiologia quanto a patofisiologia da via do NO-GCs-GMPc (72-75).

O YC-1, derivado indazol, foi o primeiro estimulador descrito da GCs independente de NO. A otimização química desta molécula levou à descoberta dos derivados pirazol pirimida, como BAY 41-2272. Este composto tem grande especificidade e potência em estimular a GCs, além de possuir um forte sinergismo com NO endógeno ou exógeno. A ativação da GCs pelo BAY 41-2272 requer que o ferro esteja no seu estado reduzido, semelhante à ativação pelo NO (73-74, 76).

Em 2002, em um novo programa de derivação química da Bayer, no qual avaliaram aproximadamente 800 análogos, destacou-se o BAY 58-2667 (Figura 2) como potente ativador da GCs independente de NO. Este composto apresentou características completamente diferentes daquelas já conhecidas pelos estimuladores da enzima. Ou seja, a ativação da GCs pelo BAY 58-2667 foi maior após a oxidação ou mesmo remoção do grupo prostético, indicando um novo mecanismo de ativação da GCs (72, 75, 77-78).

Outra propriedade importante dos ativadores da GCs é a capacidade de prolongar a meia vida da GCs ou até mesmo aumentar seus níveis protéicos, prevenindo a degradação induzida pela oxidação do grupamento heme (79-80).

Assim, atualmente, os moduladores de GCs são agrupados em “estimuladores” (ex. BAY 41-2272) e “ativadores” (ex. BAY 58-2667, BAY 60-2770) conforme o estado redox da enzima.

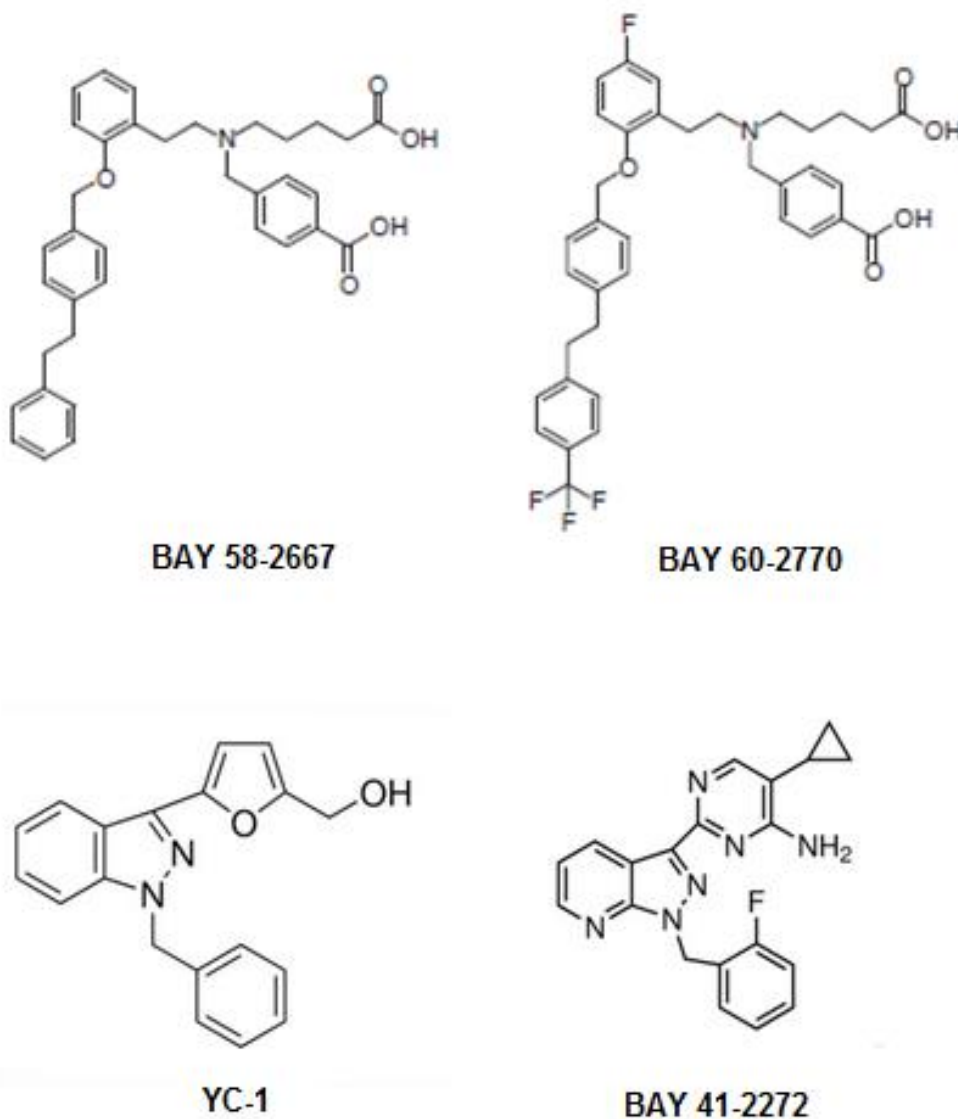


Figura 2. Estrutura química dos ativadores e estimuladores da GCs (72, 75).

1.5. BAY 60-2770

O primeiro trabalho utilizando o BAY 60-2770 foi descrito em 2008 (81). O estudo mostrou que o tratamento oral com BAY 60-2770 em modelo de fibrose hepática em ratos não afeta a pressão sanguínea, mas previne o acúmulo total e o aumento de fibras de colágeno no fígado (81). Em seguida, Jones e colaboradores descreveram o efeito do BAY 60-2770 em camundongos *knockout* para a heme-oxigenase-1. Estes animais exibem lesões vasculares e resposta contrátil maior em resposta à fenilefrina (agonista de adrenoreceptores α_1). Nestes animais, o BAY 60-2770 foi cerca de 15 vezes mais efetivo em promover relaxamento vascular do que o BAY 41-2272 (82).

Pankey e colaboradores relataram o efeito do BAY 60-2770 na vasculatura pulmonar e pressão arterial de ratos. Estes autores mostraram que infusões intravenosas do BAY 60-2770, em condições basais, causam discreta diminuição das pressões pulmonar e sistêmica. Entretanto, produzem grande redução de ambas as pressões quando o tônus vascular é elevado pela infusão de U-46619 (mimético do TXA₂). Demonstraram, ainda, que a atividade vasodilatadora do BAY 60-2770 é potencializada em animais previamente tratados com ODQ (83).

Em estudo com plaquetas isoladas de humanos, demonstramos que o BAY 60-2770 inibe de forma concentração dependente a agregação e adesão plaquetária. Atribuímos a essa inibição, o aumento dos níveis de GMPc, desencadeando diminuição da mobilização de cálcio intracelular, assim como mudança de conformação do estado inativo para o estado ativo da integrina $\alpha IIb\beta 3$. Todos estes efeitos inibitórios foram potencializados na presença do inibidor da GCs, ODQ. Outro dado importante que este trabalho trouxe foi que, na presença de ODQ (GCs oxidada), houve perda dos níveis protéicos tanto da subunidade $\alpha 1$ quanto da subunidade $\beta 1$ da GCs, sendo ambas restabelecidas na presença do BAY 60-2770 (84).

1.6. Proteínas de resistência a multidrogas (*multidrug resistance proteins*, MRP)

Uma das principais famílias de proteínas envolvidas no transporte de drogas e metabólitos endógenos através das membranas celulares são as chamadas “proteínas de resistência à multidrogas (MRP ou ABC), que compreendem 7 subfamílias (MRP1, MRP2 etc). A identificação e caracterização da MRPs foram iniciadas por Cole e colaboradores em 1992, com a clonagem da MRP1 (85). Em geral, os transportadores ABCs agem como

“bombas”, realizando o transporte por efluxo de diversas substâncias, de forma unidirecional (do meio intracelular para o meio extracelular) com gasto de uma molécula de ATP de energia. (86).

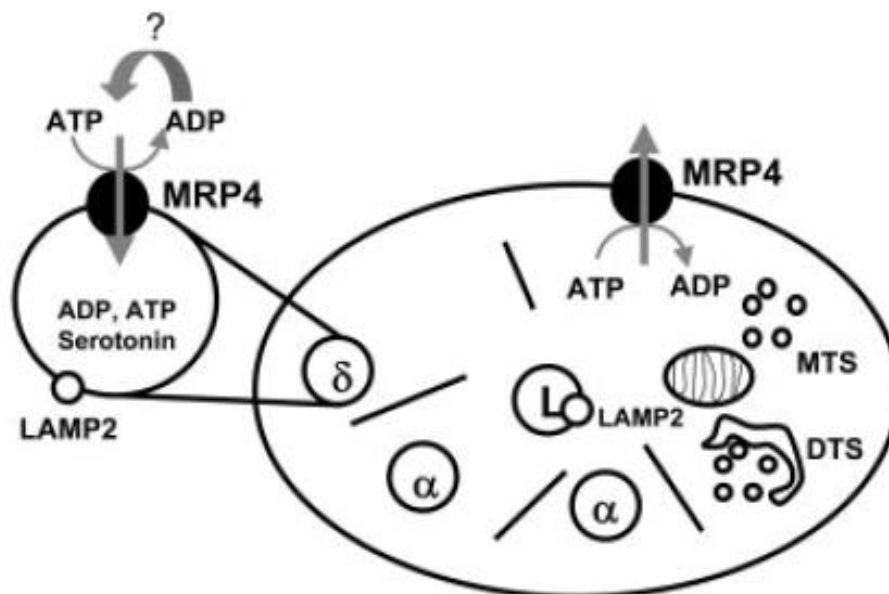


Figura 3: Representação gráfica do transporte ativo do MRP4 em plaquetas (87).

A MRP4 pertence à família ABCC, sendo responsáveis pelo transporte de diversas substâncias, incluindo os nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc) (88). Em particular, o MRP4 desempenha participação relevante na sinalização de moléculas que controlam a proliferação, diferenciação e apoptose celular, especialmente em células hematopoiéticas (89).

Hara e colaboradores identificaram o MRP4 como regulador importante na hipertensão pulmonar (90). Estes autores demonstraram que a expressão protéica de MRP4 em artérias pulmonares de pacientes com hipertensão pulmonar é maior quando comparada a artérias pulmonares de indivíduos controle (90). Além disso, artérias pulmonares obtidas de camundongos com MRP4 silenciadas, tiveram níveis intracelulares maiores de AMPc e GMPc, bem como diminuição de ambos os nucleotídeos cíclicos no meio extracelular (90). O aumento dos níveis intracelulares destes segundos mensageiros após inibição de MRP4 levou ainda a maior ativação de PKA e PKG, via clássica de AMPc e GMPc, respectivamente (90-91).

MRPs estão presentes em membranas plasmáticas e membranas de grânulos densos em plaquetas, sendo o MRP4 o mais abundantemente expresso (86). Em 2011, Mattiello e colaboradores demonstraram que a expressão de MRP4 é maior em plaquetas de

pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica quando comparado a indivíduos controle (92). Os autores sugerem que os níveis aumentados de MRP4 levam à maior extrusão da aspirina do citosol da plaqueta, resultando em uma inibição ineficaz da COX-1 plaquetária, e assim a resistência à aspirina nestes pacientes (92). Em 2012, Borgognone e colaboradores mostraram que a inibição de MRP4 em plaquetas potencializa a inibição plaquetária em resposta tanto à forskolina (ativador da adenil ciclase) quanto ao SNP (93).

A probenecida é um dos principais agentes uricosúrios utilizados na clínica. Ela é capaz de bloquear de forma inespecífica os MRPs (94). Hagos e colaboradores verificaram que a probenecida é capaz de aumentar a exposição de N-acetilcisteína no plasma e cérebro, inibindo os transportares MRP1 e MRP3. A maior exposição de N-acetilcisteína no plasma e cérebro contribui para uma melhor terapia antioxidante em diversas patologias do sistema nervoso central (95).

O MK 571 ((3-(3-(2-(7-chloro-2-quinoliny)ethenyl)phenyl) ((3-dimethyl amino-3-oxo propyl)thio)methyl)thio)propanoic acid) é uma das principais ferramentas farmacológicas utilizadas para se avaliar o papel dos MRPs, uma vez que inibe eficazmente estes transportadores. Desta forma, esta droga é capaz de aumentar a concentração intracelular do AMPc e/ou GMPc em diferentes células e tecidos como artéria pulmonar (90), plaquetas (93) e fibroblastos (96). Em coração de ratos velhos (97), assim como em artéria pulmonar de pacientes hipertensos e de camundongos submetidos a hipóxia (90), o MK 571 aumentou o inotropismo cardíaco, bem como, o relaxamento da musculatura lisa da artéria pulmonar devido a maior acúmulo intracelular de AMPc (pacientes) e de AMPc e GMPc em camundongos. Recentemente mostrou-se que o MRP4 regula os níveis intracelulares de GMPc na membrana apical de cólon de rato (98). Neste estudo, o agonista do receptor GC-C, linacotide, aumentou a secreção de eletrólitos, o qual foi potencializado pelo MK-571, mas não pelo sildenafil (inibidor de fosfodiesterase-5). Este trabalho em particular enfatiza a importância da compartimentalização do GMPc na membrana apical, resultado de um balanço entre sua ativação pela GC-C e extrusão pelo MRP4.

Considerando-se a propriedade importante de extrusão de nucleotídeos cíclicos para o meio extracelular, através de MRPs, e que os nucleotídeos cíclicos são mediadores importantes no controle de vários processos cardiovasculares e plaquetários, o estudo de MRPs é importante para o desenvolvimento de terapias eficientes para o tratamento de patologias como trombooses e arterioesclerose (86, 99).

Justificativa e hipótese

Dado o potencial terapêutico da família dos ativadores de GCs e a ação do MRP4 em plaquetas humanas, pretendemos investigar o efeito da associação destes compostos na ativação plaquetária. Trabalhamos com a hipótese de que inibidores de MRP4 podem potencializar os a inibição plaquetária do BAY 60-2770, pelo acúmulo de GMPc no citoplasma da plaqueta.

Objetivo

O objetivo geral deste projeto é investigar os efeitos da associação do MK 571 (inibidor do MRP4) e BAY 60-2770 (ativador da GCs) na ativação de plaquetas humanas de voluntários saudáveis.

3.1 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos da associação do MK 571 (ou probenecida) e BAY 60-2770 na agregação de plaquetas humanas *in vitro* induzida por colágeno e trombina;
- Investigar a sinalização intracelular determinada pela associação do MK 571 e BAY 60-2770 na ativação plaquetária, avaliando-se a produção de nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc) e de TXB₂, assim como a liberação de ATP, mobilização de [Ca²⁺]_i e ativação da integrina $\alpha IIb\beta 3$.
- Investigar os efeitos da associação do MK 571 e BAY 60-2770 na fosforilação de proteínas ligadas à ativação plaquetária como VASP, AKT, ERK, JNK e P38.

Materiais e Métodos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (Unicamp), sob o parecer n.º 46832315.8.0000.5404 (ANEXO), de acordo com as exigências da Resolução 4666/12 e suas complementares.

4.1 Obtenção de plaquetas isoladas

O sangue venoso foi coletado de voluntários sadios de ambos os sexos entre 21 e 50 anos, que não receberam quaisquer medicações por pelo menos 10 dias anteriores ao experimento.

O sangue foi coletado na presença de ACD-C (ácido cítrico 3%, citrato trissódico 4%, glicose 2%; 9:1 v/v). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação do sangue total à $400 \times g$ em temperatura ambiente por 12 min. O PRP foi submetido à uma segunda centrifugação a $800 \times g$, temperatura ambiente por mais 12 min. O sobrenadante foi desprezado. O resíduo plaquetário foi cuidadosamente ressuspenso em solução de Krebs-Ringer desprovida de cálcio (NaCl 118 mM, NaHCO₃ 35 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄·7H₂O 1,17 mM, e glicose 5,6 mM).

O número de plaquetas foi ajustado para $1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL através de contagem manual, utilizando-se câmara de Neubauer. No começo de cada protocolo foi adicionado o CaCl₂ à suspensão plaquetária na concentração final de 1mM.

4.2 Protocolo experimental

A suspensão de plaquetas foi previamente incubada durante 3 min com MK 571 (10 µM), probenecida (100 µM) ou o correspondente veículo (0,5% v/v DMSO). Em seguida, as plaquetas foram incubadas por mais 3 min com BAY 60-2770 (0,001 a 10 µM) ou respectivo veículo (DMSO (0,5% v/v)). As plaquetas foram então estimuladas com trombina (0,1 U/mL) ou colágeno (2 µg/mL) para realização dos ensaios de agregação, e quantificação dos níveis de nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc), TXB₂, ATP e Ca²⁺ intracelular, assim como para o estudo da mudança de conformação da integrina $\alpha IIb\beta 3$. A concentração final de

DMSO nunca foi excedida a níveis maiores de 1%, a qual não interferiu nos ensaios realizados.

4.3 Agregação plaquetária

A agregação plaquetária foi realizada utilizando-se ensaio turbidimétrico em agregômetro de 2 canais (Chrono-log Lumi-Aggregometer model 560-Ca, Havertown, PA, EUA). Alíquotas de 400 µl de suspensão plaquetária foram transferidas para cuvetas de agregação, provida de dispositivo agitador, mantendo-se a suspensão em constante agitação (800 r.p.m.), à 37°C. Após estimulação com colágeno ou trombina, a agregação foi monitorada até que a curva atingisse um *plateau*. A resposta ao agonista foi expressa como % de agregação, calculada pela diferença da transmissão de luz do Krebs-Ringer (100% de transmitância) pela transmissão de luz da suspensão plaquetária após a adição dos agonistas.

Para a quantificação da liberação de ATP, adicionou-se luciferin-luciferase 1 minuto antes da adição dos agonistas. A liberação de ATP foi calculada em nM usando o software aggroLink.

4.4 Avaliação da atividade da PDE-5

O estudo foi realizado utilizando o kit BPS Bioscience Inc. (San Diego, CA, EUA) para verificar se MK 571 (10 e 30 µM) poderiam interferir na atividade da PDE5A1, também conhecida como fosfodiesterase que degrada principalmente GMPc. Tadalafil (1 e 10 µM) diluído em DMSO foi utilizado como controle positivo. As reações enzimáticas foram conduzidas à temperatura ambiente durante 60 minutos em uma mistura de 50 µl contendo tampão de ensaio PDE, FAM-cGMP 200 nM, enzima PDE5A1 (purificada a partir de humanos), os compostos (MK 571 ou tadalafil) e DMSO (0,5%). Após a reação enzimática, foram adicionados 100 µl de uma solução de ligação (1: 100) a cada reação. A intensidade de fluorescência foi medida com uma excitação de 485 nm e uma emissão de 528 nm. Os dados de polarização de fluorescência foram analisados usando o software de computador, GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). A polarização de fluorescência (FPt) na ausência do composto em cada conjunto de dados foi definida como 100% de atividade. Na ausência de PDE e do composto, o valor da polarização fluorescente (FPb) em

cada conjunto de dados foi definido como 0% de atividade. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.5 Quantificação dos nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc)

As plaquetas foram isoladas como descrito anteriormente e incubadas com o inibidor inespecífico de fosfodiesterases 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX, 1 mM) por 20 min à temperatura ambiente. Posteriormente, as plaquetas foram incubadas como descrito no protocolo experimental, e então estimuladas com colágeno (2 µg/ml) ou trombina (0,1 U/mL) durante 5 min.

