



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

GUILHERME RUIZ LEONARDI

AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE PLAQUETÁRIA DE PACIENTES COM SÍNDROME
ANTIFOSFOLÍPIDE PRIMÁRIA TROMBÓTICA (t-PAPS): PAPEL DA VIA DE
SINALIZAÇÃO P2Y₁₂-AMPc

CAMPINAS

2024

GUILHERME RUIZ LEONARDI

AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE PLAQUETÁRIA DE PACIENTES COM SÍNDROME
ANTIFOSFOLÍPIDE PRIMÁRIA TROMBÓTICA (t-PAPS): PAPEL DA VIA DE
SINALIZAÇÃO P2Y₁₂-AMPc

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

ORIENTADORA: PROFA. DRA. FABIOLA TAUFIC MONICA IGLESIAS

COORIENTADORA: PROFA. DRA. FERNANDA LOUREIRO DE ANDRADE ORSI

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO GUILHERME RUIZ LEONARDI, E ORIENTADO PELA
PROFA. DRA. FABIOLA TAUFIC MONICA IGLESIAS E COORIENTADO PELA PROFA.
DRA. FERNANDA LOUREIRO DE ANDRADE ORSI.

CAMPINAS

2024

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

L553a Leonardi, Guilherme Ruiz, 1998-
Avaliação da reatividade plaquetária de pacientes com síndrome antifosfolípide primária trombótica (t-PAPS) : papel da via de sinalização P2Y₁₂-AMPc / Guilherme Ruiz Leonardi. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Fabíola Taufic Mónica Iglesias.
Coorientador: Fernanda Loureiro de Andrade Orsi.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Agregação plaquetária. 2. Síndrome antifosfolípídica. 3. Plasma rico em plaquetas. 4. Nucleotídeos cíclicos. 5. Cilostazol. I. Mónica, Fabíola Zakia, 1980-. II. Orsi, Fernanda Loureiro de Andrade, 1975-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Evaluation of platelet reactivity in patients with thrombotic primary antiphospholipid syndrome (t-PAPS) : role of the P2Y₁₂-cAMP signaling pathway

Palavras-chave em inglês:

Platelet aggregation

Antiphospholipid syndrome

Platelet-rich plasma

Nucleotides, Cyclic

Cilostazol

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Fabiola Taufic Monica Iglesias

Patricia Moriel

Lediane Lagalo Miguel Teles

Eugenio Damaceno Hottz

Ivani Aparecida de Souza

Data de defesa: 17-04-2024

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3003-4194>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8094201138437750>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

GUILHERME RUIZ LEONARDI

ORIENTADORA: FABIOLA TAUFIC MONICA IGLESIAS

COORIENTADORA: FERNANDA LOUREIRO DE ANDRADE ORSI

MEMBROS TITULARES:

1. PROFA. DRA. FABIOLA TAUFIC MONICA IGLESIAS

2. PROFA. DRA. PATRICIA MORIEL

3. PROFA. DRA. LEDIANA IAGALO MIGUEL TELES

4. PROF. DR. EUGENIO DAMACENO HOTTZ

5. PROFA. DRA. IVANI APARECIDA DE SOUZA

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 encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 17/04/2024

DEDICATÓRIA

A **Deus**, pela saúde, capacidade e segurança durante todo o caminho percorrido, inclusive nos momentos mais difíceis.

A minha família, em especial, meus pais **José Luiz e Rosângela**, que sempre estiveram ao meu lado, durante toda a vida.

A minha esposa, **Geovanna**, pela constante presença ao meu lado durante esta etapa.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Departamento de Farmacologia e ao Centro de Hematologia e Hemoterapia, pela oportunidade de ingressar no doutorado e permitirem a completa realização do projeto de pesquisa.

A minha orientadora, Prof.^a Dra. Fabíola Taufic Mónica Iglesias, e a minha co-Orientadora, Prof.^a Dra. Fernanda Loureiro de Andrade Orsi, pela confiança, ensinamentos e presença ativa ao longo de todo o trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, pela companhia diária e ajuda indispensável no desenvolvimento do projeto.

Aos funcionários e professores da Universidade Estadual de Campinas, pelo suporte e cuidado nas mais diversas situações.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, 001, processo nº 88887.572112/2020-00) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processos nº 2018/21880-2 e 2017/15175-1) pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro, permitindo assim, a realização do projeto em sua integridade.

RESUMO

Introdução: A síndrome antifosfolípide (SAF) é uma doença autoimune sistêmica caracterizada pela presença persistente de anticorpos antifosfolípidos no plasma e apresenta como principais manifestações clínicas a trombose vascular, de origem arterial ou venosa, e as complicações obstétricas. **Objetivo:** Avaliar a agregação plaquetária em pacientes com SAF primária trombótica e caracterizar as vias de sinalização purinérgica e dos nucleotídeos cíclicos. **Metodologia:** Quarenta voluntários com SAF primária trombótica (62,5% mulheres) e 62 voluntários sem histórico de trombose (64,5% mulheres) foram incluídos. Primeiramente, o plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido e estimulado com difosfato de adenosina (ADP, 3 ou 10 μM), colágeno (1 $\mu\text{g/ml}$) ou ácido araquidônico (AA, 300 μM), na presença e ausência dos respectivos inibidores e fármacos antiplaquetários: nitroprussiato de sódio (SNP, 3 ou 10 μM), iloprost (ILO, 3 ou 10 nM) e ticagrelor (2 μM). Em seguida, a plaqueta lavada (PL) de pacientes com SAF foi obtida para a quantificação do receptor P2Y₁₂ e dos nucleotídeos cíclicos. Em outro ensaio, a PL de voluntários saudáveis foi incubada com anticorpos IgG (500 $\mu\text{g/ml}$) isolados do soro de voluntários saudáveis ou pacientes com SAF e então estimulada com ADP 30 μM na presença e ausência dos mesmos inibidores e fármacos antiplaquetários. **Resultados:** A agregação induzida pelo ADP foi significativamente maior no PRP obtido de pacientes com SAF do que no controle. A expressão proteica do receptor P2Y₁₂ e da Gs alfa foi significativamente maior e menor, respectivamente, na PL de pacientes com SAF. No PRP incubado com ILO ou SNP, a reatividade plaquetária residual induzida pelo ADP foi ainda maior no PRP de pacientes com SAF do que no controle. Níveis intracelulares mais baixos de AMPc e GMPc foram observados no PRP não estimulado de pacientes com SAF. A expressão proteica das subunidades da guanilato ciclase solúvel e das fosfodiesterases tipos 3 e 5 não diferiu. A atividade antiplaquetária do ticagrelor foi semelhante entre os grupos e o cilostazol potencializou significativamente essa resposta. Anticorpos antifosfolípidos isolados obtidos de pacientes com SAF potencializaram a agregação induzida por ADP em plaquetas saudáveis, mas não afetaram as respostas inibitórias induzidas por SNP ou ILO. **Conclusão:** As plaquetas isoladas de pacientes com SAF primária trombótica apresentaram alteração na via P2Y₁₂ – AMPc e nos níveis intracelulares de GMPc. Além disso, o estudo abre a possibilidade para avaliar a eficácia e segurança da terapia com ticagrelor, isolado ou em associação com o cilostazol, em pacientes com SAF e trombose arterial que sejam resistentes ou intolerantes à aspirina.

Palavras-chave: Agregação plaquetária; Síndrome antifosfolípida; Plasma rico em plaquetas; Nucleotídeos cíclicos; Cilostazol.

ABSTRACT

Introduction: Antiphospholipid syndrome (APS) is a systemic autoimmune disease characterized by the persistent presence of antiphospholipid antibodies in the plasma, with its main clinical manifestations being vascular thrombosis of arterial or venous origin and obstetric complications. **Objective:** To evaluate platelet aggregation in patients with primary thrombotic APS and characterize the purinergic signaling pathways and cyclic nucleotides. **Methodology:** Forty volunteers with primary thrombotic APS (62.5% women) and 62 volunteers without a history of thrombosis (64.5% women) were included. Firstly, platelet-rich plasma (PRP) was obtained and stimulated with adenosine diphosphate (ADP, 3 or 10 μM), collagen (1 $\mu\text{g/ml}$), or arachidonic acid (AA, 300 μM), in the presence and absence of respective inhibitors and antiplatelet drugs: sodium nitroprusside (SNP, 3 or 10 μM), iloprost (ILO, 3 or 10 nM), and ticagrelor (2 μM). Then, washed platelets (WP) from APS patients were obtained for quantification of the P2Y₁₂ receptor and cyclic nucleotides. In another assay, WP from healthy volunteers were incubated with IgG antibodies (500 $\mu\text{g/ml}$) isolated from the serum of healthy volunteers or APS patients and then stimulated with ADP 30 μM in the presence and absence of the same inhibitors and antiplatelet drugs. **Results:** ADP-induced aggregation was significantly higher in PRP obtained from APS patients compared to controls. Protein expression of the P2Y₁₂ receptor and Gs alpha was significantly higher and lower, respectively, in WP from APS patients. In PRP incubated with ILO or SNP, residual platelet reactivity induced by ADP was even higher in PRP from APS patients compared to controls. Lower intracellular levels of cAMP and cGMP were observed in unstimulated PRP from APS patients. Protein expression of soluble guanylate cyclase subunits and phosphodiesterase types 3 and 5 did not differ. Ticagrelor's antiplatelet activity was similar between groups, and cilostazol significantly potentiated this response. Antiphospholipid antibodies isolated from APS patients potentiated ADP-induced aggregation in healthy platelets but did not affect inhibitory responses induced by SNP or ILO. **Conclusion:** Platelets isolated from patients with primary thrombotic APS showed alterations in the P2Y₁₂ – cAMP pathway and intracellular levels of cGMP. Furthermore, the study opens the possibility to evaluate the efficacy and safety of ticagrelor therapy, alone or in combination with cilostazol, in APS patients with arterial thrombosis who are resistant or intolerant to aspirin.

Keywords: Platelet aggregation; Antiphospholipid Syndrome; Platelet-rich plasma; Nucleotides, Cyclic; Cilostazol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Oxidação e dimerização da β 2-glicoproteína I na contribuição ao desenvolvimento de eventos trombóticos na SAF

Figura 2: Via imuno-trombo-aterogênica na SAF

Figura 3: Interação do complexo β 2-GPI/anticorpo antifosfolípide com receptores plaquetários

Figura 4: Via de sinalização do agonista ADP e dos mediadores inibitórios (PGI_2 e NO) nas plaquetas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Ácido araquidônico
AAS: Ácido acetilsalicílico
ACR: Colégio Americano de Reumatologia
ADP: Adenosina difosfato
AINE: Anti-inflamatório não esteroide
AMP: Adenosina monofosfato cíclica
AMPc: Adenosina monofosfato cíclico
ApoER2: Receptor 2 da Apolipoproteína E
AVC: Acidente vascular cerebral
COX: Enzima ciclooxigenase
DOACs: Anticoagulantes Orais Diretos
eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial
EPI: Embolia pulmonar isolada
EULAR: Aliança Europeia de Associações de Reumatologia
FT: Fator tecidual
GCs: Guanilato ciclase solúvel
GMPc: Guanosina monofosfato cíclico
GPIIb/IIIa: Glicoproteína tipo IIb/IIIa
GPIIb/IIIa: Glicoproteína IIb/IIIa
GPVI: Glicoproteína VI
G α : Fração alfa da proteína Gs
ICAM-1: Molécula de adesão intercelular-1
IgG: Imunoglobulina G
IL-1 β : Interleucina 1 beta
IL-6: Interleucina 6
IL-8: Interleucina 8
kDa: Quilo-Dalton
LES: Lúpus eritematoso sistêmico
miRNAs: Micro-RNAs
NETs: Armadilha extracelular do neutrófilo
NF- κ B: Fator nuclear kappa B
NO: Óxido Nítrico
p38MAPK: Proteínas quinases ativadas por mitógenos p38
PAC-1: Complexo GPIIb/IIIa ativado
PAR: Receptor ativado por protease
PDE-3: Fosfodiesterase tipo 3
PDE-5: Fosfodiesterase tipo 5
PGI₂: Prostaglandina I₂
PKA: Proteína quinase A
PKG: Proteína quinase G
PL: Plaqueta lavada
PLATO: Estudo da inibição plaquetária e desfechos dos pacientes
PP2A: Proteína fosfatase 2A
PRP: Plasma rico em plaquetas
RNI: Razão normalizada internacional
ROS: Espécies reativas de oxigênio