Para a extração de GMPc intracelular, passados os 5 min da estimulação das plaquetas com os agonistas, a reação foi interrompida adicionando-se etanol absoluto acidificado (99%) gelado. As amostras foram agitadas durante 30 segundos por vórtex. Em seguida, as amostras foram incubadas em gelo por 30 min e centrifugadas à $4000 \times g$, 4°C, por 30 min. Os sobrenadantes foram recolhidos e guardados, sendo os precipitados lavados com 0,5 mL de etanol acidificado (67%) gelado e submetidos a nova centrifugação nas mesmas condições. O lavado foi adicionado ao sobrenadante.

Para a extração de nucleotídeos no sobrenadante, passados os 5 min da estimulação das plaquetas com os agonistas, somente os sobrenadantes das amostras foram recolhidos. As amostras foram secas à 55 – 60°C, sob fluxo constante de nitrogênio e estocados à -80°C até a dosagem.

A dosagem foi realizada utilizando-se kits comerciais da Cayman (Cayman Chemical Cyclic GMP ou AMP EIA kit, Ann Arbor, MI, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante. A intensidade da cor determinada pelo espectrofotômetro é proporcional aos nucleotídeos livres durante a incubação. Cada poço recebeu 50 µL do material proveniente de $1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL, sendo que cada amostra foi realizada em triplicata. A leitura foi realizada a 412 nm. O limite de detecção é de 1 pmol/mL para o GMPc e 0,1 pmol/ml para AMPc.

4.6 Quantificação de tromboxano B₂ (TXB₂)

A quantificação de TXA₂ é realizada indiretamente através da dosagem de TXB₂, análogo estável TXA₂. Após as plaquetas serem submetidas aos protocolos experimentais,

foram adicionados 100 μL de EDTA (200 mM) gelado para finalizar as reações. Os sobrenadantes das amostras foram recolhidos e congelados. Foram utilizados Kits comerciais da Cayman (Cayman Chemical TXB kit, Ann Arbor, MI, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante. Cada poço recebeu 50 μL do material proveniente de $1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL, sendo que cada amostra foi realizada em triplicata. A leitura foi realizada a 412 nm. O limite de detecção é de 1,6 pg/mL.

4.7 Marcação de Ca^{2+} plaquetário com FluoForte e medida de Ca^{2+} citosólico

O plasma rico em plaquetas, obtido com o anticoagulante ACD-C, foi incubado com 10 μM do marcador fluorescente de Ca^{2+} , FluoForte, por 30 min, na ausência de luz e na presença de ácido plurônico F-68 (0,1% v/v), conforme descrito anteriormente (84). Em seguida, a suspensão foi centrifugada à 800 x g por 12 min, na presença do tampão de lavagem (pH= 6; 5:7 v/v). As plaquetas foram delicadamente ressuspensas em solução de Krebs-Ringer sem Ca^{2+} , ajustando-se para a concentração de $1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL.

Para se avaliar a mobilização de Ca^{2+} , alíquotas (300 μL) de plaquetas marcadas foram incubadas com BAY 60-2770 (ou DMSO), na presença ou ausência de MK 571, como descrito anteriormente.

Em cada experimento, inicialmente, uma alíquota (300 μL) foi destinada à calibração da concentração de Ca^{2+} , adicionando-se triton-X (0,1 %) e Ca^{2+} (CaCl_2 1 mM) para se obter a fluorescência máxima ($F_{\text{máx}}$). Em seguida, na mesma alíquota, foram adicionados o EGTA (10 mM) e Trizma (20 mM), obtendo-se assim o valor de fluorescência mínima (F_{min}).

A fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro (Synergy TM H1 Hybrid Reader, Biotek, EUA), utilizando-se comprimento de onda de 410 nm de excitação e 514 nm de emissão. A concentração intracelular de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) foi calculada em nM utilizando-se a equação (100): $[\text{Ca}^{2+}]_i = k_d \cdot (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{máx}} - F)$, onde o k_d é a constante de dissociação do marcador fluorescente, FluoForte ($k_d = 389$).

Para se estimar a concentração dos estoques de Ca^{2+} , foi adicionado 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 BAY 60-2770, na presença ou na ausência

de MK 571, as plaquetas foram estimuladas com trombina ou colágeno, obtendo-se valores da fluorescência referentes à mobilização interna de Ca^{2+} .

Para o influxo total de Ca^{2+} (estimado em nM), utilizamos 300 μL da suspensão plaquetária. Após 1 minuto de incubação com Ca^{2+} (CaCl_2 , 1 mM), as plaquetas foram novamente incubadas com BAY 60-2770, na presença ou na ausência do MK 571, e então estimuladas com colágeno ou trombina, obtendo-se valores da fluorescência de mobilização total (influxo externo + mobilização dos estoques internos de Ca^{2+}).

4.8 Mudança de conformação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (GPIIb/IIIa)

A análise da mudança de conformação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ do seu estado inativo para o estado ativo foi realizada através da ligação do anticorpo específico PAC-1 conjugado com FITC, específico para a conformação ativada desta proteína.

A suspensão plaquetária (20 μL ; $1,5 \times 10^8$ plaquetas/ml) foi incubada com BAY 60-2770 (0,01 – 10 μM), na presença ou na ausência de MK 571, durante 3 min à temperatura ambiente. Em seguida, à suspensão plaquetária foram adicionados 10 μL de solução de PAC-1 (PAC-1 FITC; 25 $\mu\text{g/ml}$) ou 10 μL de anticorpo controle (FITC Mouse IgM; 25 $\mu\text{g/ml}$). A seguir a solução foi estimulada com colágeno (2 $\mu\text{g/mL}$) ou trombina (0,1 U/ml), e incubada por 15 min ao abrigo da luz.

Para minimizar a presença de agregados, adicionou-se 450 μL de solução Krebs-Ringer. A ligação do anticorpo foi quantificada usando um citometro de fluxo (FACS Calibur BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) equipado com laser de argônio (488 nm) e utilizando o canal 1 (FL1). Foi feito um *gate* com a população de plaquetas, a qual foi identificada pelos sinais *forward* e *side scatter*. Dez mil eventos foram analisados e a fluorescência total foi considerada como parâmetro para descrever a intensidade de ligação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ao PAC-1.

4.9 Western blotting

As suspensões de plaquetas (400 μL - $1,5 \times 10^8$ plaq/mL) foram incubadas com BAY 60-2770 (0,1-10 μM) ou DMSO, na presença ou na ausência de MK 571 (10 μM). Após a incubação, à suspensão plaquetária foi adicionado tampão Laemmli. A eletroforese das amostras foi feita em SDS-PAGE (8-12%) em aparelho para mini gel (*Mini-Protean*, Bio-

Rad) e transferidas para membranas de nitrocelulose em sistema turbo-dry (20 min; 15V; Bio-Rad, CA, EUA). A fim de bloquear as ligações não específicas, a membrana de nitrocelulose foi incubada em solução de leite 0,5%, Tris-Base (10 mM), NaCl (100 mM) e Tween-20 (0,02%) por 12 horas à 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos para pVASP Ser239, VASP, pAKT, AKT, pERK, ERK, pJNK, JNK e pP38, P38 (Cell Signaling, Massachusetts, EUA). Após a marcação com anticorpo primário, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente (GE Healthcare, EUA). Para detecção das bandas, as membranas foram incubadas, por 1 minuto, com uma solução contendo luminol, ácido p-cumárico e H₂O₂ e, então, expostas durante tempos variados ao fotômetro Bio Rad. A quantificação foi realizada através da análise de densitometria óptica pelo Software Scion Image (Scioncorp, NIH, EUA).

4.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) para n experimentos. Os dados foram analisados utilizando-se a análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Dunnett ou Bonferroni. Foram consideradas diferenças significativas valores de $P < 0,05$.

Resultados

5.1 Agregação de plaquetas humanas

5.1.1 Efeito do MK 571 sobre a agregação de plaquetas induzida por colágeno e trombina e atividade da PDE5

A figura 4 mostra que a pré-incubação com MK 571 individualmente inibe significativamente a agregação plaquetária induzida pelo colágeno (Figura 4A) e trombina (Figura 4B) somente na concentração de 30 μ M. A partir desse resultado passamos a empregar a concentração final de MK 571 de 10 μ M, pois isoladamente não afeta a agregação plaquetária, permitindo estudar sua interação com o BAY 60-2770.

A fosfodiesterase tipo 5 é a principal isoforma que degrada GMPc em plaquetas humanas. Para excluir que MK 571 10 ou 30 μ M pudessem interferir na atividade da PDE5 A1, realizamos ensaios PDE5A1 na presença e ausência de MK 571 (10 e 30 μ M) e tadalafil (1 e 10 μ M), este último utilizado como controle positivo. Enquanto que o tadalafil inibiu significativamente a atividade da PDE5A em 61 e 79% a 1 e 10 μ M, e nenhuma inibição foi observada na presença de MK 571 (Figura 4C). Como propusemos testar a possibilidade de que o MK 571 se sinergise com o BAY 60-2770 na inibição plaquetária, todos os seguintes ensaios foram realizados usando 10 μ M de MK 571.

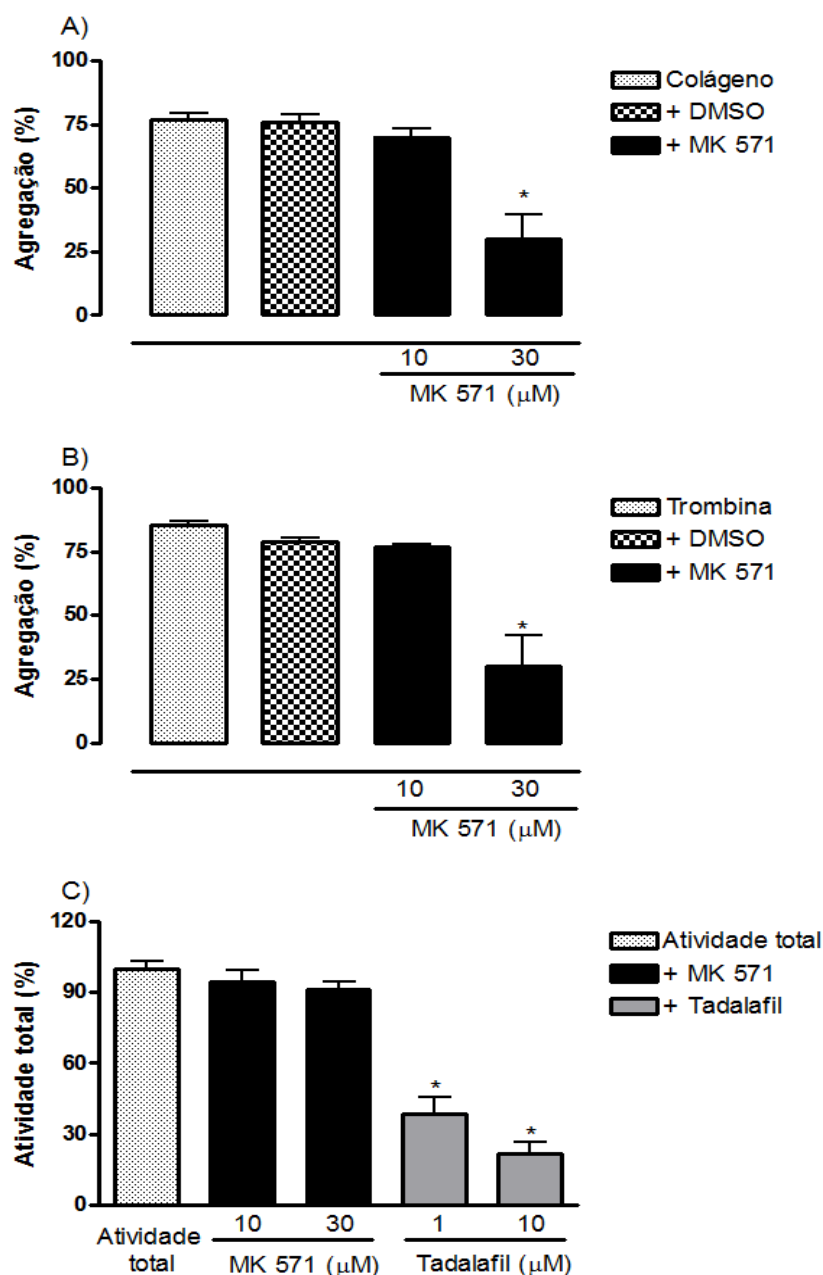


Figura 4. Efeito do MK 571 na agregação de plaquetas humanas induzida pelo colágeno ou trombina e na atividade da PDE5. A suspensão de plaquetas ($1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com o MK 571 (10 – 30 μ M) por 3 min. Em seguida, as plaquetas foram estimuladas com colágeno (2 μ g/mL) (Painel A) ou trombina (0,1 μ m/mL) (Painel B). O painel C representa o efeito do MK 571 (10 – 30 μ M) na atividade da PDE5. O tadalafil foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos como média da % de agregação $\pm$ E.P.M. (n = 6-7). *P<0,05 comparado com os valores controles (agonista e DMSO + agonista).

5.1.2 Efeito da associação MK 571 ou probenecida e BAY 60-2770 sobre a agregação de plaquetas induzida por colágeno

A incubação do BAY 60-2770 (0,001 – 1 μ M) com plaquetas humanas provocou inibição significativa e concentração-dependente da agregação induzida por colágeno (2 μ g/mL; Figura 5). O efeito inibitório do BAY 60-2770 (0,001 e 0,01 μ M) foi significativamente potencializado pela incubação prévia das plaquetas com o MK 571, sendo praticamente abolido nas concentrações de 0,1 e 1 μ M de BAY 60-2770.

Observa-se ainda que o efeito inibitório do BAY 60-2770 (0,001 e 0,01 μ M) foi potencializado pela incubação prévia das plaquetas com o probenecida (100 μ M). Nota-se, entretanto, que a probenecida foi cerca de 100 vezes menos potente do que o MK 571 em potencializar o efeito do BAY 60-2770 (Figura 5). É importante salientar que a probenecida (100 μ M) não provocou inibição significativa na agregação induzida pelo colágeno (dado não mostrado, $P < 0,05$).

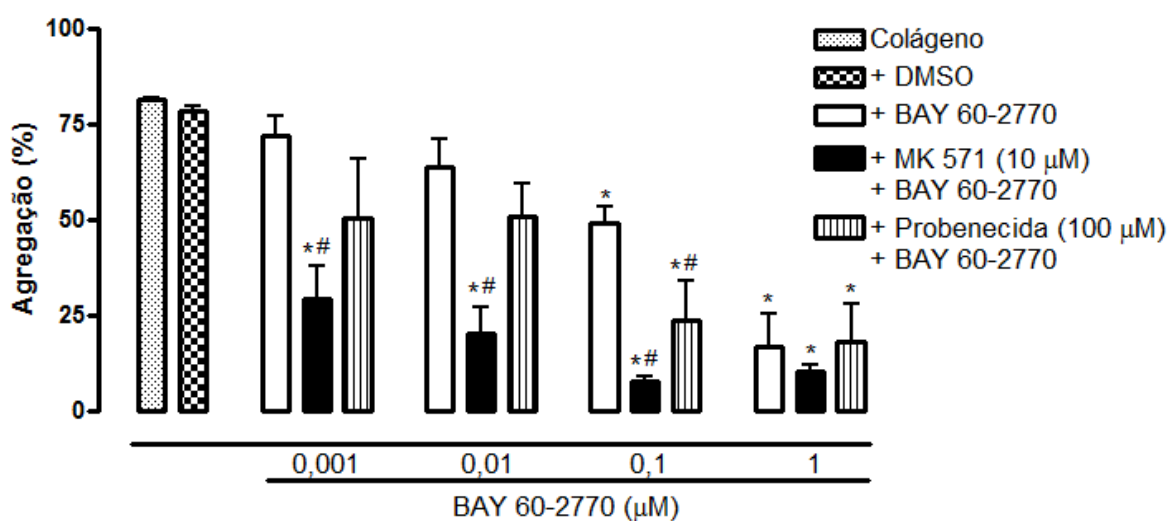


Figura 5. Efeito inibitório do BAY 60-2770 na agregação de plaquetas humanas induzida pelo colágeno (2 μ g/mL), na ausência ou presença de MK 571 (10 μ M) ou probenecida (100 μ M). Os dados estão representados como média da porcentagem de agregação do controle $\pm$ E.P.M. (n= 8-11). * $P < 0,05$ quando comparado ao controle, # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo, na ausência de MK 571 ou probenecida.

5.1.3 Efeito da associação MK 571 ou probenecida e BAY 60-2770 sobre a agregação de plaquetas induzida por trombina

A incubação das plaquetas com BAY 60-2770 (0,01 – 10 μ M) provocou inibição significativa da agregação, induzida por trombina, somente em 10 μ M deste composto (Figura 6). Contudo, na presença de MK 571 (10 μ M) ou de probenecida (100 μ M), o BAY 60-2770 passa a inibir, de maneira concentração – dependente, a agregação plaquetária a partir de 0,1 μ M (para o MK 571) e de 1 μ M (para a probenecida). Ressaltamos que, na presença de MK 571, a ação inibitória do BAY 60-2770 é mais potente em cerca de 10 vezes (Figura 6). É importante salientar que a probenecida (100 μ M) não provocou inibição significativa na agregação induzida pela trombina (dado não mostrado, $P < 0,05$).