SAF: Síndrome Antifosfolípide
SCA: Síndrome coronária aguda
sGC α : Guanilato ciclase solúvel fração alfa
sGC β : Guanilato ciclase solúvel fração beta
TEV: Tromboembolismo Venoso
TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
TP: Receptor de tromboxano
t-PAPS: Síndrome antifosfolípide primária trombótica
TVP: Trombose venosa profunda
TVPi: Trombose venosa profunda isolada
TXA₂: Tromboxano A₂
VASP: Fosfoproteína estimulada por vasodilatador
VCAM-1: Proteína de adesão celular vascular-1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDE	14
1.1.1. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA	14
1.1.2. CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	14
1.1.3. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS.....	15
1.1.4. TRATAMENTO	19
1.2. PLAQUETAS.....	20
1.2.1. CITOLOGIA E ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	20
1.2.2. AGONISTAS PLAQUETÁRIOS	21
1.2.3. MECANISMOS DE INIBIÇÃO PLAQUETÁRIA.....	22
1.2.4. PAPEL DAS PLAQUETAS NA TROMBOSE VENOSA	22
1.3. AGENTES ANTIPLAQUETÁRIOS AVALIADOS.....	23
1.3.1. ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	23
1.3.2. TICAGRELOR	23
1.3.3. CILOSTAZOL	24
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. OBJETIVO GERAL	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. METODOLOGIA	29
4.1. PARTICIPANTES.....	29
4.2. PLASMA RICO EM PLAQUETAS E PLAQUETA LAVADA.....	29
4.3. ENSAIOS FUNCIONAIS	29
4.4. QUANTIFICAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS.....	30
4.5. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	30
4.6. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IgG.....	31
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5. RESULTADOS	33
6. CONCLUSÃO.....	47
7. REFERÊNCIAS	48
ANEXO 1 – Parecer consubstanciado do CEP	53

ANEXO 2 – Permissão de uso dos direitos autorais	63
--------------------------------------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDE

1.1.1. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

A síndrome antifosfolípide (SAF) pode ser definida como uma doença autoimune sistêmica caracterizada pela presença persistente de anticorpos antifosfolípidos no plasma, tais como: anticardiolipina, anti- β 2 glicoproteína I e anticoagulante lúpico (1, 2). A SAF pode acometer o paciente de duas formas: i) a forma primária, quando ocorre de forma isolada, ou ii) secundária, quando ocorre em associação com outra doença autoimune, geralmente o lúpus eritematoso sistêmico (LES) (3).

A prevalência da SAF na população global está entre 1-5%, o equivalente a 50 casos a cada 100.000 pessoas por ano, enquanto a sua incidência equivale a aproximadamente 2 novos casos a cada 100.000 pessoas por ano (4, 5), além disso, sua taxa de mortalidade em alguns países da Europa está por volta de 10% a cada 10 anos (6). A SAF normalmente é diagnosticada em indivíduos abaixo dos 50 anos de idade, sendo que o diagnóstico é mais comum nas mulheres do que nos homens, com a proporção homem/mulher chegando a ser de 1:3,5 na SAF primária e 1:7 na forma secundária da doença associada ao LES (2, 7, 8). Trabalhos mostram que, aproximadamente, 13,5% dos pacientes com acidente vascular cerebral (AVC), 11% com infarto agudo do miocárdio e 9,5% com trombose venosa profunda (TVP) apresentam positividade para algum tipo de anticorpo antifosfolípide (4).

No entanto, a epidemiologia da SAF permanece pouco estudada, fazendo-se necessário o desenvolvimento de novos estudos populacionais de pacientes com idades diversas e diferentes origens étnicas.

1.1.2. CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Os critérios de diagnóstico da SAF foram estabelecidos durante o 8º Simpósio Internacional de Anticorpos Antifosfolípidos (9) e posteriormente revisados em um workshop realizado em Sydney, na Austrália, antes do 11º Congresso Internacional de Anticorpos Antifosfolípidos (10). Para o diagnóstico confirmatório, exige-se a presença de pelo menos um critério clínico e um critério laboratorial. Os critérios clínicos incluem a trombose venosa, arterial ou de

pequenos vasos, além dos casos de morbidade gestacional em mulheres. Já os critérios laboratoriais contemplam a positividade para um ou mais dos três principais anticorpos antifosfolípides, sendo chamado de triplo positivo o paciente que apresenta positividade para os três. No entanto, é essencial que o resultado positivo seja confirmado em um segundo teste, com intervalo de no mínimo 12 semanas em relação ao teste anterior, visto que a presença dos autoanticorpos deve ser persistente e não apenas transitória (9-10).

Em 2023, o Colégio Americano de Reumatologia (ACR) e a Aliança Europeia de Associações de Reumatologia (EULAR) estabeleceram um novo critério de classificação com o objetivo de aumentar a homogeneidade das coortes de pacientes com SAF nas futuras pesquisas sobre a doença, ponderando domínios clínicos e laboratoriais, agrupando hierarquicamente os pacientes e unindo aqueles com características similares. Porém, é importante ressaltar que os critérios de classificação não são “critérios diagnósticos” e, portanto, não devem ser utilizados para decisões diagnósticas e terapêuticas em ambientes clínicos (11).

As manifestações clínicas que definem a doença incluem: eventos de trombose vascular, de origem arterial ou venosa, e/ou complicações obstétricas (1, 12). O tromboembolismo venoso é o tipo mais comum de trombose, ocorrendo principalmente nas veias profundas dos membros inferiores (13), porém, os eventos de trombose arterial, que ocorrem majoritariamente na circulação arterial cerebral, costumam ser mais graves (13-14).

1.1.3. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na SAF ainda não foram completamente estabelecidos, entretanto, já é conhecido a participação de alguns mediadores e de algumas células em processos que podem contribuir para o desenvolvimento de eventos trombóticos (15-16). A β 2 glicoproteína I, sintetizada endogenamente nos hepatócitos, células endoteliais e trofoblastos, tem uma participação melhor esclarecida nos pacientes com SAF (3). Essa glicoproteína normalmente encontra-se no seu estado não imunogênico, ou seja, com os epítomos de ligação dos linfócitos B e T ocultos, porém, com o aumento da ocorrência do estresse oxidativo, que é demonstrado no paciente com SAF, ocorre

a manifestação desses epítomos críticos, permitindo a ligação da $\beta 2$ glicoproteína I com autoanticorpos circulantes, levando a formação de um imunocomplexo que induz a ativação de vias de sinalização intracelulares e a produção de mediadores pró-trombóticos (Figura 1) (14, 17).

O imunocomplexo formado é o principal componente da fisiopatologia da imuntrombose na SAF (Figura 2). Este imunocomplexo interage com as células endoteliais, através do receptor 2 da Apolipoproteína E (ApoER2), e induz um aumento da atividade da fosfatase PP2A, enzima responsável pela desfosforilação da serina 1179 da sintetase de óxido nítrico endotelial (eNOS), o que ocasiona, portanto, a redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) endotelial (18-19). Além disso, as células endoteliais também são estimuladas a liberarem moléculas de adesão (E-selectina, VCAM-1, ICAM-1), citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α), micropartículas e fator tecidual (FT), sendo o último responsável pela ativação dos fatores IX e X da cascata de coagulação e produzido com maior intensidade através da interação dos anticorpos antifosfolípidos com as células endoteliais. Além disso, sua atividade funcional (ativação dos fatores VII e X), também se encontra aumentada nos pacientes que apresentam esses autoanticorpos (20), sendo observado aumento na ativação da p38MAPK e na translocação do NF- κ B quando há maior liberação de FT pelas células endoteliais (21-22). O imunocomplexo também pode promover a ativação de monócitos, ativação da via clássica do sistema complemento, formação de armadilha extracelular de neutrófilos (NETs), produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e resistência a fibrinólise (por meio da inativação da plasmina e do ativador de plasminogênio tecidual) (22).

Atualmente, vários biomarcadores genéticos e epigenéticos foram identificados como sendo especificamente associado às principais características clínicas dos pacientes com SAF, no entanto, nenhum estudo demonstrou quais que tinham uma maior associação com os maiores riscos de trombose. Assim, foi possível identificar um perfil gênico específico em monócitos de pacientes com SAF, além de identificar dois miRNAs (miR-19b/miR-20a) como potenciais moduladores do fator tecidual (23).

A ativação plaquetária mediada pelos anticorpos antifosfolípides é considerada um fator relevante nos mecanismos pró-coagulantes, ocorrendo através da ativação de receptores plaquetários e pelo fornecimento de uma superfície plaquetária favorável as reações de coagulação (24). É justamente o imunocomplexo formado entre os anticorpos antifosfolípides e a $\beta 2$ glicoproteína I, muitas vezes com a participação do fator plaquetário 4, que tem a capacidade de se ligar e ativar a glicoproteína Ib alfa ($GPIb\alpha$) e o ApoER2, promovendo a fosforilação da 38MAPK, o que por sua vez induz ao aumento na produção de tromboxano A_2 (TXA_2) e na expressão da P-selectina, além da mudança na conformação da glicoproteína IIb/IIIa (Figura 3) (25-26).

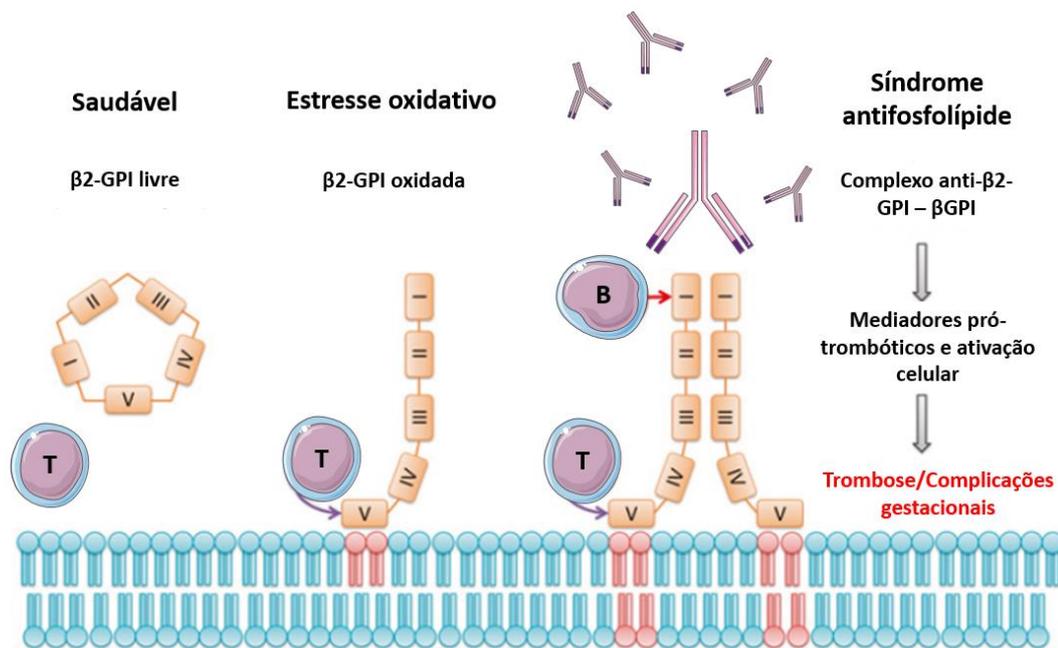


Figura 1 – Oxidação e dimerização da $\beta 2$ -glicoproteína I na contribuição ao desenvolvimento de eventos trombóticos na SAF. A $\beta 2$ -glicoproteína 1 encontra-se no seu estado não imunogênico, porém, com o aumento da ocorrência do estresse oxidativo, que é demonstrado no paciente com SAF, ocorre a abertura da molécula para o seu formato linear e imunogênico. Figura adaptada (3).