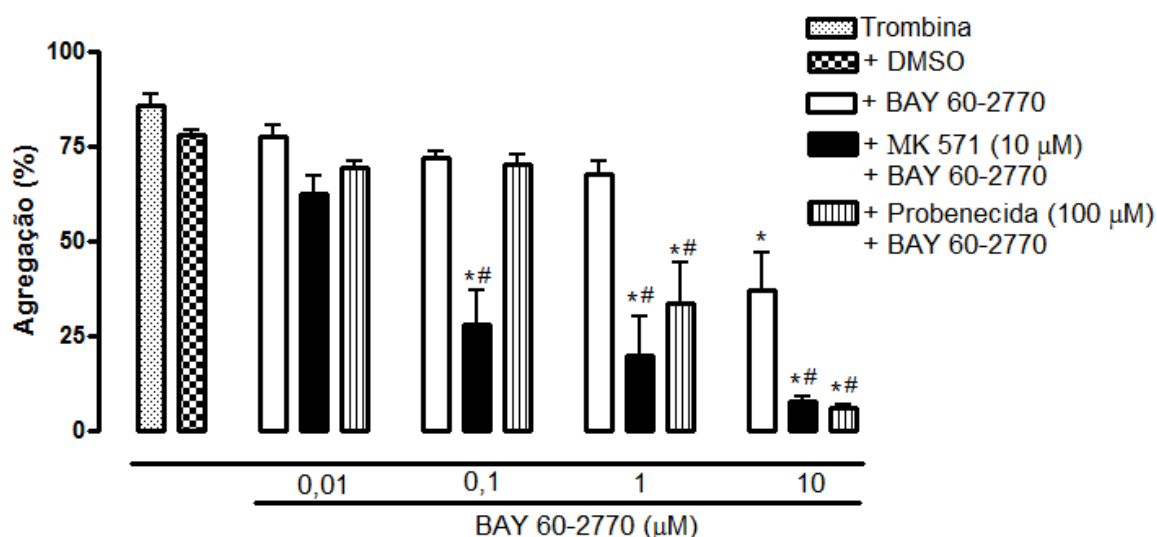


Figura 6. Efeito inibitório do BAY 60-2770 na agregação de plaquetas humanas induzida pela trombina (0,1 U/mL), na ausência ou presença de MK 571 (10 μ M) ou probenecida (100 μ M). Os dados foram representados como média da porcentagem de agregação do controle $\pm$ E.P.M (n= 8-11). * $P < 0,05$ quando comparado ao controle, e # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo, na ausência de MK 571 ou probenecida.

Os traçados representativos do efeito inibitório da associação do MK 571 e BAY 60-2770 na agregação plaquetária estão representados na figura 7.

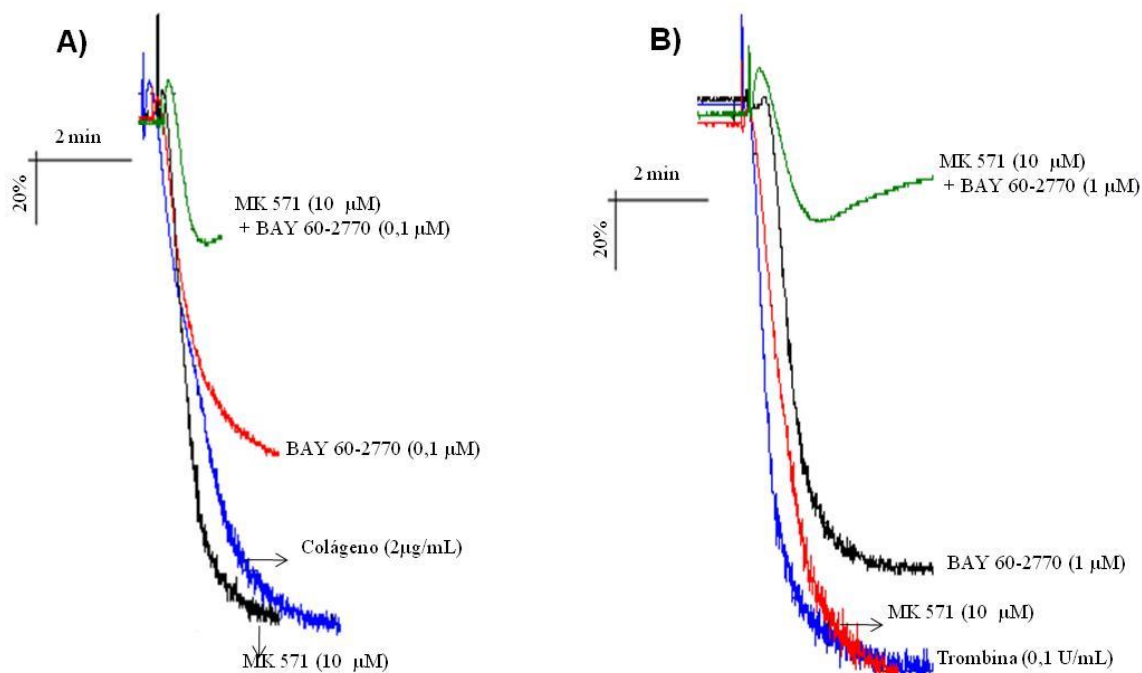


Figura 7. Traçados originais referentes à agregação de plaquetas humanas estimuladas com trombina (A) ou colágeno (B). Suspensão de plaquetas ($1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL), incubada com BAY 60-2770 (0,1 µM para colágeno e 1 µM para trombina) por 3 min, na ausência e presença do MK 571 (10 µM – 3 min).

5.2 Liberação de ATP e TXB₂ de plaquetas isoladas

5.2.1 Liberação de ATP

A liberação de ATP dos grânulos plaquetários é uma etapa fundamental na amplificação da agregação plaquetária. Na figura 8, nota-se que o BAY 60-2770 diminuiu a liberação de ATP para ambos os agonistas colágeno (A) e trombina (B), sendo essa ação potencializada na presença do MK 571. A incubação de plaquetas com MK 571 individualmente não interferiu na liberação de ATP (Figura 8).

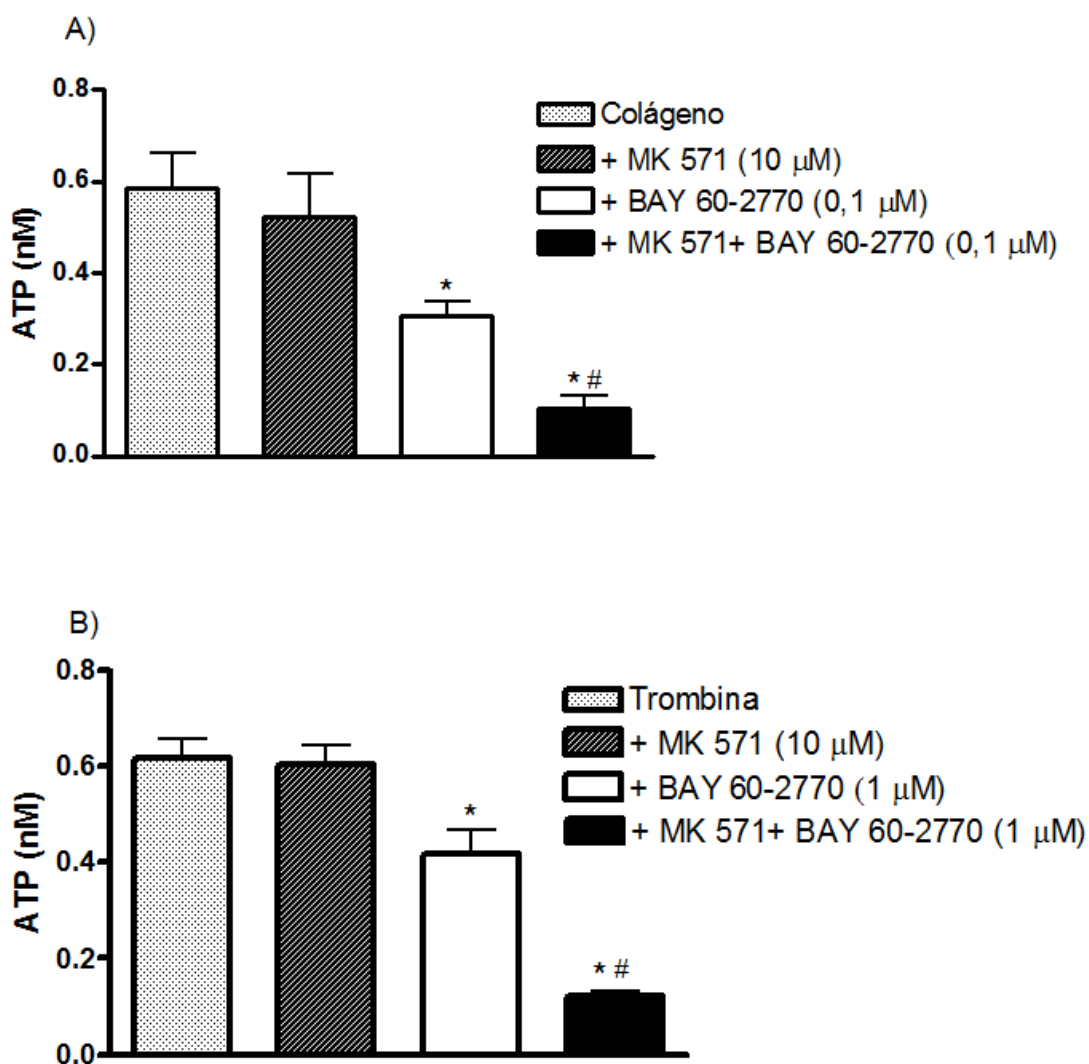


Figura 8. Efeito do BAY 60-2770 na liberação de ATP de plaquetas isoladas humanas ativadas por colágeno (2 µg/mL) (Painel A) ou trombina (0,1 U/mL) (Painel B) na ausência e presença de MK 571 (10 µM). Os dados são representados como nmols de ATP liberado (n= 4-5). *P<0,05 comparado ao controle, e #P<0,05 comparado ao respectivo grupo, na ausência de MK 571.

5.2.2 Níveis de TXB_2

O TXA_2 derivado da ciclooxygenase-1 (COX-1) é um potente agregante plaquetário. A figura 9 mostra que o BAY 60-2770 diminuiu a produção de TXB_2 , metabólito

estável do TXA₂, para ambos os agonistas testados. Nota-se que na presença de MK 571 a ação do BAY 60-2770 foi potencializada quando as plaquetas foram ativadas com trombina, mas não com colágeno. O MK 571 individualmente não interferiu na produção de TXB₂ em nenhuma condição experimental (Figura 9).

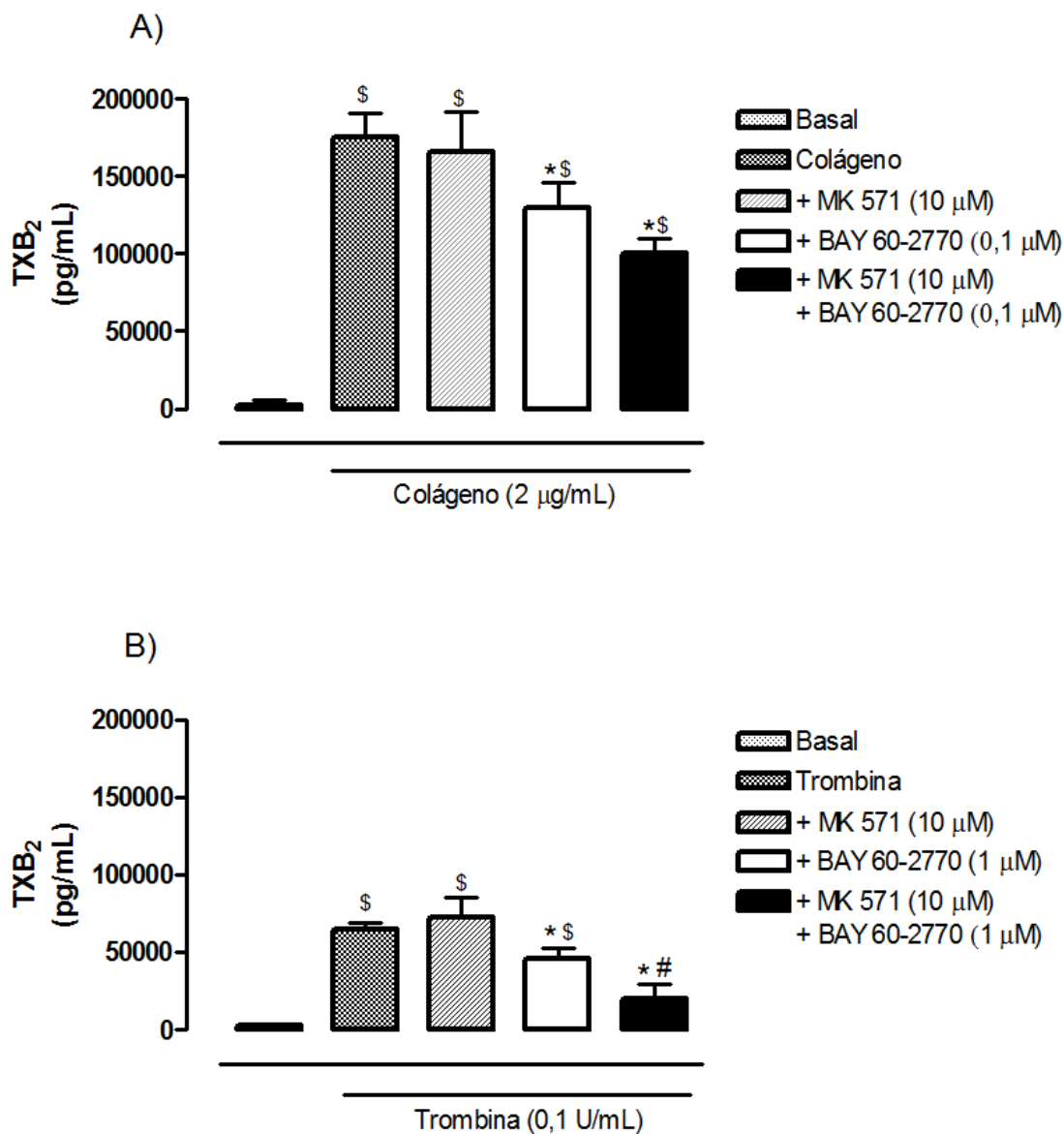


Figura 9. Efeito da associação MK 571 e BAY 60-2770 sobre a produção de TXB₂ em plaquetas isoladas humanas ativadas com colágeno (2 µg/mL- Painei A) ou trombina (0,1 U/mL - Painei B). A suspensão de plaquetas ($1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com BAY 60-2770 (0,1 ou 1 µM), na ausência e presença de MK 571 (10 uM). Os resultados representam as médias $\pm$ E.P.M (n= 4-5). *P<0,05 comparado ao controle, #P<0,05 comparado ao respectivo grupo, na ausência de MK 571; \$P<0,05 comparado basal.

5.3 Análise quantitativa de nucleotídeos cíclicos em plaquetas isoladas

5.3.1 *GMPC*

Na figura 10A, mostramos os níveis de GMPC no sobrenadante plaquetário em resposta à ativação pelo colágeno. O BAY 60-2770 (1 μ M) elevou significativamente os níveis de GMPC no sobrenadante, sendo esta resposta atenuada significativamente na presença do MK 571. O MK 571 individualmente não modificou os níveis de GMPC no sobrenadante celular.

A figura 10B mostra os níveis de GMPC intraplaquetário, em resposta à ativação pelo colágeno. Observamos que o BAY 60-2770 (0,001 – 1 μ M) aumentou de maneira concentração-dependente os níveis totais de GMPC, sendo este efeito potencializado pelo MK 571 (10 μ M) em todas as concentrações testadas.

Na figura 11A mostramos os níveis de GMPC no sobrenadante das plaquetas após estimulação com trombina. Verificamos uma resposta similar àquela do colágeno. Ou seja, o BAY 60-2770 (1 μ M) aumentou os níveis de GMPC no sobrenadante, sendo este efeito atenuado pela pré-incubação com MK 571 (10 μ M).

Os níveis intracelulares de GMPC em resposta à trombina estão representados na figura 11B. O BAY 60-2770 elevou significativamente os níveis de GMPC a partir de 1 μ M. A incubação prévia do MK 571 (10 μ M) potencializou a produção de GMPC do BAY 60-2770 nas concentrações de 0,1 e 1 μ M.

Vale salientar que os níveis de GMPC não foram alterados individualmente pelo colágeno, trombina ou DMSO em relação ao basal. A incubação com MK 571 (10 μ M) elevou significativamente os níveis de GMPC somente quando comparado ao basal. O SNP (1 μ M) (controle positivo) elevou os níveis de GMPC em cerca de 5 vezes.

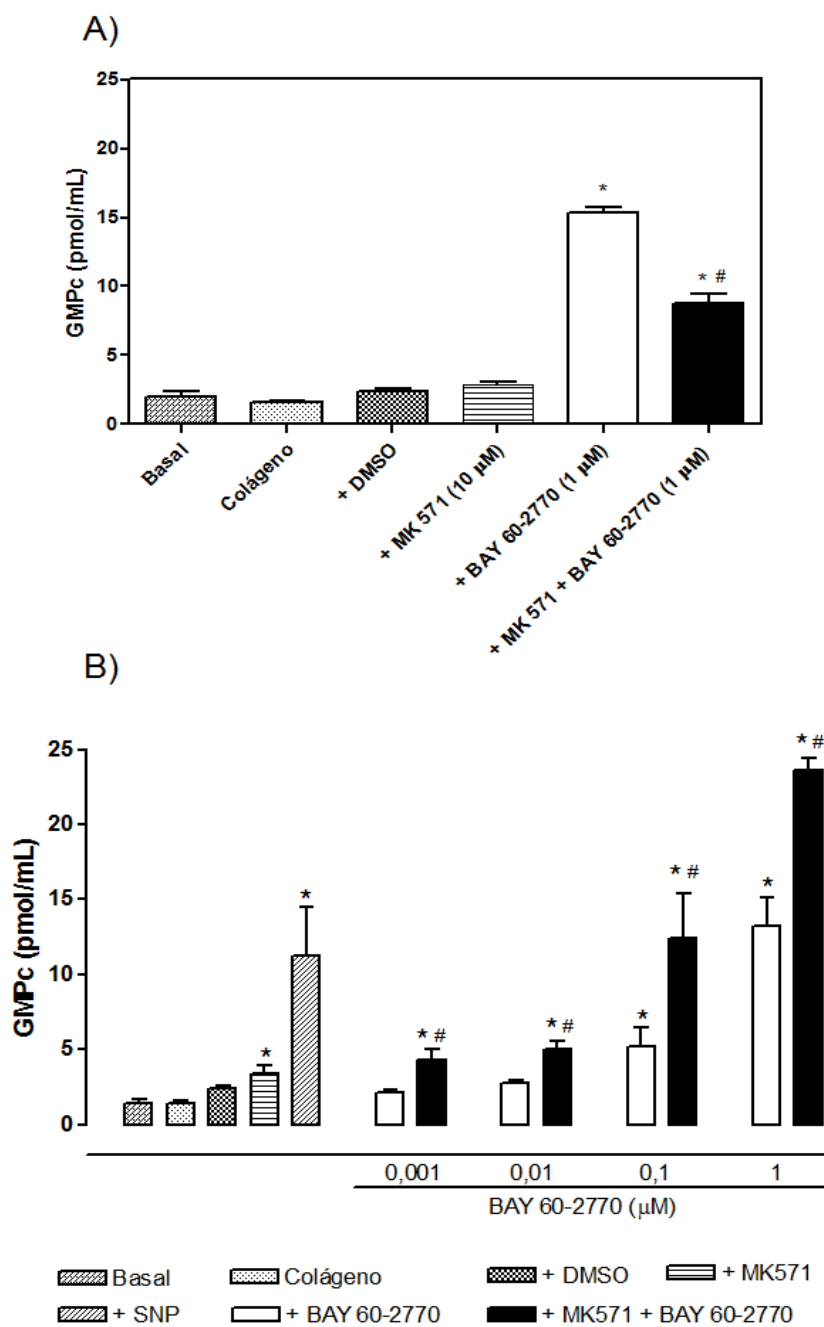


Figura 10. Efeito do BAY 60-2770 sobre os níveis de GMPc em plaquetas humanas ativadas com colágeno (2 μg/mL). A suspensão de plaquetas ($1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com nitroprussiato de sódio (SNP; 1 μM, controle positivo), BAY 60-2770 (0,001-1μM) ou veículo (1% de DMSO), na ausência e presença de MK 571 (10 uM). O Paine A e B mostram, respectivamente, os níveis de GMPc no sobrenadante e intracelular. Os resultados representam os valores médios $\pm$ E.P.M (n= 4-5). *P<0,05 comparado ao controle, e #P<0,05 comparado ao respectivo grupo, na ausência de MK 571.

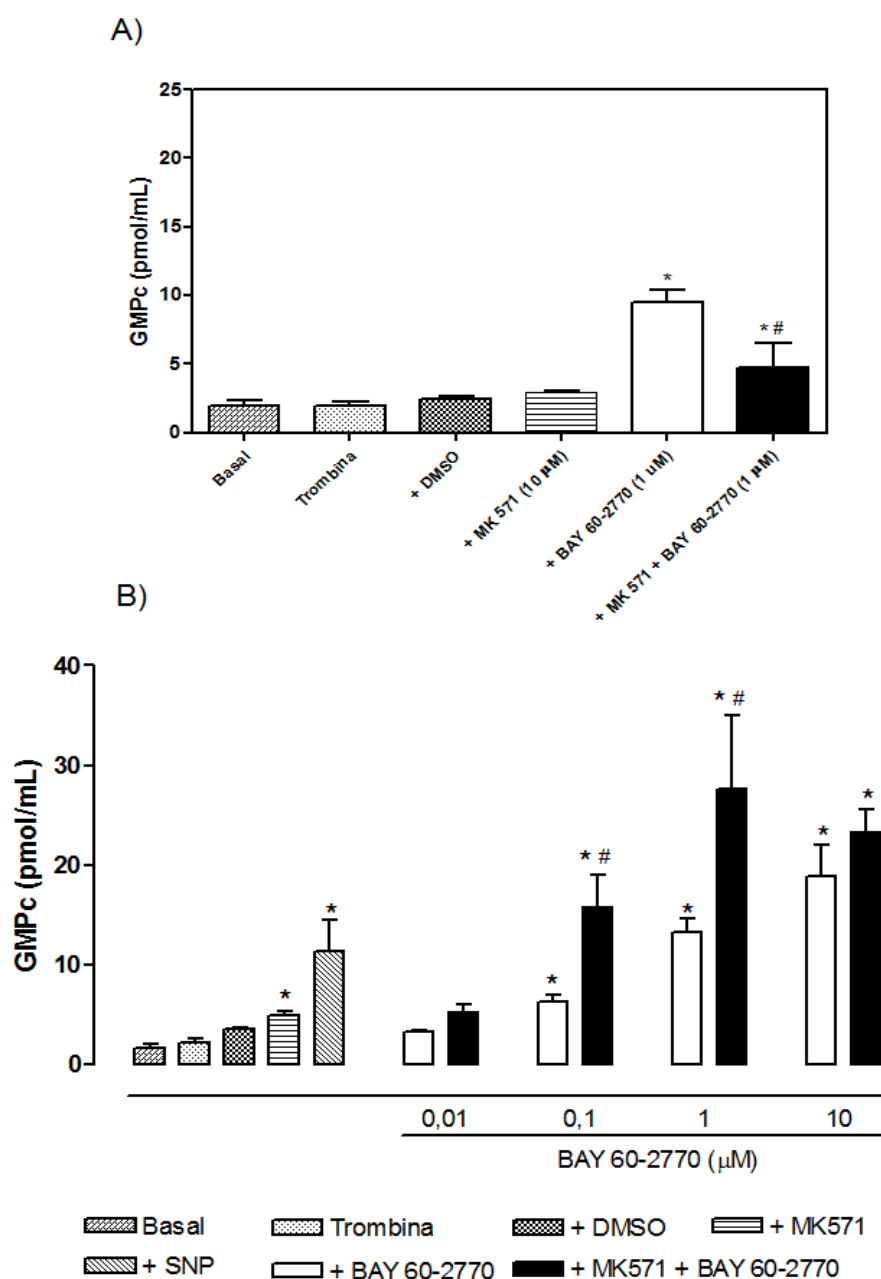


Figura 11. Efeito do BAY 60-2770 sobre os níveis de GMPc em plaquetas humanas ativadas com trombina (0,1 U/mL). A suspensão de plaquetas ($1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com nitroprussiato de sódio (SNP; 1 µM, controle positivo do teste), BAY 60-2770 (0,001-1 µM) ou veículo (1% de DMSO), na ausência e presença de MK 571 (10 µM). O Painel A e B mostram, respectivamente, os níveis de GMPc no sobrenadante e intracelular. Os resultados representam os valores médios $\pm$ E.P.M, (n= 4-5). *P<0,05 comparado ao controle, e #P<0,05 comparado ao respectivo grupo, na ausência de MK 571.

5.3.2 AMPc

Considerando que o MRP4 também é capaz de transportar AMPc (88) intracelular e o estimulador de GCs YC-1 aumenta os níveis de AMPc e por sua vez a atividade de PKA em neutrófilos (101), nós decidimos verificar se houve variação nos níveis deste nucleotídeo cíclico. A incubação das plaquetas com o BAY 60-2770 não alterou os níveis basais de AMPc para nenhum dos agonistas testados, nem na ausência e ou na presença de MK 571 (Figura 12).

O análogo de prostaciclina, iloprost (0,3 μ M), utilizado como controle positivo, elevou marcadamente os níveis basais de AMPc ($25 \pm 2,6$ e 580 ± 2 pmol/mL), respectivamente ($P < 0,01$).

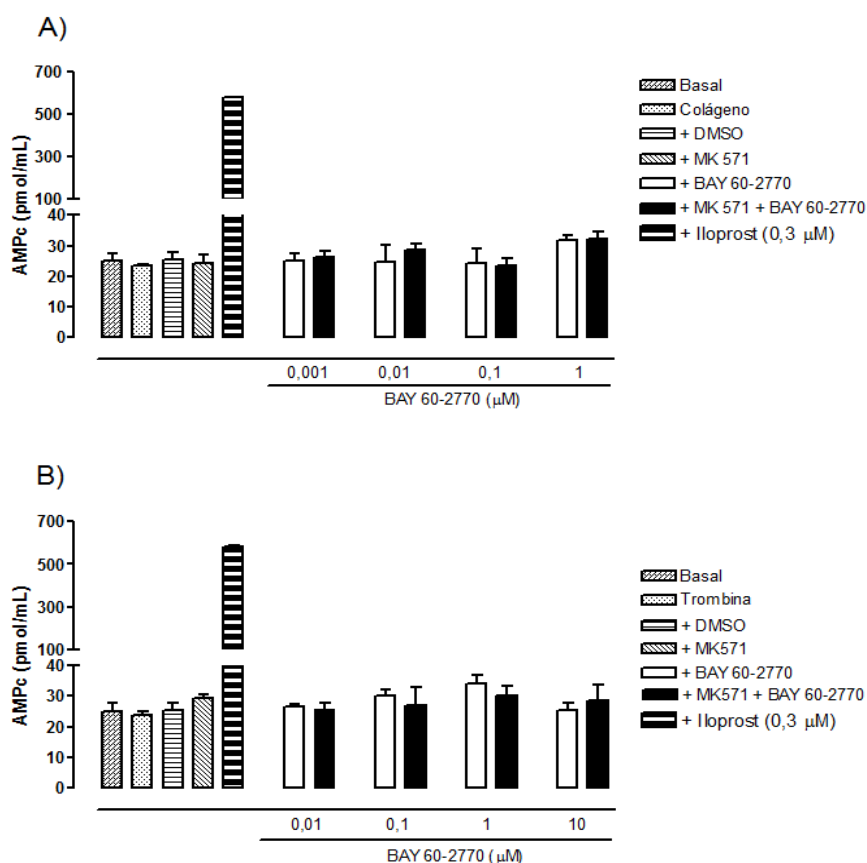


Figura 12. Efeito do BAY 60-2770 sobre os níveis de AMPc em plaquetas isoladas humanas ativadas com colágeno (2 μ g/mL - Painel A) ou trombina (0,1 U/mL - Painel B). A suspensão de plaquetas ($1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com BAY 60-2770 (0,001-10 μ M) na ausência e presença de MK571 (10 μ M). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M (n= 4-5).

5.4 Mobilização citosólica de Ca^{2+} plaquetário

A mobilização de Ca^{2+} foi estudada em plaquetas humanas isoladas, ativadas com colágeno (2 $\mu\text{g/mL}$) ou trombina (0,1 U/mL) após pré-incubação com BAY 60-2770, na presença ou na ausência de MK 571 (10 μM). A incubação das plaquetas com 1% de DMSO não alterou a mobilização de Ca^{2+} em nenhuma condição estudada.

5.4.1 *Plaquetas estimuladas por colágeno*

Para verificar somente a mobilização dos estoques intracelulares de Ca^{2+} , utilizou-se uma solução de Krebs desprovida de Ca^{2+} , na presença de EGTA (10 μM). Nestas condições, o aumento dos níveis de Ca^{2+} provocado pelo colágeno foi maior que o basal (Figura 13A). A incubação com BAY 60-2770 (0,01 – 1 μM) reduziu de maneira concentração-dependente a mobilização de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, sendo restaurado ao valor basal na concentração de 1 μM . Este efeito inibitório foi potencializado na presença de MK 571 (10 μM), como observado na concentração de 0,01 μM de BAY 60-2770 (Figura 13A).

Na presença de 1mM de CaCl_2 (Figura 13B), a estimulação das plaquetas com colágeno elevou os níveis intracelulares totais de Ca^{2+} em aproximadamente 5 vezes ($P < 0,05$; Figura 13B). A incubação com BAY 60-2770 (0,01 – 1 μM) reduziu significativamente os níveis de Ca^{2+} total em resposta ao colágeno. Este efeito inibitório foi potencializado na presença de MK 571 (10 μM) em todas as concentrações estudadas.

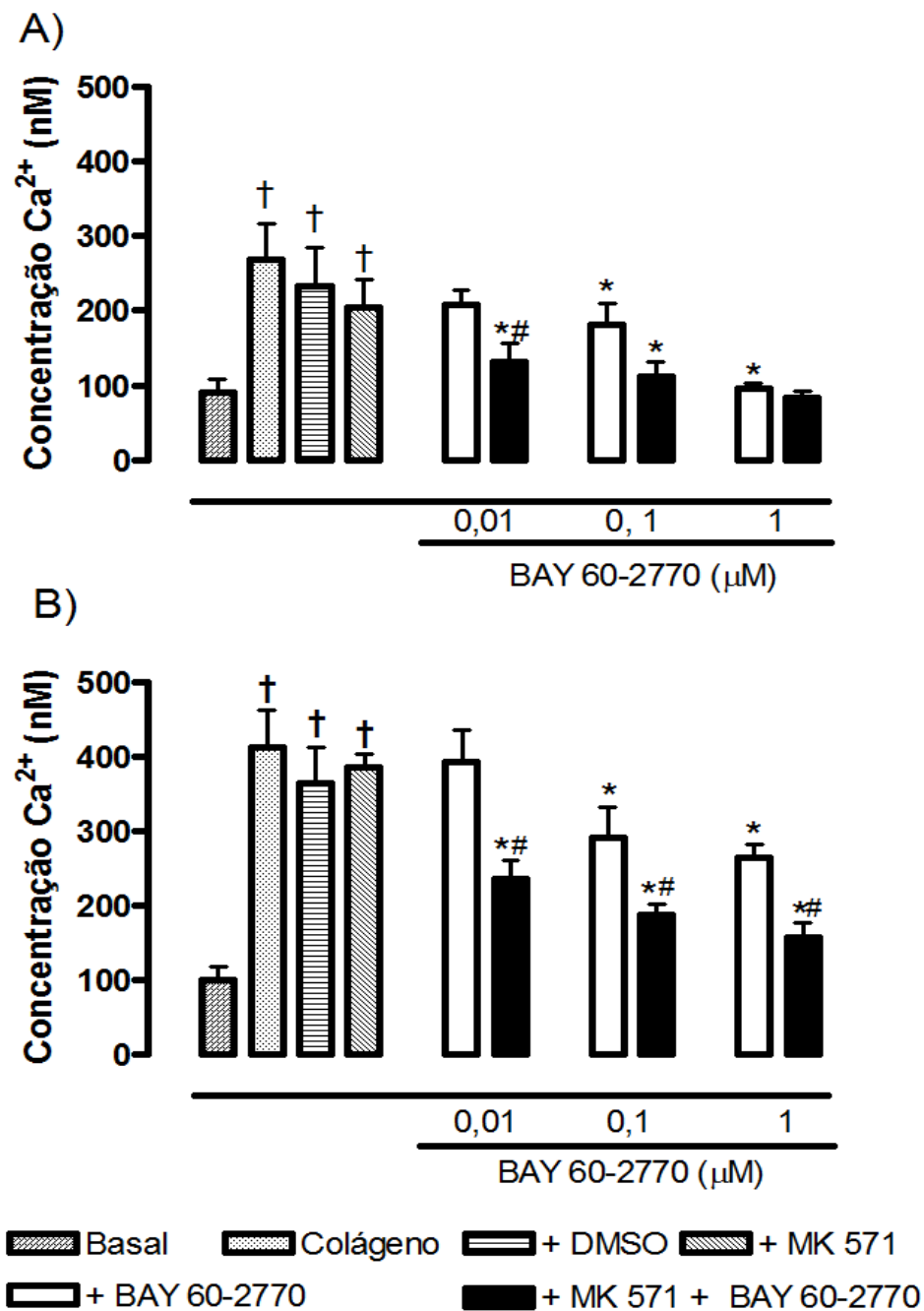


Figura 13. Efeito do BAY 60-2770 sobre os níveis de Ca^{2+} intracelular (A) e total (B) em plaquetas humanas ativadas com colágeno (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A suspensão plaquetária ($1,5 \times 10^8$ plaquetas /mL) foi incubada com BAY 60-2770 (0,01-1 μM) ou veículo (1% de DMSO) por 3 min na ausência ou presença de MK 571 (10 μM). Os resultados representam os valores médios $\pm$ E.P.M (n= 4-5). *P<0,05 comparado ao agonista na ausência de BAY 60-2770; #P<0,05 comparado ao respectivo grupo, na ausência de MK 571; †P<0,05 comparado ao basal.

5.4.2 Plaquetas estimuladas por trombina

Na presença de EGTA (100 μ M), o aumento dos níveis de Ca^{2+} pela trombina (0,1 U/mL) foi aproximadamente 35% menor ($p < 0,05$; Figura 14A) quando comparado às plaquetas na presença de CaCl_2 (Figura 14B). Nesta condição, a incubação do BAY 60-2770 (0,1 – 10 μ M) reduziu de maneira concentração-dependente os níveis de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, sendo este efeito potencializado pelo MK 571, como visto nas concentrações de 0,1 e 1 μ M de BAY 60-2770 (Figura 14A).

Na presença de 1mM de CaCl_2 , a incubação com BAY 60-2770 (0,1 – 10 μ M) reduziu de maneira concentração-dependente os níveis totais de Ca^{2+} . Este efeito inibitório foi potencializado pelo MK 571, conforme observado na concentração de 0,1 μ M de BAY 60-2770 (Figura 14B).

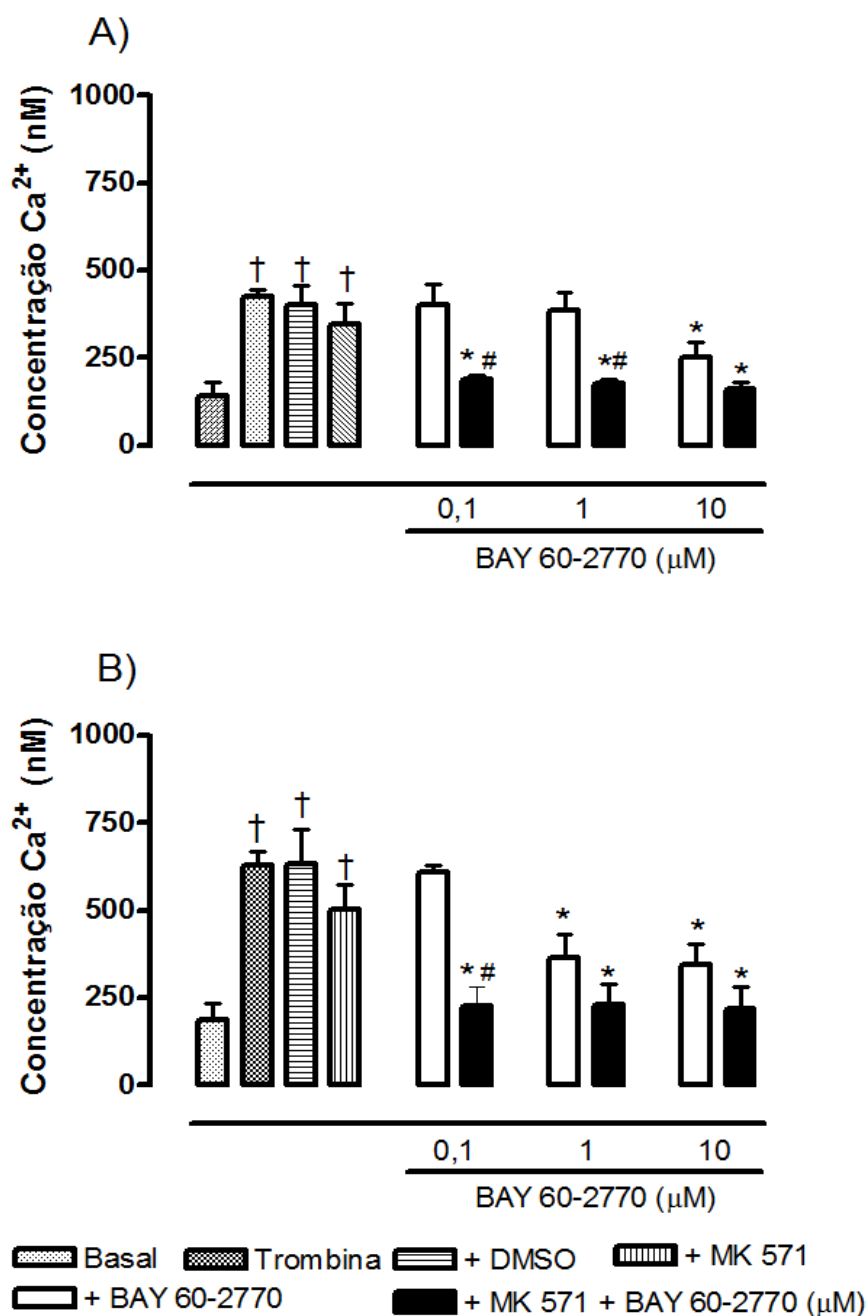


Figura 14. Efeito do BAY 60-2770 sobre os níveis de Ca^{2+} intracelular (A) e total (B) em plaquetas humanas ativadas com trombina (0,1 U/mL). A suspensão plaquetária ($1,5 \times 10^8$ plaquetas /mL) foi incubada com BAY 60-2770 (0,01-1 μM) ou veículo (1% de DMSO) por 3 min na ausência ou presença de MK 571 (10 μM). Os resultados representam os valores médios $\pm$ E.P.M (n= 4-5). *P<0,05 comparado ao agonista na ausência de BAY 60-2770; #P<0,05 comparado ao respectivo grupo, na ausência de MK 571; † P<0,05 comparado ao basal.