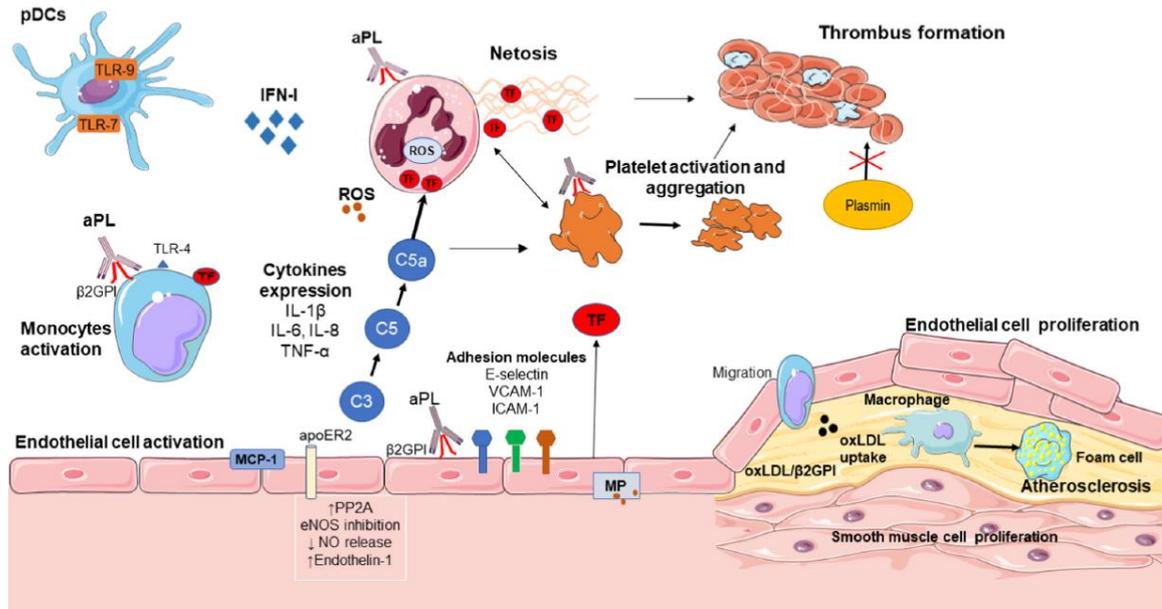


Figura 2 – Via imuno-trombo-aterogênica na SAF. O imunocomplexo anticorpo antifosfolípide-β2 glicoproteína I interage diretamente com as células endoteliais, monócitos, neutrófilos e plaquetas, promovendo alterações essenciais para a fisiopatologia da imunotrombose na SAF (22). Autorização: 5790491111578.

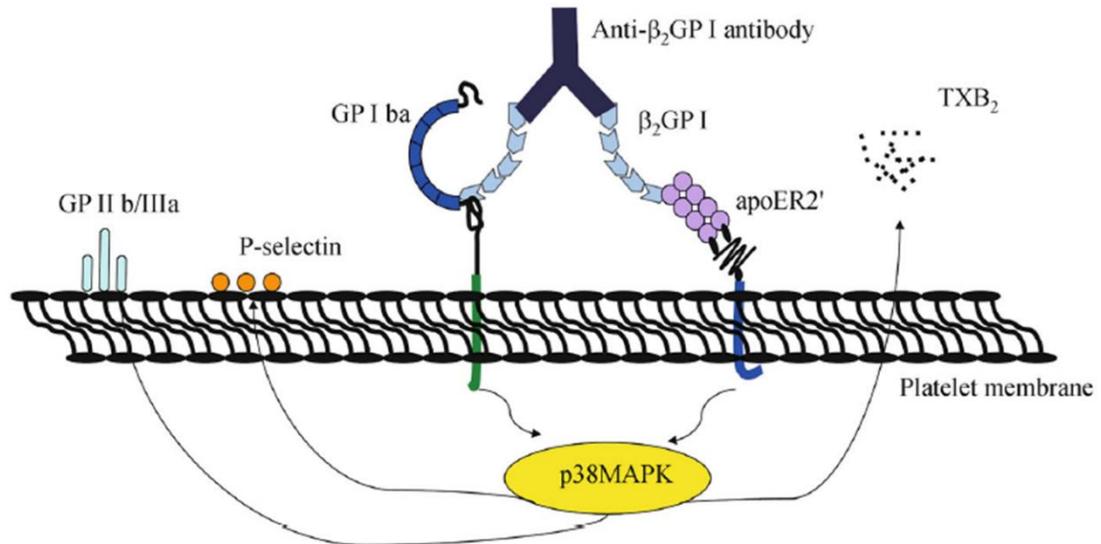


Figura 3 – Interação do complexo β2-GPI/anticorpo antifosfolípide com receptores plaquetários. O imunocomplexo anticorpo antifosfolípide-β2 glicoproteína I interage diretamente com as plaquetas através do receptor ApoER2 e da GPIb alfa, promovendo assim a fosforilação da 38MAPK, que por sua vez, leva a maior expressão da GP IIb/IIIa e da P-selectina, além de promover a liberação de TXA₂ para o meio extracelular (25). Autorização: 5790470405478.

1.1.4. TRATAMENTO

Atualmente, o principal tratamento da SAF trombótica consiste na realização de uma trombopprofilaxia secundária ou primária do paciente, dependendo do desenvolvimento ou não, respectivamente, de eventos trombóticos (27). Na trombopprofilaxia secundária recomenda-se o uso de anticoagulantes antagonistas de vitamina K, como a Varfarina, com a meta da Razão de Normalidade Internacional (RNI) sendo entre 2 e 3 para pacientes com histórico de trombose venosa, e maior do que 3 para pacientes com trombose arterial prévia, podendo também estar entre 2 e 3 na terapia conjugada com o ácido acetilsalicílico (AAS). Já na trombopprofilaxia primária, é indicado o uso do AAS 100 mg em pacientes com alto risco cardiovascular, o que inclui aqueles que são triplo-positivo, que apresentam anticoagulante lúpico persistente ou que já possuem indicação prévia para terapia com antiagregante plaquetário (28-29).

O uso de anticoagulantes orais diretos (DOACs) é bastante indicado para o tratamento da TVP, embolia pulmonar e fibrilação atrial, principalmente pelas suas vantagens farmacocinéticas e farmacoterapêuticas, como a ausência de monitoramento laboratorial constante, dosagem fixa e o baixo índice de interações medicamentosas com outros fármacos ou alimentos. Porém, o uso de DOACs não é recomendado para a trombopprofilaxia secundária em pacientes com SAF primária de alto risco, como os triplos positivos ou aqueles com histórico de trombose arterial (30-31). Essa recomendação ocorreu pelo fato dos ensaios clínicos randomizados não terem conseguido demonstrar a não inferioridade (em termos de segurança e eficácia) dos DOACs em comparação com a varfarina entre pacientes com SAF primária trombótica, além de ter havido a notificação de eventos adversos graves em alguns estudos, incluindo casos de infarto, AVC e até mesmo óbitos (31).

No entanto, o uso desses anticoagulantes pode ser considerado em pacientes com SAF não triplo positiva e com histórico de trombose venosa, apenas nos casos em que a varfarina não é mais uma opção viável (30-32). É importante evitar ao máximo o uso de anticoagulantes orais diretos nesses pacientes, independentemente se o evento tromboembólico inicial foi venoso ou arterial, enquanto se aguarda a realização de ensaios clínicos mais bem desenhados (32).

Levando em conta todas essas informações, podemos observar que o tratamento da SAF ainda é motivo de muita discussão, já que as opções

terapêuticas disponíveis apresentam o risco de não oferecer uma prevenção ideal contra os eventos trombóticos ou de acarretar um elevado risco de complicações associadas ao seu uso (33).

1.2. PLAQUETAS

1.2.1. CITOLOGIA E ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA

As plaquetas são os fragmentos de células do tecido sanguíneo, anucleadas e formadas a partir da fragmentação dos megacariócitos na medula óssea, possuindo funções essenciais na trombose e hemostasia. As plaquetas podem ser encontradas no sangue em uma contagem de 150 - 400 x 10⁶/mL de sangue e possuem meia-vida de 8 a 14 dias, sendo retiradas da circulação principalmente pelo fígado e baço (34).