5.5 Análise da mudança de conformação da integrina $\alpha IIb\beta 3$ através da ligação com PAC-1

O colágeno (2 $\mu\text{g/mL}$) e a trombina (0,1 U/mL) provocaram ativação significativa da integrina $\alpha IIb\beta 3$ (Figuras 15A e 15B).

Em plaquetas estimuladas por colágeno, a incubação com BAY 60-2770 (0,1 e 1 μM) reduziu significativamente ($P < 0,05$) a ativação da integrina $\alpha IIb\beta 3$, sendo este efeito potencializado pelo MK 571 (10 μM), como evidenciado nas duas concentrações de BAY 60-2770 (Figura 15A).

O mesmo efeito inibitório do BAY 60-2770 (1- 10 μM) sobre a ativação da integrina $\alpha IIb\beta 3$ se observa em plaquetas estimuladas com trombina. A pré-incubação das plaquetas com MK 571 (10 μM) potencializou o efeito inibitório do BAY 60-2770, como visualizado na figura 15B.

A ligação das plaquetas ao anticorpo controle (FITC mouse IgM) não foi afetada pelo BAY 60-2770 ou MK 571 ($n = 4$).

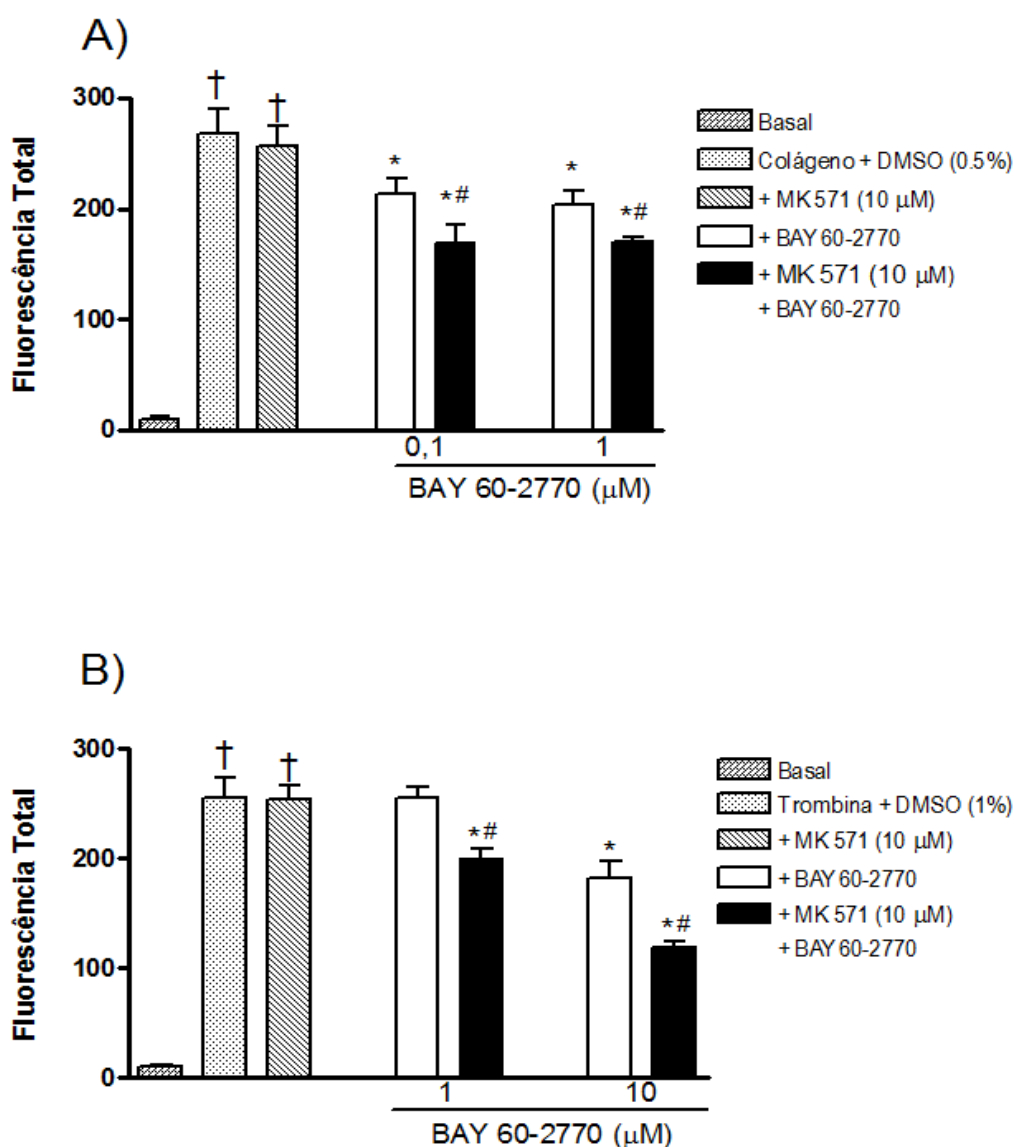


Figura 15. Efeito inibitório do BAY 60-2770 sobre a mudança de conformação da glicoproteína $\alpha IIb\beta 3$ em plaquetas, ativadas com colágeno (A) ou trombina (B). A suspensão de plaquetas (20 uL; $1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi pré-incubada com MK 571 (10 uM), BAY 60-2770 ou veículo (1% DMSO). Em seguida, as plaquetas foram incubadas com solução de PAC-1 (FITC/PAC-1; 10 μL de 25 μg/mL) ou solução controle de anticorpo (FITC IgM, na mesma diluição de PAC-1 da solução). As plaquetas foram ativadas com colágeno (2 ug/mL - Painei A) ou trombina (0,1 U/mL - Painei B). A fluorescência total foi adquirida com o citômetro de fluxo (FACS Calibur). Os resultados são expressos em fluorescência total $\pm$ E.P.M (n= 4-7). *P<0,05 comparado ao agonista; #P <0,05 comparado aos respectivos valores, na ausência de MK 571; †P<0,05 comparado ao basal.

5.6 Fosforilação da VASP, AKT, ERK, JNK, P38 em plaquetas humanas isoladas

5.6.1 Fosforilação do resíduo de serina 239 da VASP

O GMPc ativa a PKG que por sua vez fosforila o resíduo de serina 239 da VASP, levando à inibição plaquetária (102).

A figura 16 mostra que o BAY 60-2770 (0,1 e 1 μ M) promoveu a fosforilação do resíduo de Ser239 da VASP nas duas concentrações estudadas. Em plaquetas ativadas com colágeno, a fosforilação promovida pelo BAY 60-2770 (1 μ M) foi potencializada na presença do MK 571 (Figura 16A). De maneira semelhante, em plaquetas ativadas pela trombina, o BAY 60-2770 (1 e 10 μ M) promoveu fosforilação do resíduo de Ser239 da VASP, sendo que a incubação prévia com MK 571 (10 μ M) potencializou esta ação para as duas concentrações estudadas (Figura 16B). Nota-se, porém que este efeito é cerca de 2 vezes maior em plaquetas ativadas com colágeno do que com trombina.

Vale ressaltar que o MK 571 (10 μ M) individualmente elevou os níveis da fosforilação de Ser239 da VASP.

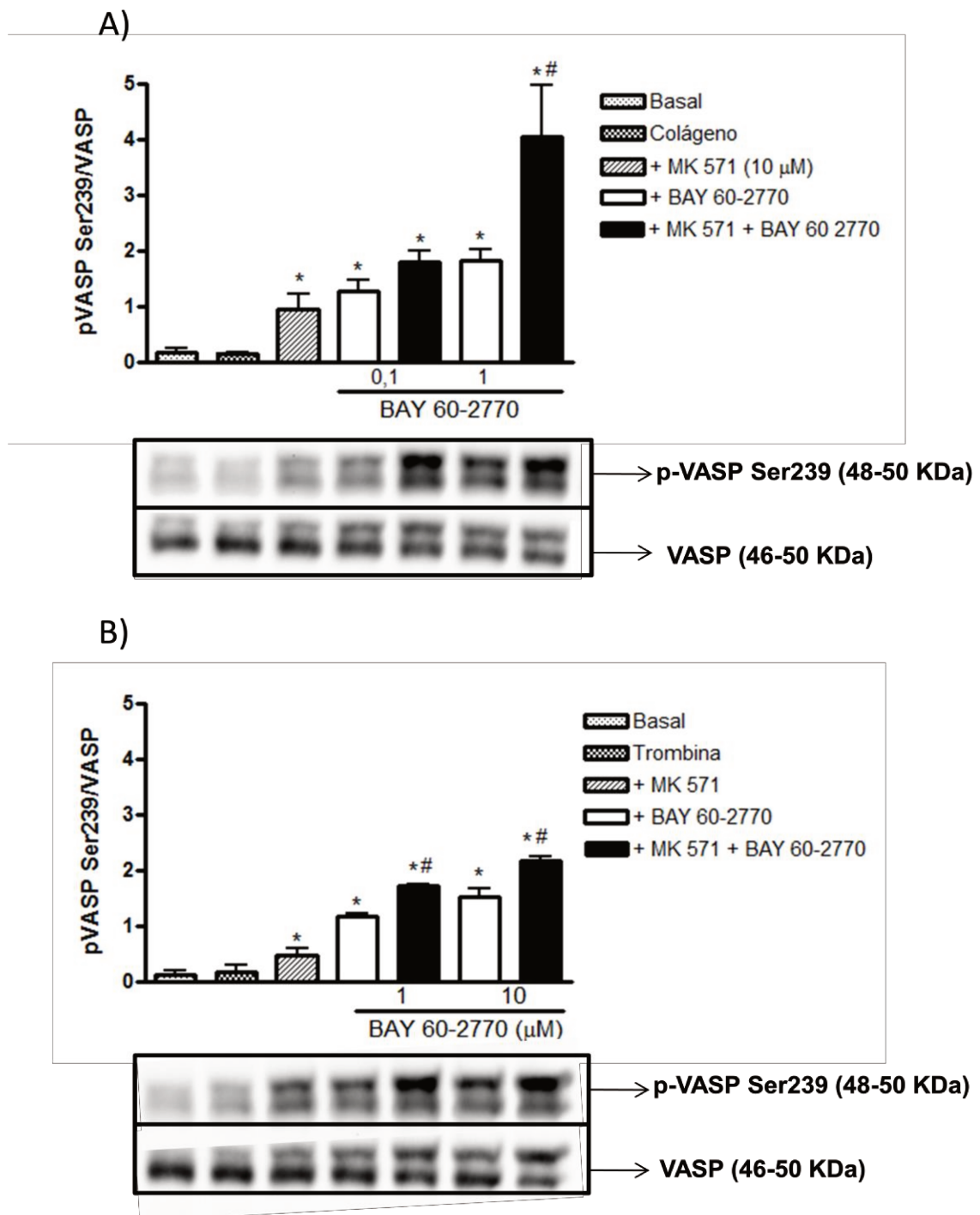


Figura 16. Efeito da associação MK 571 e BAY 60-2770 sobre a fosforilação da VASP Ser239. A suspensão de plaquetas ($1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com BAY 60-2770 (0,1 e 10 µM) (3 min) na ausência e presença de MK 571 (10 µM) (3 min), seguidas pela ativação com colágeno (2µg/mL) ou trombina (0,1 U/mL). Os resultados representam as médias $\pm$ E.P.M (n= 4). *P<0,05 em comparação ao agonista na ausência de BAY 60-2770; #P<0,05 em comparação aos respectivos valores, na ausência de MK 571.

5.6.2 Fosforilação protéica da AKT

Diversos estudos mostram que a via PI3K/AKT desempenha papel importante na regulação da agregação plaquetária e formação de trombos plaquetários (103). Nossos dados mostram que o BAY 60-2770 não alterou a fosforilação desta proteína em nenhuma das condições estudadas (Figura 17).

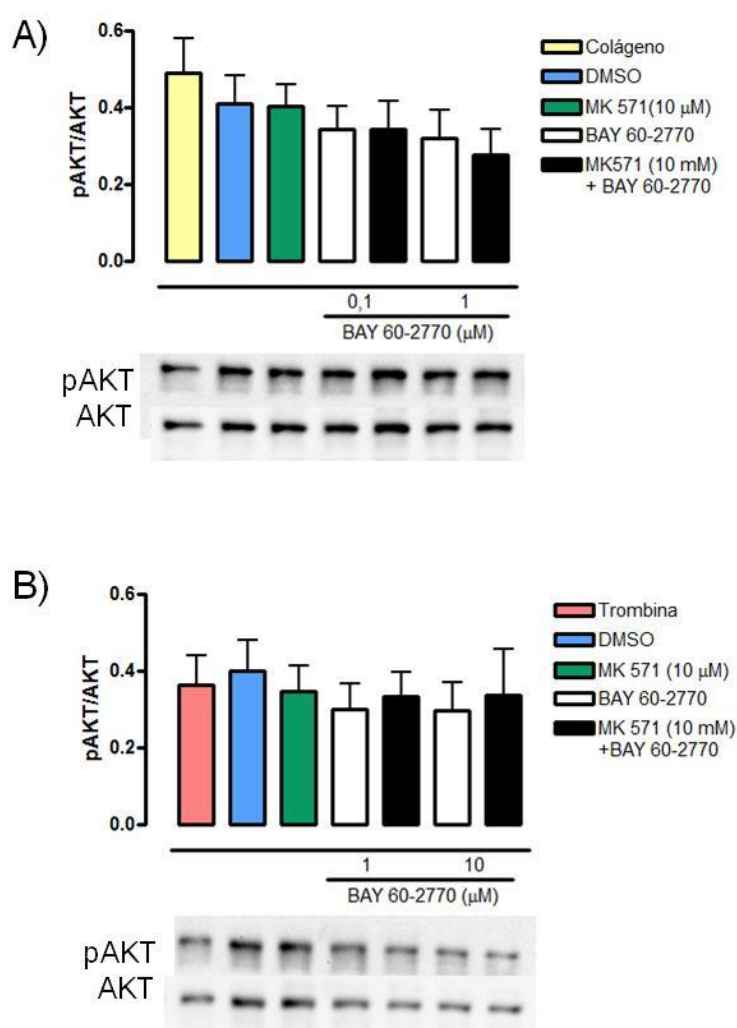


Figura 17. Efeito da associação MK 571 e BAY 60-2770 sobre a fosforilação da AKT. A suspensão de plaquetas ($1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com BAY 60-2770 (0,1-1 μM) (3 min) na ausência e presença de MK 571 (10 μM) (3 min), seguidas pela ativação com colágeno (2μg/mL - Painel A) ou trombina (0,1 U/mL - Painel B). Os resultados representam as médias $\pm$ E.P.M (n= 9-11).

5.6.3 Fosforilação protéica das MAPKs

As MAPKs consistem nas proteínas ERK, P38 e JNK. Em plaquetas, estas proteínas são ativadas por diversos agonistas plaquetários e estão envolvidas na secreção de grânulos plaquetários, formação e retração do trombo e agregação plaquetária. As figuras 18 e 19 mostram que o BAY 60-2770 não modifica a fosforilação das proteínas ERK e P38, quer nas plaquetas ativadas por colágeno (Figura 18) quer por trombina (Figura 19). Em relação à JNK, notamos que na concentração de 1 μ M de BAY 60-2770 houve redução significativa da fosforilação desta proteína em plaquetas ativadas por colágeno, mas este efeito não foi potencializado pelo MK 571 (Figura 18C). Em plaquetas induzidas com trombina, verificou-se redução significativa da fosforilação desta proteína na concentração de 10 μ M de BAY 60-2770 quando associado ao MK 571 (Figura 19C).

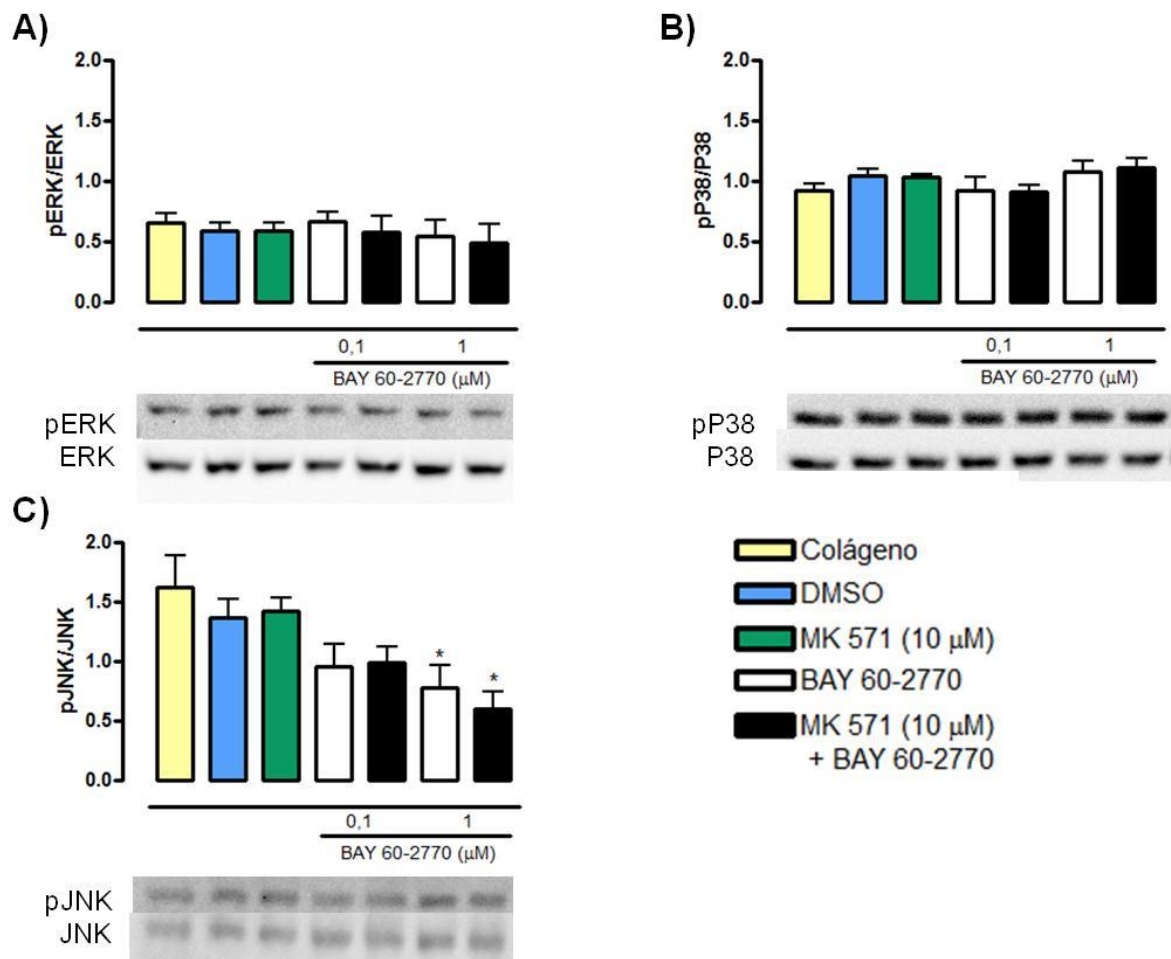


Figura 18. Efeito da associação MK 571 e BAY 60-2770 sobre a fosforilação da ERK(A), P38(B) e JNK(C) em plaquetas ativadas com colágeno. A suspensão de plaquetas ($1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com BAY 60-2770 (0,1 e 1 μM) (3 min) na ausência e presença de MK 571 (10 μM) (3 min), seguidas pela ativação com colágeno (2 μg/mL). Os resultados representam as médias $\pm$ E.P.M (n= 4-6 indivíduos). *P<0,05 em comparação ao agonista na ausência de BAY 60-2770.