Existem várias organelas dispersas no citoplasma das plaquetas, incluindo mitocôndrias, ribossomos, lisossomos e peroxissomos (35). Além disso, as plaquetas são ricas em grânulos plaquetários, que ocupam entre 30 a 50% do conteúdo plaquetário e são classificados em grânulos densos (ADP, histamina, cálcio, serotonina), alfa (beta-tromboglobulina, fator de Von Willebrand, fibrinogênio, fibronectina, fator de crescimento celular) e componentes celulares, como os lisossomos (fosfatase ácida e beta-glucuronidase) (36).

As plaquetas são inicialmente ativadas quando expostas ao colágeno nas áreas de lesão vascular e exposição da matriz subendotelial, por meio da ativação da glicoproteína VI (GPVI) e integrina $\alpha 2\beta 1$ com importante participação do fator de von Willebrand, que se liga a GPIb α . Após esse estímulo inicial, ocorre a liberação do conteúdo granular, promovendo a interação plaqueta-plaqueta, plaqueta-endotélio e plaqueta-leucócito. Ocorre também a síntese e liberação de TXA₂ para o meio extracelular, promovendo a amplificação da ativação plaquetária (37).

Na membrana plasmática plaquetária estão presentes receptores que medeiam a adesão, tais como: integrinas ($\alpha 11\beta 3$, $\alpha 1\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$), leucinas, imunoglobulinas e selectina (P-selectina). Porém, a integrina $\alpha 11\beta 3$ é a principal e com maior presença na membrana plaquetária. Consiste em um heterodímero cálcio dependente que permite a ocorrência e a estabilização da agregação plaquetária. Normalmente, a integrina $\alpha 11\beta 3$ encontra-se no estado de baixa afinidade, no entanto, com o aumento dos níveis de cálcio intracelular ocorre a sua

ativação, fazendo com que ela se ligue as moléculas de fibrinogênio circulantes e ocorra a agregação plaquetária (34, 37).

1.2.2. AGONISTAS PLAQUETÁRIOS

A amplificação da resposta plaquetária é estimulada por múltiplas vias, incluindo a atuação de importantes agonistas, tais como: colágeno, ADP, TXA₂, epinefrina, serotonina e trombina. O ADP é armazenado em altas concentrações nos grânulos densos plaquetários e liberado durante a fase de amplificação, ativando dois receptores purinérgico, P2Y₁ e P2Y₁₂, os quais estão acoplados bioquimicamente as proteínas G_q e G_i, respectivamente (Figura 4). A ligação do ADP ao receptor P2Y₁ causa alterações na forma plaquetária (*shape-change*) e agregação através da ativação da fosfolipase C-β₂, sendo que a mudança de forma precede a agregação e aumenta consideravelmente a área de superfície externa das plaquetas, facilitando os contatos com células e moléculas próximas (38). A ligação do ADP ao receptor P2Y₁₂ com subsequente sinalização da via G_i é muito mais potente e essencial para a agregação plaquetária desenfreada. Outro mediador liberado pelos grânulos densos plaquetários é o ATP, que se liga ao canal iônico P2X₁ promovendo o influxo de cálcio, promovendo a mudança de forma plaquetária e a liberação secundária de grânulos, mas não a agregação plaquetária. Portanto, a sinalização P2X₁ não é considerada fundamental na agregação plaquetária, além da sua resposta não ser sustentada devido a rápida e intensa dessensibilização do receptor, porém, essa resposta ao ATP modula e contribui significativamente para a resposta plaquetária, principalmente na etapa de amplificação do sinal (38-39).

O TXA₂, produto final da cascata do ácido araquidônico (AA) nas plaquetas, é produzido a partir da conversão do AA em prostaglandina H₂ pela enzima ciclooxigenase tipo 1 (COX-1) e em seguida convertido em TXA₂ pela tromboxano sintase (37). O TXA₂ é então liberado para o meio extracelular, com curto tempo de meia-vida, amplificando o sinal através da ligação com o receptor de tromboxano/endoperóxido (TP) que por sua vez ativa G_q e G_{12/13}. A trombina por sua vez, também é liberada durante a etapa de amplificação e atua em receptores ativados por protease (PAR) 1 e 4, clivando a porção N-terminal do sítio específico de ligação. Após a sua ativação, os receptores PAR são internalizado por

mecanismos dependentes de fosforilação, e em seguida degradados dentro dos lisossomos (38). Os receptores TP e PAR também estão acoplados a proteína G13, que ativa a via mediada pela Rho/Rho-quinase, levando a um aumento da fosforilação da cadeia leve da miosina que modula a forma plaquetária (40).

1.2.3. MECANISMOS DE INIBIÇÃO PLAQUETÁRIA

A inibição da atividade plaquetária ocorre pela ação do NO e da prostaciclina, que são produzidos majoritariamente pelas células endoteliais e atuam como importantes reguladores inibitórios da atividade plaquetária, interferindo na adesão, ativação, agregação, secreção e alteração de forma das plaquetas (Figura 4). O NO é capaz de ativar a guanilato ciclase solúvel (GCs) plaquetária, o que induz a um aumento intracelular de GMPc, enquanto a prostaciclina ativa os receptores de prostaciclina localizados em sua membrana celular, aumentando o nível de AMPc intracelular. Ambos segundos mensageiros ativam proteínas quinases dependentes, PKA (AMPc) e PKG (GMPc), induzindo reações em cascata que reduzem a mobilização de cálcio intracelular e promovem a ativação de vias inibitórias (38, 41).

A proteína conhecida como VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*) possui entre 46 e 50 kDa e é um substrato para as duas proteínas quinases dependentes (PKA e PKG). A PKA é capaz de promover a fosforilação da VASP no resíduo de serina 157, enquanto a PKG promove a fosforilação no resíduo de serina 239. Nas plaquetas, a fosforilação VASP pelas proteínas quinases dependentes (PKA e PKG) promove a ativação de vias inibitórias, portanto, quando há a sua fosforilação, a ativação e agregação plaquetária são inibidas (42).

1.2.4. PAPEL DAS PLAQUETAS NA TROMBOSE VENOSA

As plaquetas apresentam um importante papel nas trombooses arteriais, enquanto que o seu papel no tromboembolismo venoso (TEV) tem sido muito menos discutido. No entanto, evidências recentes mostraram que as plaquetas podem desempenhar um papel essencial no TEV. Um artigo recente mostrou isso, ao concluir que os níveis plasmáticos de vesículas extracelulares derivadas de plaquetas estão associados ao risco futuro de TEV, sugerindo que uma alta proporção dessas vesículas no plasma pode ser um marcador de risco de TEV

futuro e que a ativação plaquetária com subsequente formação das vesículas está envolvida na sua patogênese (43).