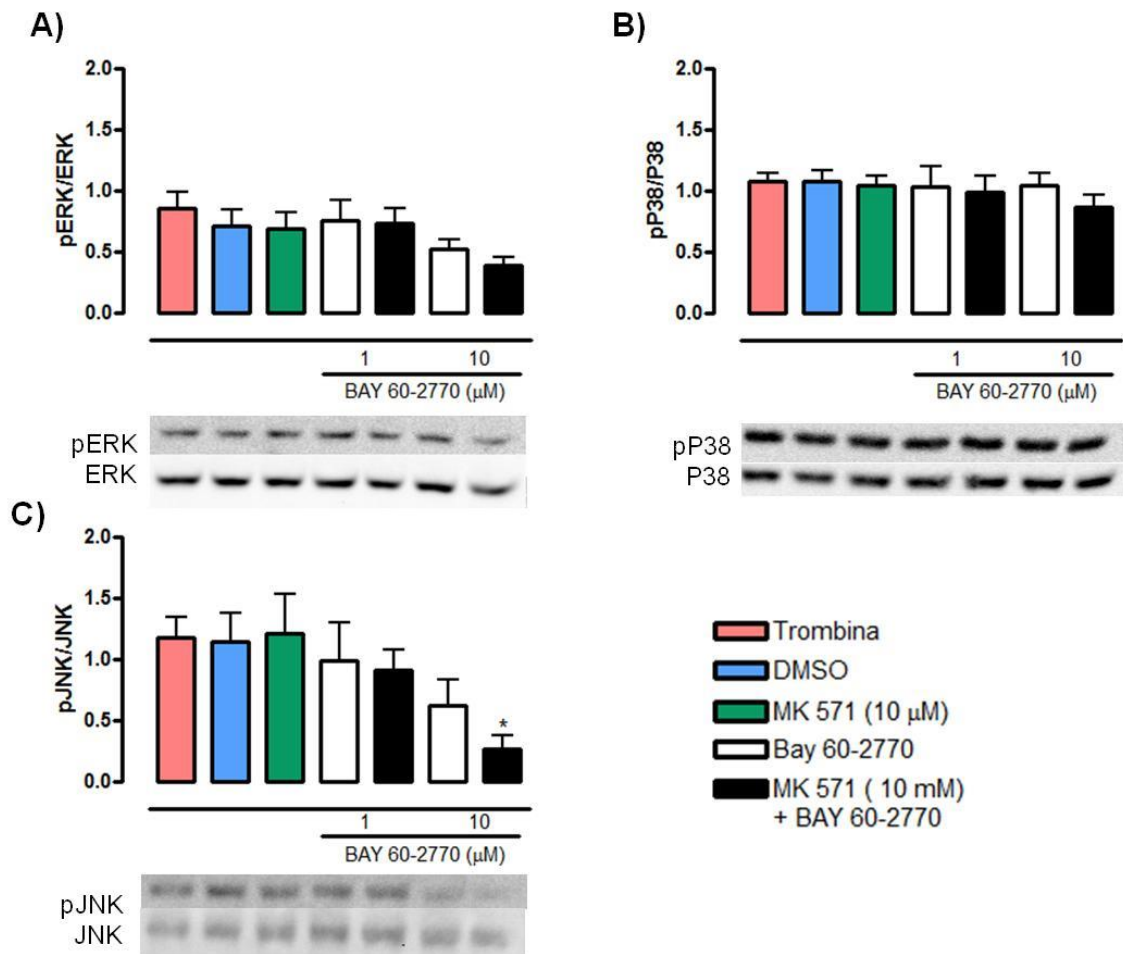


Figura 19. Efeito da associação MK 571 e BAY 60-2770 sobre a fosforilação da ERK (A), P38 (B) e JNK (C) em plaquetas ativadas por trombina. A suspensão de plaquetas ($1,5 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com BAY 60-2770 (0,1-1 μ M) (3 min) na ausência e presença de MK 571 (10 μ M) (3 min), seguidas pela ativação com trombina (0,1 U/mL). Os resultados representam as médias $\pm$ E.P.M (n= 4-6 indivíduos). *P<0,05 em comparação ao agonista na ausência de BAY 60-2770.

Discussão

MRPs são transportadores de membrana capazes de transportar nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc) de forma ativa (94). Alguns pesquisadores têm discorrido sobre a importância destes transportadores em plaquetas, visto que os nucleotídeos cíclicos são potentes inibidores da função plaquetária. Borgognone e colaboradores mostraram que o inibidor de MRP4, MK 571, é capaz de inibir a atividade plaquetária e de potencializar o efeito inibitório da função plaquetária da forskolina (ativador da adenilil ciclase) e do nitroprussiato de sódio (93, 104).

O GMPc, sintetizado pela GCs, é um importante segundo mensageiro capaz de regular diversos aspectos da função plaquetária. Em trabalho anterior, mostramos que o BAY 60-2770, ativador da GCs, é capaz de ativar a enzima GCs de plaquetas isoladas humanas, em condições fisiológicas e heme-oxidada, levando à inibição da atividade plaquetária devido ao acúmulo de GMPc (84).

Dessa forma, levantamos a hipótese que a inibição de MRP4 pelo MK 571 em plaquetas poderia potencializar o efeito inibitório do BAY60-2770, por potencializar o acúmulo de GMPc no citoplasma da plaqueta. Acreditamos que esta associação pode servir como idéia para o desenvolvimento de nova estratégia antiplaquetária para pacientes com doenças trombo-embólicas, pois seriam usadas doses sub-limíares de cada agente individualmente, reduzindo-se os efeitos colaterais como a hipotensão arterial em resposta aos ativadores da GCs, que tem sido um importante gargalo na terapêutica destes agentes.

Recentemente, Lien e colaboradores demonstraram que MK 571, em concentrações de 10 a 100 μ M, foram capazes de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno e ácido araquidônico, não interferindo na agregação por trombina ou U-46619 (análogo do TXA₂) (104). No presente estudo, notamos que somente na concentração de 30 μ M de MK 571 houve inibição significativa da agregação induzida pelo colágeno e trombina. Assim, para os próximos experimentos selecionamos a concentração de MK 571 em 10 μ M, visto que nesta concentração não se observa inibição plaquetária para os agonistas testados, colágeno e trombina, nos permitindo estudar sua interação farmacológica com o BAY 60-2770.

Nos ensaios de agregação, a associação MK 571 e BAY 60-2770 ampliaram em cerca de 10 e 100 vezes a inibição plaquetária para a trombina e colágeno, respectivamente,

em comparação ao BAY 60-2770 isoladamente. Resultados semelhantes foram observados para a associação de probenecida (inibidor inespecífico de MRPs) com BAY 60-2770. Nota-se, entretanto, que o MK 571 foi mais potente ao potencializar as ações do BAY 60-2770, tanto nas plaquetas ativadas com trombina como com colágeno. Muito provavelmente esta diferença é devido ao fato de a plaqueta expressar, principalmente, transportadores do tipo MRP4 em sua membrana plasmática e em seus grânulos densos, sendo o MK 571 um inibidor mais específico para este transportador.

Em estudo anterior, mostramos que o BAY 60-2770 é mais potente em inibir a agregação induzida por colágeno do que trombina (84). Este fenômeno já foi descrito para estimuladores e ativadores da GCs, tais como o BAY 41-2272, BAY 41-8543 e BAY 58-2667, os quais foram menos eficazes em inibir a agregação plaquetária induzida por trombina quando comparado a ADP e colágeno (105-106). O mesmo se verificou quando na presença do MK 571, que foi mais potente, em cerca de 100 vezes, em inibir a agregação pelo colágeno do que a trombina, ou seja, para a mesma concentração de BAY 60-2770 (0,1 μ M), a associação com o MK 571 causou uma inibição em 87%, para o colágeno e de 61% para trombina. Isto mostra que o efeito inibitório do BAY 60-2770 (ou associação com o MK 571) é mais resistente à ativação de plaquetas com trombina. Este dado foi observado por Lien e colaboradores, que mostraram que o MK 571 falhou em inibir a agregação induzida pela trombina ou U 46619, sugerindo que esta droga não participa da via de sinalização de receptores acoplados à proteína G desencadeada por trombina e TXA₂ (104). Nosso estudo, entretanto, mostrou que a associação MK 571 e BAY 60-2770 resultam em inibição da agregação induzida por trombina de forma concentração-dependente, o que torna a associação destas drogas interessante.

O efeito inibitório do GMPc em plaquetas é mediado via PKG, responsável por fosforilar substratos protéicos envolvidos nas vias inibitórias da plaqueta (61). A VASP é a principal proteína de ação dos nucleotídeos cíclicos, sendo esta relacionada à regulação negativa da ativação plaquetária (107). O BAY 60-2770 aumentou de forma concentração-dependente os níveis de GMPc em plaquetas para ambos os agonistas testados. A associação do BAY 60-2770 com MK 571 potencializou a produção de GMPc. Vale ressaltar que na quantificação dos níveis de GMPc no sobrenadante, notamos diminuição dos mesmos pela presença do MK 571, sugerindo fortemente que esta ação é devida à inibição do transporte de GMPc do meio intracelular para o meio exterior da plaqueta, através da inibição do MRP4 pelo MK 571. Por outro lado, nota-se aumento da concentração deste nucleotídeo no

citoplasma (avaliado pela quantificação intracelular total), tornando-o mais disponível para ativar a PKG, potencializando deste modo o efeito inibitório pelo BAY 60-2770. O MK 571 individualmente aumentou significativamente a produção de GMPc em relação ao nível basal; contudo, ressalta-se que este aumento não foi suficiente para inibir as plaquetas ativadas com colágeno e trombina. Além disso, em acordo com estes resultados de produção de GMPc, verificamos que o BAY 60-2770 aumentou a fosforilação da VASP no resíduo de serina 239, o principal substrato para fosforilação dependente de GMPc, sendo este efeito maior em plaquetas tratadas com MK 571, previamente ao BAY 60-2770, indicando aumento na atividade da PKG.

A ativação plaquetária também pode ser inibida por agentes capazes de aumentar os níveis de AMPc, como a prostaciclina (108-109). Em 2012, Smolenski mostrou que o estimulador da GCs, YC-1, é capaz de ativar a via PKA, dependente de AMPc, e de inibir a atividade de neutrófilos por acelerar o sequestro de Ca^{2+} intracelular (109). Também já foi descrito os efeitos antiproliferativos do BAY 41-2272 em células da musculatura lisa, que se faz por meio de processos dependentes de AMPc-PKA (110-111). Além disso, o MK 571 potencializa o efeito inibitório de agentes que estimulam tanto a produção de AMPc (forskolina) quanto de GMPc (SNP) em plaquetas (93). No entanto, em nosso estudo, o efeito da associação do MK 571 e BAY 60-2770 não alterou os níveis basais de AMPc nas plaquetas, excluindo papel importante para este nucleotídeo cíclico nas respostas induzidas pelo BAY 60-2770.

As plaquetas possuem dois tipos morfolologicamente distintos de grânulos, os grânulos α e os grânulos densos. Os grânulos α possuem principalmente moléculas de adesão, como fibrinogênio e P-selectinas, ao passo que os grânulos densos produzem ADP e ATP. A liberação do conteúdo destes grânulos amplifica a ativação plaquetária, bem como aumenta a atividade pró-coagulante da plaqueta (formação e estabilização do trombo), promovendo o recrutamento de novas plaquetas para o sítio da injúria. A secreção de grânulos em plaquetas é conhecida por envolver mecanismos de sinalização comum à elevação de cálcio intracelular, bem como a fosforilação de proteínas envolvidas da ativação plaquetária (112). O análogo de GMPc (CP – GMPc) foi capaz de inibir a agregação, *shape change* e secreção de grânulos em plaquetas de camundongos *wild type* enquanto que em plaquetas de camundongos knockout para GCs, este efeito foi abolido, demonstrando assim que a via GCs-GMPc é importante para a secreção de grânulos (113). Em concordância, em nosso estudo, o aumento de GMPc pelo

BAY 60-2770 foi capaz de diminuir a liberação de ATP, sendo este efeito potencializado pelo MK 571.

De maneira geral, o colágeno ativa a glicoproteína Ia/IIa (GPIa/IIa ou integrina $\alpha_2\beta_1$) e a glicoproteína VI (GPVI) (10, 114). Por outro lado, a trombina interage com receptores acoplados à proteína G, PAR-1, PAR-2 e PAR-4, todos localizados na superfície da membrana plaquetária (115-116). Após ativação dos receptores, a PLC (ativa) cliva o PIP_2 liberando IP_3 , segundo mensageiro responsável por aumentar a concentração de Ca^{2+} citosólico a partir dos estoques intracelulares (sistema tubular denso) (38, 117-118). O aumento de Ca^{2+} citosólico é o principal responsável pela ativação plaquetária (47, 119), contribuindo para várias etapas na ativação celular, como a reorganização do citoesqueleto de actina, necessário para o fenômeno de *shape change*, agregação, adesão, liberação de TXA_2 e conversão da integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ de seu estado de baixa a alta afinidade (120-121).

Para avaliar a inibição da mobilização intracelular de Ca^{2+} em plaqueta pelo BAY 60-2770, na presença de MK 571, utilizamos o Fluoforte, fluoróforo capaz de permear membranas celulares e de ligar-se ao Ca^{2+} , emitindo fluorescência. Ambos os agonistas testados aumentaram os níveis de Ca^{2+} , como esperado. Porém, a trombina promoveu maior mobilização de Ca^{2+} , mesmo na ausência de Ca^{2+} extracelular (Krebs sem a adição de Ca^{2+} e na presença de EGTA). O tratamento das plaquetas com BAY 60-2770 foi eficaz em inibir a mobilização intracelular de Ca^{2+} induzida tanto pelo colágeno quanto para a trombina. Portanto, em plaquetas estimuladas com colágeno, concentrações menores de BAY 60-2770 (entre 0,01 – 1 μM) já foram suficientes para inibir o aumento dos níveis de Ca^{2+} , enquanto que para plaquetas estimuladas com trombina foram necessárias concentrações maiores deste composto (entre 0,1 – 10 μM). Vale ressaltar que na mobilização de Ca^{2+} referente aos estoques intracelulares, a associação do MK 571 com BAY 60-2770 restaurou os níveis de Ca^{2+} à sua condição basal em plaquetas estimuladas com trombina. Em concordância com os dados de mobilização de cálcio em plaquetas, há relatos na literatura mostrando que o aumento dos níveis de GMPc inibe a elevação de cálcio induzidos por diferentes agonistas (122).

Com a ativação plaquetária, inicia-se diversos vias de sinalização que provocam a mudança de conformação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ na superfície da plaqueta, que por sua vez se liga ao fibrinogênio, desencadeando a agregação irreversível de plaquetas. Nas etapas iniciais da agregação plaquetária a agregação não é completamente estável gerando agregados reversíveis. A formação de agregados estáveis ocorre após a liberação de mediadores

plaquetários das plaquetas envolvidas na reação, como TXA₂, ADP, PAF entre outros, os quais atuam no processo ativo e cooperam para a completa ativação plaquetária e formação do trombo (11, 123). Ambos os agonistas, colágeno e trombina, provocaram ativação da integrina $\alpha IIb\beta 3$ (visualizados pelo aumento da ligação de plaquetas ao anticorpo PAC-1). De acordo com os outros ensaios, o BAY 60-2770 inibiu tanto a ativação da integrina $\alpha IIb\beta 3$ quanto a liberação de TXA₂ (representado pela quantificação do seu análogo estável TXB₂), sendo este efeito potencializado quando pelo MK 571. Vale ressaltar que individualmente o MK 571 não modifica a conformação da integrina $\alpha IIb\beta 3$, como mostrado por Lien e colaboradores (101) e em nosso presente estudo (104).

Em plaquetas, a AKT é fosforilada em resposta a diversos agonistas plaquetários, incluindo o colágeno e a trombina. Diversos estudos mostram que a AKT exerce papel importante na sinalização *inside-out* e ativação da integrina $\alpha IIb\beta 3$, bem como na regulação da agregação plaquetária e formação do trombo (21, 124). Estudo anterior mostrou que MK 571 (10 e 50 μ M) foi capaz de inibir a fosforilação da AKT (104). Entretanto, em nosso estudo, o BAY 60-2770, individualmente ou associado ao MK 571, não foi capaz de inibir a fosforilação da AKT. Acreditamos que este resultado se deve ao fato de no trabalho citado de Lien e colaboradores, os autores utilizaram uma concentração de plaquetas 2x maior que o utilizado em nosso estudo, e como já falado anteriormente a ativação plaquetária se dá através de etapas e a concentração de plaquetas influencia diretamente na ativação plaquetária através da liberação de mediadores plaquetários. Assim uma maior concentração de plaquetas no meio pode levar a uma ativação plaquetária mais efetiva.