Além disso, outro trabalho recente avaliou a função plaquetária obtida de pacientes com embolia pulmonar isolada (EPI), trombose venosa profunda isolada (TVPI) ou TVP + EP (44). Resumidamente, os autores observaram que a agregação plaquetária induzida pela epinefrina e pelo ADP foi menor no grupo com EPI ou TVP + EP. Expressões mais baixas para PAC-1 e menor geração de trombina foram observadas em plaquetas do grupo TVP + EP e EPI em comparação com o grupo TVPI. Sendo assim, este estudo sugere que os fenótipos plaquetários variam entre EPI e TVPI e que a atividade plaquetária reduzida em pacientes com EPI sugere maior degranulação plaquetária.

No entanto, mais estudos são necessários para determinar quais biomarcadores plaquetários estão relacionados com os piores resultados clínicos de pacientes com TEV, além de esclarecer os fenótipos relacionados a trombose venosa profunda (TVP) e a embolia pulmonar (EP).

1.3. AGENTES ANTIPLAQUETÁRIOS AVALIADOS

1.3.1. ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

O AAS, conhecido pelo nome comercial de aspirina, é um dos fármacos mais antigos e também um dos mais utilizados ao redor do mundo, sendo responsável direto pelo aumento da expectativa de vida nas últimas décadas. O AAS é um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) capaz de inibir a enzima ciclooxigenase (COX) tipo 1 e 2. Sendo assim, o AAS inibe a produção de TXA_2 nas plaquetas ao inibir irreversivelmente a COX-1, diminuindo assim a agregação plaquetária e a COX-2 em doses mais altas, levando ao efeito analgésico e antipirético (45-46).

Como foi descrito anteriormente, o AAS em baixa dose é utilizado na trombopprofilaxia primária da SAF, indicado apenas para pacientes com alto risco cardiovascular, sendo que geralmente esses pacientes já possuem uma indicação prévia para a terapia com agentes antiagregante plaquetários (28-29).

1.3.2. TICAGRELOR

O ticagrelor é um antagonista reversível do receptor $P2Y_{12}$, administrado pela via oral e com efeito direto, sem a necessidade de ativação metabólica para gerar seu efeito inibitório. Ao antagonizar o receptor $P2Y_{12}$ o fármaco promove a

redução da atuação do ADP sobre as plaquetas e, portanto, aumenta a atividade da adenilato ciclase no meio, o que promove aumento nos níveis intracelulares de AMPc, importante mediador das vias inibitórias plaquetárias. O ticagrelor possui um rápido início de ação e uma inibição plaquetária mais pronunciada quando comparado às tienopiridinas (47).

Apesar do clopidogrel ainda ser o antagonista do receptor P2Y₁₂ mais utilizado, ele possui importantes limitações, tais como: necessidade do metabolismo hepático para gerar o metabólito ativo, ligação irreversível ao receptor P2Y₁₂, gerando prolongamento no risco de sangramento e a existência de uma variada resposta individual ao fármaco (seja por polimorfismos, interações medicamentosas ou doenças hepáticas), gerando resistência ao tratamento (47).

De acordo com o ensaio clínico PLATO, o ticagrelor demonstrou ser mais eficaz do que o clopidogrel, reduzindo o desfecho primário (composto de morte cardiovascular, infarto do miocárdio não fatal e acidente vascular cerebral) em pacientes com síndrome coronária aguda (SCA) (48).

1.3.3. CILOSTAZOL

O cilostazol é um inibidor direto da fosfodiesterase tipo III (PDE3), enzima responsável pela degradação do AMPc intracelular em AMP. Com a inibição da PDE3 pelo cilostazol os níveis intracelulares de AMPc aumentam, favorecendo a inibição da agregação plaquetária (47).

Atualmente, o cilostazol é indicado como terapia de primeira linha para tratar os sintomas de claudicação intermitente em pacientes com doença arterial periférica. Porém, estudos clínicos já demonstraram a sua eficácia e segurança hemorrágica quando coadministrado com clopidogrel e AAS em pacientes com SCA submetidos a intervenções coronarianas percutâneas, reduzindo o desfecho (composto de morte cardíaca, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral) em comparação com o uso de AAS mais clopidogrel (49-50).

Em outro estudo clínico, pacientes com infarto cerebral não cardioembólico receberam administração oral de 100 mg de cilostazol duas vezes ao dia e mostraram não inferioridade ou possivelmente superioridade a 81 mg de AAS administrada uma vez ao dia na prevenção da recorrência de acidente vascular

cerebral, além disso, o cilostazol foi associado a um menor índice de sangramentos (51).

Vários desses achados de ensaios clínicos com cilostazol, sozinho ou em combinação com outros medicamentos antiplaquetários, mostram a sua eficácia com risco limitado de sangramento, no entanto, estudos clínicos adicionais precisam ser realizados para que a indicação no tratamento de doenças trombóticas seja oficializada (52).