Outra via importante de sinalização positiva em plaquetas são as MAPK, que compreendem três subgrupos de proteínas, incluindo a ERK, P38 e JNK. A fosforilação das proteínas ERK e P38 participam da secreção de grânulos, formação e retração do coágulo enquanto que a JNK está envolvida na agregação plaquetária e formação do trombo (51-53). Duas formas de ERK foram identificadas em plaquetas, ERK1 e ERK2. A ERK2 é fosforilada e ativada por diversos agonistas, dentre eles o colágeno e a trombina. Ainda é muito discutível o papel da ERK em plaquetas, contudo sua fosforilação contribui para a ativação plaquetária (51). Na presença de baixas doses de colágeno, estudo prévio mostrou que a fosforilação da ERK2 é dependente da formação de TXA₂ e da secreção de ADP. Porém, a estimulação com ADP não foi suficiente para induzir a fosforilação da ERK2, e da mesma forma o antagonista de receptor de ADP, MRS 2179, não afetou a fosforilação da ERK induzida por colágeno (122). Este trabalho também mostrou que U46619, análogo estável do TXA₂, produz ativação

da ERK2 de maneira concentração-dependente de ADP. Assim, os autores sugeriram que existe mais de uma via de sinalização para ativação da ERK pelo colágeno (125). Com relação à trombina, Nadal e colaboradores (123) mostraram que a ativação da integrina $\alpha IIb\beta 3$ provoca regulação “downstream” na fosforilação da ERK2 (126). Em nosso estudo, o BAY 60-2770, individualmente ou associado ao MK 571, falhou em inibir a fosforilação da ERK. Nossos achados são consistentes com os trabalhos citados, uma vez que existe mais de uma via de sinalização para ativação da ERK, e assim acreditamos também em diferentes vias de inibição.

A via de sinalização da P38 em plaquetas não é clara na literatura. A trombina pode ativar a P38 por diferentes caminhos, sejam por produção de TXA_2 e secreção de ADP ou através da sinalização da GPIb. A via de sinalização do colágeno é ainda menos conhecida (127-128). A ação da via $GMPc$ -PKG na P38 é controversa. Enquanto, alguns autores relatam que a ativação da P38 é dependente de PKG (128), outros autores mostram que a PKG inibe a fosforilação da P38 (127). O MK 571 (10 a 50 μM) também não interferiu na fosforilação das proteínas ERK e P38 (104).

Como já demonstrado a sinvastatina inibiu a ativação plaquetária induzida pelo colágeno e trombina, através de aumento de $AMPc$ e $GMPc$, resultando na inibição da fosforilação das MAPK, ativação de PLC e produção de TXA_2 (129). Em seus achados Lien e colaboradores (104) mostram que o MK 571 não interferiu na fosforilação da JNK em plaquetas ativadas com colágeno. Nosso estudo revela que em plaquetas ativadas com colágeno, o BAY 60-2770 (1 μM) reduziu significativamente a fosforilação da JNK, mas este efeito não foi modificado pela pré-incubação com MK 571. Em plaquetas ativadas com trombina, vemos uma ação inibitória aditiva da associação do BAY 60-2770 e MK 571, visto que quando estudadas isoladamente não notamos ação inibitória para nenhuma das drogas.

Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), em 2012 as doenças cardiovasculares representaram 30% das principais doenças crônicas do mundo e de acordo com o Portal Brasil (2002), representaram 31% do total de mortes no Brasil, superando em mais do dobro de mortes causadas por neoplasias. Muito embora existam diversas terapias medicamentosas para o tratamento de comorbidades relacionadas a doenças cardiovasculares, como controle de pressão, colesterol e atividade plaquetária, ainda se verifica alto índice de mortes devido o tratamento ineficaz. Portanto a busca por novas estratégias medicamentosas que possam atuar no controle mais eficaz de pacientes que são resistentes às terapias já existentes é imprescindível para revertermos estas estatísticas alarmantes.

Assim, o MK 571 potencializou os efeitos inibitórios do BAY 60-2770 tanto nos ensaios funcionais (agregação e liberação de ATP) quanto nos ensaios de produção de GMPc, TXA₂, mobilização intracelular de Ca²⁺, ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e fosforilação da VASP (Figura 20). O aumento dos níveis de GMPc em resposta à ativação da GCs pelo BAY 60-2770 concomitante à inibição de MRP4 pelo MK 571 parece antagonizar mais eficientemente o aumento de Ca²⁺ nas plaquetas ativadas em resposta ao colágeno e trombina. Desta forma, é possível especular que o uso de doses baixas de cada molécula, que per se não tem efeito significativo individualmente, resulta em uma terapia antiplaquetária mais eficiente quando associadas. Esta associação poderia resultar em menor incidência de efeitos colaterais.

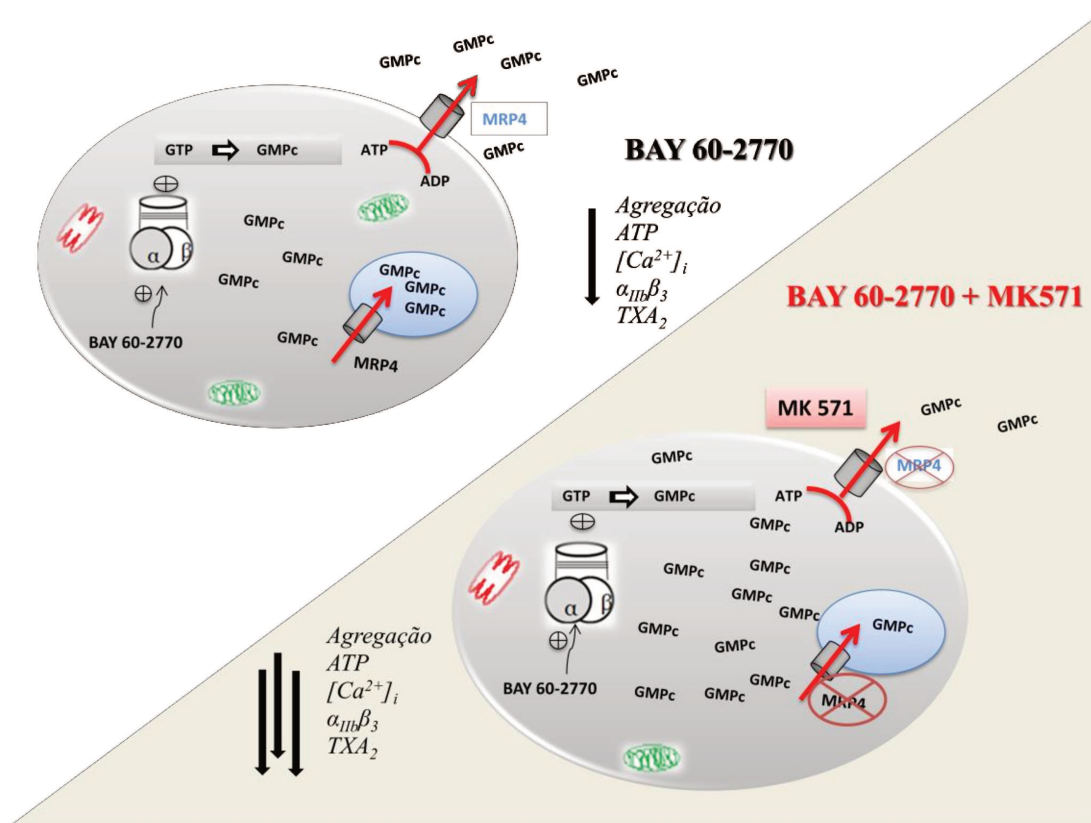


Figura 20. Efeito inibitório do BAY 60-2770 na ativação de plaquetas é potencializado pelo MK 571.

Sumário e Conclusão

- i. O pré tratamento com MK 571 potencializa o efeito inibitório do BAY 60-2770 na agregação plaquetária induzida por colágeno e trombina;
- ii. O pré tratamento com MK 571 potencializa o efeito inibitório do BAY 60-2770 na liberação de ATP em resposta ao colágeno e trombina;
- iii. O pré tratamento com MK 571 potencializa o efeito inibitório do BAY 60-2770 na produção de TXA₂ em resposta à trombina;
- iv. O pré tratamento com MK 571 potencializa os níveis intracelulares de GMPc, estimulados pelo BAY 60-2770 em plaquetas estimuladas com colágeno e trombina;
- v. O pré tratamento com MK 571 potencializa o efeito inibitório do BAY 60-2770 na liberação de Ca²⁺ intracelulares, mudança de conformação da $\alpha IIb\beta 3$, fosforilação do resíduo de serina 239 da VASP.
- vi. Em conclusão, a associação do MK 571 ao BAY 60-2770 resulta em efeito antiplaquetário mais eficiente em virtude de superestimulação da via NO-GCs-GMPc. Portanto, esta associação parece ter potencial na terapêutica antiplaquetária visando um tratamento efetivo com o uso de concentrações mínimas de cada molécula.

Referências Bibliográficas

1. Deutsch VR, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. Br J Haematol. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2006 Sep;134(5):453-66.
2. Hartwig JH, Barkalow K, Azim A, Italiano J. The elegant platelet: signals controlling actin assembly. Thromb Haemost. 1999 Aug;82(2):392-8.
3. Harker LA. Kinetics of Platelet Production and Destruction in Man. Clin Haematol. 1977;6(3):671-93.
4. Blockmans D, Deckmyn H, Vermynen J. Platelet activation. Blood Rev. 1995 Sep;9(3):143-56.
5. Bakry R, Sayed D, Galal H, Shaker S. Platelet function, activation and apoptosis during and after apheresis. Ther Apher Dial. 2010 Oct;14(5):457-64.
6. Levy-Toledano S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a 'hierarchy'? Haemostasis. 1999 Sep;29(1):4-15.
7. Holmsen H, Weiss HJ. Secretory storage pools in platelets. Annu Rev Med. 1979;30:119-34.
8. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. Platelets. 2001 Aug;12(5):261-73.
9. Adam F, Verbeuren TJ, Fauchere JL, Guillin MC, Jandrot-Perrus M. Thrombin-induced platelet PAR4 activation: role of glycoprotein Ib and ADP. J Thromb Haemost. 2003 Apr;1(4):798-804.
10. Alberio L, Dale GL. Review article: platelet-collagen interactions: membrane receptors and intracellular signalling pathways. Eur J Clin Invest. 1999 Dec;29(12):1066-76.
11. Bergmeier W, Stefanini L. Novel molecules in calcium signaling in platelets. J Thromb Haemost. 2009 Jul;7 Suppl 1:187-90.
12. Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge JS. Adhesive signaling in platelets. Curr Opin Cell Biol. 1994 Oct;6(5):695-704.
13. Zeng S, Yi FX, Guo ZG. Platelet activating factor-induced P-selectin expression in platelets and its related signal transduction. Zhongguo Yao Li Xue Bao. 1999 Oct;20(10):948-50.

14. Ohkubo S, Nakahata N, Ohizumi Y. Thromboxane A₂ stimulates mitogen-activated protein kinase and arachidonic acid liberation in rabbit platelets. *Prostaglandins*. 1996 Nov;52(5):403-13.
15. Paul BZ, Jin J, Kunapuli SP. Molecular mechanism of thromboxane A₂-induced platelet aggregation. Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors. *J Biol Chem*. 1999 Oct 8;274(41):29108-14.
16. Bouchard BA, Catcher CS, Thrash BR, Adida C, Tracy PB. Effector cell protease receptor-1, a platelet activation-dependent membrane protein, regulates prothrombinase-catalyzed thrombin generation. *J Biol Chem*. 1997 Apr 4;272(14):9244-51.
17. Inoue K, Ozaki Y, Satoh K, Wu Y, Yatomi Y, Shin Y, et al. Signal transduction pathways mediated by glycoprotein Ia/IIa in human platelets: comparison with those of glycoprotein VI. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Mar 5;256(1):114-20.
18. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*. 1995 Apr 14;268(5208):233-9.
19. Calvete JJ. Platelet integrin GPIIb/IIIa: structure-function correlations. An update and lessons from other integrins. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999 Oct;222(1):29-38.
20. Savage B, Shattil SJ, Ruggeri ZM. 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*. 1992 Jun 5;267(16):11300-6.
21. O'Brien KA, Stojanovic-Terpo A, Hay N, Du X. An important role for Akt3 in platelet activation and thrombosis. *Blood*. 2011 Oct 13;118(15):4215-23.
22. Jantzen HM, Gousset L, Bhaskar V, Vincent D, Tai A, Reynolds EE, et al. Evidence for two distinct G-protein-coupled ADP receptors mediating platelet activation. *Thromb Haemost*. 1999 Jan;81(1):111-7.
23. Soulet C, Hechler B, Gratacap MP, Plantavid M, Offermanns S, Gachet C, et al. A differential role of the platelet ADP receptors P2Y₁ and P2Y₁₂ in Rac activation. *J Thromb Haemost*. 2005 Oct;3(10):2296-306.
24. Kim S, Kunapuli SP. P2Y₁₂ receptor in platelet activation. *Platelets*. 2011;22(1):54-8.
25. Gandhi PS, Chen Z, Appelbaum E, Zapata F, Di Cera E. Structural basis of thrombin-protease-activated receptor interactions. *IUBMB Life*. 2011 Jun;63(6):375-82.

26. Fälker K HL, Gunnarsson P, Nylander M, Lindahl TL, Grenegård M. Protease-activated receptor 1 (PAR1) signalling desensitization is counteracted via PAR4 signalling in human platelets. *Biochem J* 2011;436:469–80.
27. Kim S, Foster C, Lecchi A, Quinton TM, Prosser DM, Jin J, et al. Protease-activated receptors 1 and 4 do not stimulate G(i) signaling pathways in the absence of secreted ADP and cause human platelet aggregation independently of G(i) signaling. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3629-36.
28. Lazarowski ER, Lapetina EG. Persistent activation of platelet membrane phospholipase C by proteolytic action of trypsin and thrombin. *Arch Biochem Biophys*. 1990 Jan;276(1):265-9.
29. Naitoh K, Hosaka Y, Honda M, Ogawa K, Shirakawa K, Furusako S. Properties of soluble glycoprotein VI, a potential platelet activation biomarker. *Platelets*. 2014 Dec 30:1-6.
30. Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J Mol Med*. 2011 Feb;89(2):109-21.
31. Nuytens BP, Thijs T, Deckmyn H, Broos K. Platelet adhesion to collagen. *Thromb Res*. 2011 Jan;127 Suppl 2:S26-9.
32. Pleines I, Elvers M, Strehl A, Pozgajova M, Varga-Szabo D, May F, et al. Rac1 is essential for phospholipase C-gamma2 activation in platelets. *Pflugers Arch*. 2009 Mar;457(5):1173-85.
33. Tello-Montoliu A, Jover E, Rivera J, Valdes M, Angiolillo DJ, Marin F. New perspectives in antiplatelet therapy. *Curr Med Chem*. 2012;19(3):406-27.
34. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Mar;28(3):403-12.
35. Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2011 Jul;9 Suppl 1:92-104.
36. Shattil SJ. Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb Haemost*. 1999 Aug;82(2):318-25.
37. Buensuceso CS, Arias-Salgado EG, Shattil SJ. Protein-protein interactions in platelet alphaIIbbeta3 signaling. *Semin Thromb Hemost*. 2004 Aug;30(4):427-39.
38. Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2009 Jul;7(7):1057-66.
39. Harper MT, Poole AW. Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. *J Thromb Haemost*. 2010 Mar;8(3):454-62.

40. Chernovets TS, Mazhul VN. [Mechanisms of the protease-induced aggregation of human platelets]. *Biofizika*. 2007 Jul-Aug;52(4):674-80.
41. Obergfell A, Eto K, Mocsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, et al. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with α IIb β 3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol*. 2002 Apr 15;157(2):265-75.
42. Peerschke EI. Maintenance of GPIIb-IIIa avidity supporting "irreversible" fibrinogen binding is energy-dependent. *J Lab Clin Med*. 1999 Oct;134(4):398-404.
43. Unsworth AJ, Smith H, Gissen P, Watson SP, Pears CJ. Submaximal inhibition of protein kinase C restores ADP-induced dense granule secretion in platelets in the presence of Ca^{2+} . *J Biol Chem*. 2011 Apr 13.
44. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul;4(7):517-29.
45. Rink TJ, Sage SO. Calcium signaling in human platelets. *Annu Rev Physiol*. 1990;52:431-49.
46. Berridge MJ. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol*. 2008 Nov 1;586(Pt 21):5047-61.
47. Jardin I, Lopez JJ, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA. Intracellular calcium release from human platelets: different messengers for multiple stores. *Trends Cardiovasc Med*. 2008 Feb;18(2):57-61.
48. Lopez JJ, Camello-Almaraz C, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA. Ca^{2+} accumulation into acidic organelles mediated by Ca^{2+} - and vacuolar H^{+} -ATPases in human platelets. *Biochem J*. 2005 Aug 15;390(Pt 1):243-52.
49. Cosemans JM, Schols SE, Stefanini L, de Witt S, Feijge MA, Hamulyak K, et al. Key role of glycoprotein Ib/V/IX and von Willebrand factor in platelet activation-dependent fibrin formation at low shear flow. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):651-60.
50. Kim S, Mangin P, Dangelmaier C, Lillian R, Jackson SP, Daniel JL, et al. Role of phosphoinositide 3-kinase beta in glycoprotein VI-mediated Akt activation in platelets. *J Biol Chem*. 2009 Dec 04;284(49):33763-72.
51. Adam F, Kauskot A, Rosa JP, Bryckaert M. Mitogen-activated protein kinases in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2008 Dec;6(12):2007-16.
52. Flevaris P, Li Z, Zhang G, Zheng Y, Liu J, Du X. Two distinct roles of mitogen-activated protein kinases in platelets and a novel Rac1-MAPK-dependent integrin outside-in retractile signaling pathway. *Blood*. 2009 Jan 22;113(4):893-901.

53. Kauskot A, Adam F, Mazharian A, Ajzenberg N, Berrou E, Bonnefoy A, et al. Involvement of the mitogen-activated protein kinase c-Jun NH₂-terminal kinase 1 in thrombus formation. *J Biol Chem*. 2007 Nov 02;282(44):31990-9.
54. Canault M, Duerschmied D, Brill A, Stefanini L, Schatzberg D, Cifuni SM, et al. p38 mitogen-activated protein kinase activation during platelet storage: consequences for platelet recovery and hemostatic function in vivo. *Blood*. 2010 Mar 4;115(9):1835-42.
55. Li Z, Ajdic J, Eigenthaler M, Du X. A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans. *Blood*. 2003 Jun 1;101(11):4423-9.
56. Wilhelm B, Siess W. Activation of the cloned platelet thrombin receptor decreases the pertussis-toxin-dependent ADP-ribosylation of the membrane and soluble inhibitory guanine-nucleotide-binding- α proteins. Inhibition by the prostacyclin analog, iloprost. *Eur J Biochem*. 1993 Aug 15;216(1):81-8.
57. Lessiani G, Vazzana N, Cuccurullo C, Di Michele D, Laurora G, Sgro G, et al. Inflammation, oxidative stress and platelet activation in aspirin-treated critical limb ischaemia: beneficial effects of iloprost. *Thromb Haemost*. 2011 Feb 1;105(2):321-8.
58. Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, Honig-Liedl P, Jarchau T, Hoschuetzky H, 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*. 1998 Aug 7;273(32):20029-35.
59. Horstrup K, Jablonka B, Honig-Liedl P, Just M, Kochsiek K, Walter U. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem*. 1994 Oct 1;225(1):21-7.
60. Massberg S, Gruner S, Konrad I, Garcia Arguinzonis MI, Eigenthaler M, Hemler K, et al. Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood*. 2004 Jan 1;103(1):136-42.
61. Walter U, Eigenthaler M, Geiger J, Reinhard M. Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets. *Adv Exp Med Biol*. 1993;344:237-49.
62. Rothkegel C, Schmidt PM, Stoll F, Schroder H, Schmidt HH, Stasch JP. Identification of residues crucially involved in soluble guanylate cyclase activation. *FEBS Lett*. 2006 Jul 24;580(17):4205-13.

63. Priora R, Margaritis A, Frosali S, Coppo L, Summa D, Di Giuseppe D, et al. In vitro inhibition of human and rat platelets by NO donors, nitrosoglutathione, sodium nitroprusside and SIN-1, through activation of cGMP-independent pathways. *Pharmacol Res.* 2011 Sep;64(3):289-97.
64. Danielewski O, Schultess J, Smolenski A. The NO/cGMP pathway inhibits Rap 1 activation in human platelets via cGMP-dependent protein kinase I. *Thromb Haemost.* 2005 Feb;93(2):319-25.
65. Keh D, Gerlach M, Kurer I, Seiler S, Kerner T, Falke KJ, et al. The effects of nitric oxide (NO) on platelet membrane receptor expression during activation with human alpha-thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1996 Sep;7(6):615-24.
66. Pernollet MG, Lantoine F, Devynck MA. Nitric oxide inhibits ATP-dependent Ca^{2+} uptake into platelet membrane vesicles. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 May 24;222(3):780-5.
67. Mayer B, Pfeiffer S, Schrammel A, Koesling D, Schmidt K, Brunner F. A new pathway of nitric oxide/cyclic GMP signaling involving S-nitrosoglutathione. *J Biol Chem.* 1998 Feb 6;273(6):3264-70.
68. Trepakova ES, Cohen RA, Bolotina VM. Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase-dependent refilling of Ca^{2+} stores. *Circ Res.* 1999 Feb 5;84(2):201-9.
69. Feelisch M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol Biochem Behav.* 1998;358:113-22.
70. Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol.* 1995 Aug;48(2):184-8.
71. Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol.* 1996 Jul;50(1):1-5.
72. Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Sep;5(9):755-68.
73. Schmidt PM, Schramm M, Schroder H, Wunder F, Stasch JP. Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem.* 2004 Jan 23;279(4):3025-32.

74. Stasch JP, Hobbs AJ. NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handb Exp Pharmacol*. 2009(191):277-308.
75. Schmidt HH, Schmidt PM, Stasch JP. NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. *Handb Exp Pharmacol*. 2009(191):309-39.
76. Schmidt K, Schrammel A, Koesling D, Mayer B. Molecular mechanisms involved in the synergistic activation of soluble guanylyl cyclase by YC-1 and nitric oxide in endothelial cells. *Mol Pharmacol*. 2001 Feb;59(2):220-4.
77. Surmeli NB, Marletta MA. Insight into the rescue of oxidized soluble guanylate cyclase by the activator cinaciguat. *Chembiochem*. 2012 May 7;13(7):977-81.
78. Martin F, Baskaran P, Ma X, Dunten PW, Schaefer M, Stasch JP, et al. Structure of cinaciguat (BAY 58-2667) bound to Nostoc H-NOX domain reveals insights into heme-mimetic activation of the soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem*. 2010 Jul 16;285(29):22651-7.
79. Hoffmann LS, Schmidt PM, Keim Y, Schaefer S, Schmidt HH, Stasch JP. Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation. *Br J Pharmacol*. 2009 Jul;157(5):781-95.
80. Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, H SA, Meurer S, et al. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest*. 2006 Sep;116(9):2552-61.
81. Knorr A, Hirth-Dietrich C, Alonso-Alija C, Harter M, Hahn M, Keim Y, et al. Nitric oxide-independent activation of soluble guanylate cyclase by BAY 60-2770 in experimental liver fibrosis. *Arzneimittelforschung*. 2008;58(2):71-80.
82. Jones AW, Durante W, Korthuis RJ. Heme oxygenase-1 deficiency leads to alteration of soluble guanylate cyclase redox regulation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Oct;335(1):85-91.
83. Pankey EA, Bhartiya M, Badejo AM, Jr., Haider U, Stasch JP, Murthy SN, et al. Pulmonary and systemic vasodilator responses to the soluble guanylyl cyclase activator, BAY 60-2770, are not dependent on endogenous nitric oxide or reduced heme. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Mar;300(3):H792-802.
84. Mendes-Silverio CB, Leiria LO, Morganti RP, Anhe GF, Marcondes S, Monica FZ, et al. Activation of haem-oxidized soluble guanylyl cyclase with BAY 60-2770 in human platelets lead to overstimulation of the cyclic GMP signaling pathway. *PLoS One*. 2012;7(11):e47223.

85. Cole S, Bhardwaj G, Gerlach J, Mackie J, Grant C, Almquist K, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 1992;258(5088):1650-4.
86. Jedlitschky G, Greinacher A, Kroemer HK. Transporters in human platelets: physiologic function and impact for pharmacotherapy. *Blood*. 2012 Apr 12;119(15):3394-402.
87. Jedlitschky G, Tirschmann K, Lubenow LE, Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Greinacher A, et al. The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage. *Blood*. 2004 Dec 1;104(12):3603-10.
88. Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem*. 2000 Sep 29;275(39):30069-74.
89. Copsel S, Bruzzone A, May M, Beyrath J, Wargon V, Cany J, et al. Multidrug resistance protein 4/ ATP binding cassette transporter 4: a new potential therapeutic target for acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2014 Oct 15;5(19):9308-21.
90. Hara Y, Sassi Y, Guibert C, Gambaryan N, Dorfmueller P, Eddahibi S, et al. Inhibition of MRP4 prevents and reverses pulmonary hypertension in mice. *J Clin Invest*. 2011 Jul;121(7):2888-97.
91. Decouture B, Dreano E, Belleville-Rolland T, Kuci O, Dizier B, Bazaa A, et al. Impaired platelet activation and cAMP homeostasis in MRP4-deficient mice. *Blood*. 2015 Oct 8;126(15):1823-30.
92. Mattiello T, Guerriero R, Lotti LV, Trifiro E, Felli MP, Barbarulo A, et al. Aspirin extrusion from human platelets through multidrug resistance protein-4-mediated transport: evidence of a reduced drug action in patients after coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Aug 9;58(7):752-61.
93. Borgognone A, Pulcinelli FM. Reduction of cAMP and cGMP inhibitory effects in human platelets by MRP4-mediated transport. *Thromb Haemost*. 2012 Nov;108(5):955-62.
94. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Mar;9(3):215-36.
95. Hagos FT, Daood MJ, Ocque JA, Nolin TD, Bayir H, Poloyac SM, et al. Probenecid, an organic anion transporter 1 and 3 inhibitor, increases plasma and brain exposure of N-acetylcysteine. *Xenobiotica*. 2017;47(4):346-53.

96. Sinha C, Ren A, Arora K, Moon CS, Yarlagadda S, Zhang W, et al. Multi-drug resistance protein 4 (MRP4)-mediated regulation of fibroblast cell migration reflects a dichotomous role of intracellular cyclic nucleotides. *J Biol Chem*. 2013 Feb 8;288(6):3786-94.
97. Carillion A, Feldman S, Jiang C, Atassi F, Na N, Mougenot N, et al. Overexpression of cyclic adenosine monophosphate effluent protein MRP4 induces an altered response to beta-adrenergic stimulation in the senescent rat heart. *Anesthesiology*. 2015 Feb;122(2):334-42.
98. Tchernychev B, Ge P, Kessler MM, Solinga RM, Wachtel D, Tobin JV, et al. MRP4 Modulation of the Guanylate Cyclase-C/cGMP Pathway: Effects on Linaclotide-Induced Electrolyte Secretion and cGMP Efflux. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015 Oct;355(1):48-56.
99. Belleville-Rolland T, Sassi Y, Decouture B, Dreano E, Hulot JS, Gaussem P, et al. MRP4 (ABCC4) as a potential pharmacologic target for cardiovascular disease. *Pharmacol Res*. [Review]. 2016 May;107:381-9.
100. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985 Mar 25;260(6):3440-50.
101. Hwang TL, Hung HW, Kao SH, Teng CM, Wu CC, Cheng SJ. Soluble guanylyl cyclase activator YC-1 inhibits human neutrophil functions through a cGMP-independent but cAMP-dependent pathway. *Mol Pharmacol*. 2003 Dec;64(6):1419-27.
102. Walter U, Gambaryan S. cGMP and cGMP-dependent protein kinase in platelets and blood cells. *Handb Exp Pharmacol*. 2009(191):533-48.
103. Cossemans JM, Munnix IC, Wetzker R, Heller R, Jackson SP, Heemskerk JW. Continuous signaling via PI3K isoforms beta and gamma is required for platelet ADP receptor function in dynamic thrombus stabilization. *Blood*. 2006 Nov 01;108(9):3045-52.
104. Lien LM, Chen ZC, Chung CL, Yen TL, Chiu HC, Chou DS, et al. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) regulates thrombus formation in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol*. 2014 Aug 15;737:159-67.
105. Roger S, Paysant J, Badier-Commander C, Cordi A, Verbeuren TJ, Feletou M. Anti-aggregating effect of BAY 58-2667, an activator of soluble guanylyl cyclase. *Vascul Pharmacol*. 2010 Nov-Dec;53(5-6):281-7.
106. Stasch JP, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, Minuth T, et al. Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. *Br J Pharmacol*. 2002 Jan;135(2):333-43.

107. Aszodi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, et al. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J*. 1999 Jan 4;18(1):37-48.
108. Feijge MA, Ansink K, Vanschoonbeek K, Heemskerk JW. Control of platelet activation by cyclic AMP turnover and cyclic nucleotide phosphodiesterase type-3. *Biochem Pharmacol*. 2004 Apr 15;67(8):1559-67.
109. Smolenski A. Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2012 Feb;10(2):167-76.
110. Mendelev NN, Williams VS, Tulis DA. Antigrowth properties of BAY 41-2272 in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009 Feb;53(2):121-31.
111. Joshi CN, Martin DN, Fox JC, Mendelev NN, Brown TA, Tulis DA. The soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 inhibits vascular smooth muscle growth through the cAMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent protein kinase pathways. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011 Nov;339(2):394-402.
112. Li Z, Zhang G, Marjanovic JA, Ruan C, Du X. A platelet secretion pathway mediated by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 2004 Oct 8;279(41):42469-75.
113. Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, et al. Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med*. 1999 Apr 19;189(8):1255-64.
114. Surin WR, Barthwal MK, Dikshit M. Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. *Thromb Res*. 2008;122(6):786-803.
115. Molino M, Bainton DF, Hoxie JA, Coughlin SR, Brass LF. Thrombin receptors on human platelets. Initial localization and subsequent redistribution during platelet activation. *J Biol Chem*. 1997 Feb 28;272(9):6011-7.
116. Brass LF. Thrombin and platelet activation. *Chest*. 2003 Sep;124(3 Suppl):18S-25S.
117. Varga-Szabo D, Authi KS, Braun A, Bender M, Ambily A, Hassock SR, et al. Store-operated Ca(2+) entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1. *Pflugers Arch*. 2008 Nov;457(2):377-87.
118. Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol*. 2001 Nov 1;62(9):1153-61.

119. Jardin I, Lopez JJ, Redondo PC, Salido GM, Rosado JA. Store-operated Ca^{2+} entry is sensitive to the extracellular Ca^{2+} concentration through plasma membrane STIM1. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Oct;1793(10):1614-22.
120. Payraastre B, Missy K, Trumel C, Bodin S, Plantavid M, Chap H. The integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ in human platelet signal transduction. *Biochem Pharmacol*. 2000 Oct 15;60(8):1069-74.
121. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Dec;30(12):2341-9.
122. Brune B, Ullrich V. Cyclic nucleotides and intracellular-calcium homeostasis in human platelets. *Eur J Biochem*. 1992 Jul 15;207(2):607-13.
123. Riba R, Sharifi M, Farndale RW, Naseem KM. Regulation of platelet guanylyl cyclase by collagen: evidence that Glycoprotein VI mediates platelet nitric oxide synthesis in response to collagen. *Thromb Haemost*. 2005 Aug;94(2):395-403.
124. Chen J, De S, Damron DS, Chen WS, Hay N, Byzova TV. Impaired platelet responses to thrombin and collagen in AKT-1-deficient mice. *Blood*. 2004 Sep 15;104(6):1703-10.
125. Roger S, Pawlowski M, Habib A, Jandrot-Perrus M, Rosa JP, Bryckaert M. Costimulation of the G_i -coupled ADP receptor and the G_q -coupled TXA_2 receptor is required for ERK2 activation in collagen-induced platelet aggregation. *FEBS Lett*. 2004 Jan 2;556(1-3):227-35.
126. Nadal F, Levy-Toledano, Francoise Grelac, Jacques P. Caen, Jean-Philippe Rosa, Bryckaert M. Negative Regulation of Mitogen-activated Protein Kinase Activation by Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ in Platelets. *The journal of Biological Chemistry*. [communication]. 1997;272(0509):22382-4.
127. Begonja AJ, Geiger J, Rukoyatkina N, Rauchfuss S, Gambaryan S, Walter U. Thrombin stimulation of p38 MAP kinase in human platelets is mediated by ADP and thromboxane A_2 and inhibited by cGMP/cGMP-dependent protein kinase. *Blood*. 2007;109(2):616-8.
128. Li Z, Zhang G, Feil R, Han J, Du X. Sequential activation of p38 and ERK pathways by cGMP-dependent protein kinase leading to activation of the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$. *Blood*. 2006;107(3):965-72.
129. Lee YM, Chen WF, Chou DS, Jayakumar T, Hou SY, Lee JJ, et al. Cyclic nucleotides and mitogen-activated protein kinases: regulation of simvastatin in platelet activation. *J Biomed Sci*. 2010;17:45.

Anexos

9.1. Protocolo CAAE: n.º 46832315.8.0000.5404 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Humana.

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da associação do MK571 (um inibidor de MPR4) e BAY 60-2770 (ativador da Guanilil ciclase solúvel) na função plaquetária humana, novas perspectivas na terapêutica cardiovascular

Pesquisador: Camila Bitencourt Mendes Silvério

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 46832315.8.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_533555.pdf	04/01/2016 08:43:18		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	cartaresposta.pdf	04/01/2016 08:42:46	Camila Bitencourt Mendes Silvério	Aceito
Declaração de Pesquisadores	farmacos.pdf	16/12/2015 15:55:04	Camila Bitencourt Mendes Silvério	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	infraestrutura.pdf	16/12/2015 15:52:54	Camila Bitencourt Mendes Silvério	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	16/12/2015 15:52:14	Camila Bitencourt Mendes Silvério	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	16/12/2015 15:51:45	Camila Bitencourt Mendes Silvério	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEfinal.pdf	16/12/2015 15:51:00	Camila Bitencourt Mendes Silvério	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	09/10/2015 09:21:10	Camila Bitencourt Mendes Silvério	Aceito
Folha de Rosto	FRatualizado.pdf	09/10/2015 08:59:29	Camila Bitencourt Mendes Silvério	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

9.2. Termo de consentimento livre e esclarecido (modelo)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**ATIVAÇÃO DA GUANILIL CICLASE SOLÚVEL ASSOCIADA À INIBIÇÃO DA
PROTEÍNA DE RESISTÊNCIA A MULTIDROGAS-4 (MRP4) COMO ESTRATÉGIA
ANTIPLAQUETÁRIA EM HUMANOS**

Responsável pela pesquisa

Camila B. M. Silverio (camilabmendes@yahoo.com.br)

Departamento de Farmacologia

Faculdade de Ciências Médicas

UNICAMP CP6111

13084-971

Campinas (SP)

Fone: (19) 3521-9557

Número do CAAE: 46832315.8.0000.5404

Por ser considerado hígido você está sendo convidado a participar como voluntário de um estudo. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos e deveres como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houverem perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou quiser retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Justificativa e objetivos:

Entendemos que o mau funcionamento das plaquetas pode levar a sérios problemas cardiovasculares, fazendo-se necessário o estudo com novas drogas que atuam na ativação plaquetária. Assim o objetivo do estudo é investigar os efeitos induzidos pelo MK751 e BAY 60-2770 na agregação plaquetária, bem como o mecanismo de ação envolvido nestas respostas.

Procedimentos:

1. A participação neste estudo é voluntária e a recusa não terá qualquer prejuízo.
2. Será coletado da veia do braço 60 mL de sangue. A coleta será feita por profissional treinado e todo material utilizado será estéril e descartável.
3. As coletas não precisam ser programadas, ficando a critério do voluntário, novas coletas. É importante lembrar que as coletas devem ter um intervalo de no mínimo 1 mês.
4. O sangue coletado será imediatamente processado para a separação das plaquetas e, no mesmo dia, os ensaios experimentais serão realizados. Somente as plaquetas serão utilizadas; o material restante (outros tipos celulares) será tratado com hipoclorito de sódio antes do descarte em local específico para material biológico.
5. Ensaios que serão realizados: agregação Plaquetária, dosagem dos nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc), ensaio de mobilização citosólica de cálcio em plaquetas, Udança da conformação da integrina $\alpha IIb\beta 3$ (GPIIb/IIIa) e Western blotting.

Desconfortos e riscos:

Os riscos são mínimos: dor e hematoma local, resultantes do procedimento da coleta do sangue venoso periférico. Estes desconfortos passam rapidamente sendo tratados com medidas simples no próprio local. Somente farão uso de material descartável durante a coleta, que será efetuada por profissional devidamente treinado. Caso haja algum problema após a doação sanguínea para este estudo, você será encaminhado imediatamente serviço de Pronto Socorro da Unidade Hospitalar da Unicamp.

Benefícios:

Melhora da prevenção e tratamento da terapêutica cardiovascular da disfunção plaquetária.

Sigilo e privacidade:

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. É garantido ao voluntário o direito de buscar indenização caso se sinta prejudicado devido à sua participação neste estudo (Conforme itens IV.3.h e IV.4.h da Resolução CNS nº 466 de 2012).

Ressarcimento:

A participação neste estudo não tem nenhum ressarcimento financeiro ao participante.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com Camila B M Silverio, Departamento de Farmacologia /Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, Cep 13084-971, Campinas (SP) telefone: (19) 3521-9557 ou pelo email camilabmendes@yahoo.com.br.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação no estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter sido esclarecimento sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do (a) participante:

Data: ____/____/____.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do responsável)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma cópia deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Data: ____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)