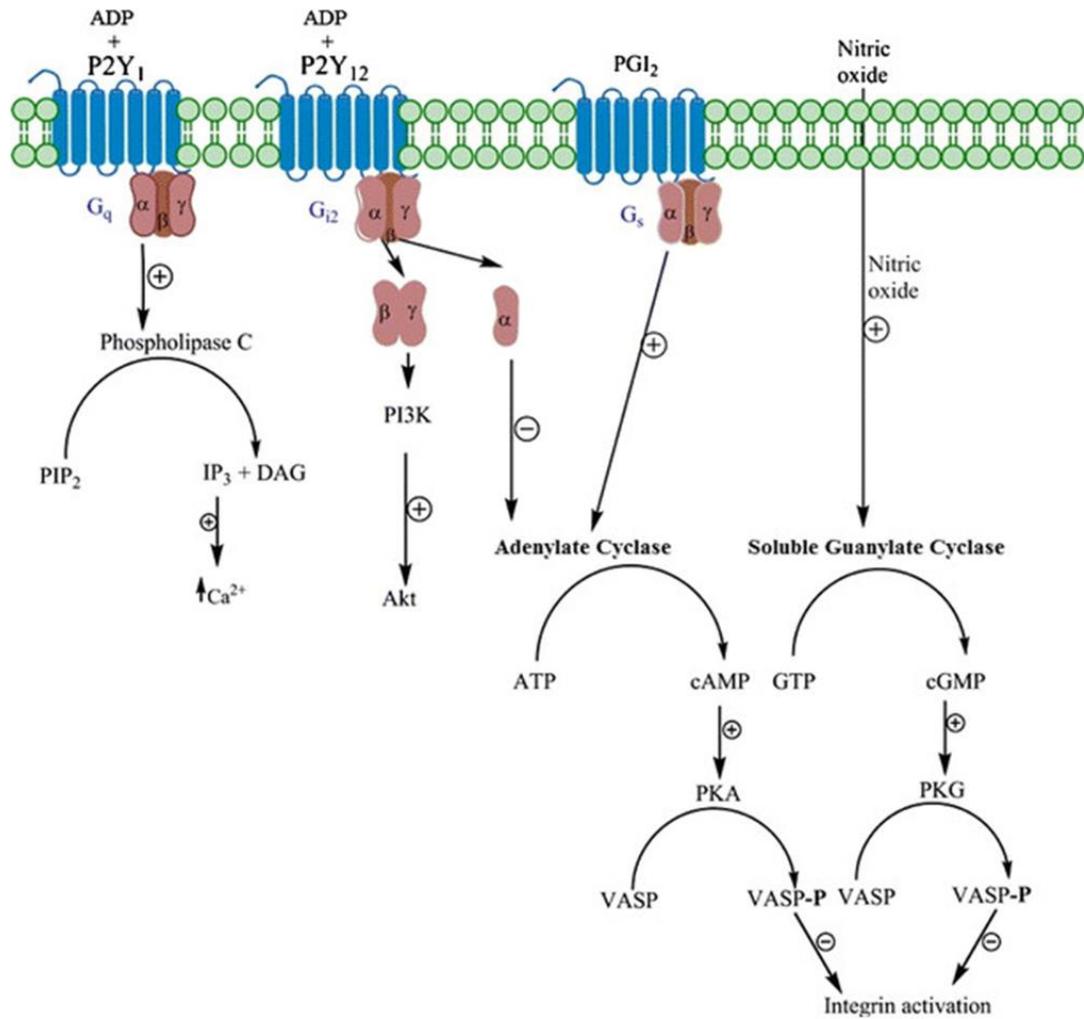


Figura 4 – Via de sinalização do agonista ADP e dos mediadores inibitórios (PGI₂ e NO) nas plaquetas. O ADP ativa os receptores P2Y₁ e P2Y₁₂ localizados na superfície plaquetária, acoplados bioquimicamente a proteína Gq e Gi, respectivamente. O NO ativa a GCs promovendo aumento nos níveis intracelulares de GMPC, enquanto a prostaciclina (PGI₂) ativa o receptor IP, promovendo aumento nos níveis intracelulares de AMPC. Ambos os nucleotídeos ativam respectivamente, PKG e PKA, que fosforilam vias inibitórias na plaqueta (41). Autorização: 5790291430527.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A maioria dos estudos demonstraram que os anticorpos antifosfolípidos isolados e purificados do soro de pacientes com SAF promoveram um aumento na ativação de plaquetas isoladas de voluntários sadios e que foram estimuladas com concentrações subterapêuticas de ADP, colágeno ou trombina. Porém, até o nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou a atividade das plaquetas oriundas de pacientes com SAF e nem exploraram os mecanismos moleculares. Portanto, aventamos a hipótese de que a magnitude da ativação plaquetária poderia estar aumentada em plaquetas oriundas de pacientes com SAF primária trombótica.

3. OBJETIVOS

3.1.OBJETIVO GERAL

Avaliar a agregação plaquetária em pacientes com SAF primária trombótica (t-PAPS) e caracterizar, por meio de ensaios funcionais, bioquímicos e moleculares, as vias de sinalização purinérgica e de nucleotídeos cíclicos.

3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar a agregação plaquetária no plasma rico em plaquetas (PRP) obtido de voluntários dos grupos SAF e controle frente a diferentes agonistas plaquetários tais como ADP, colágeno e ácido araquidônico, na presença e ausência de mediadores inibitórios (NO e PGI₂);
- II. Avaliar a expressão proteica dos receptores P2Y₁₂ e P2Y₁, além das enzimas PDE-3, PDE-5, sGCα1, sGCβ1 e subunidade Gsα em plaquetas;
- III. Quantificar os níveis intracelulares dos segundos mensageiros AMPc e GMPc em plaquetas;
- IV. Avaliar a agregação plaquetária no PRP obtido de voluntários dos grupos SAF e controle na presença de aspirina, ticagrelor e cilostazol, além de combinações entre eles;
- V. Isolar e purificar os anticorpos IgG do soro de voluntários dos grupos SAF e controle, além de testar o seu efeito na agregação plaquetária frente ao agonista ADP e o potencial dos mediadores endoteliais e do ticagrelor em mitigar esses efeitos.

4. METODOLOGIA

4.1. PARTICIPANTES

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Humana da Universidade Estadual de Campinas (número do protocolo: 59362216.7.0000.5404 e 72739517.9.0000.5404). A pesquisa foi realizada de acordo com a declaração de Helsinque. Sessenta e dois voluntários saudáveis e 40 pacientes com SAF primária trombótica foram recrutados e, aproximadamente 30 ml de sangue foram coletados para obter o PRP ou a plaqueta lavada. Os critérios de inclusão foram os seguintes: (1) voluntários saudáveis: homens ou mulheres que não receberam nenhum medicamento 10 dias antes do experimento e (2) pacientes com SAF: homens ou mulheres com SAF primária trombótica, em anticoagulação e que tinham pelo menos um episódio de trombose venosa ou arterial e foi positivo único para pelo menos um dos anticorpos antifosfolípidos (anti- β 2GPI, anticardiolipina e anticoagulante lúpico) em 2 medidas independentes de 12 semanas de intervalo.

4.2. PLASMA RICO EM PLAQUETAS E PLAQUETA LAVADA

O sangue de voluntários saudáveis ou pacientes com SAF foi coletado com seringas de 10 mL contendo citrato de sódio a 3,8% (9:1 v/v; para ensaios de PRP) ou ACD-C (citrato de sódio 13 mM, ácido cítrico 13 mM e glicose 11 mM; 9:1 v/v; para ensaios com plaqueta lavada), e em seguida adicionado em tubos para centrífuga e centrifugado à temperatura ambiente (400g por 12 min) para obtenção do PRP. Em seguida, o PRP obtido no tubo ACD-C foi centrifugado a 800g a 1 min e o pellet ressuspendido suavemente em solução de Krebs (cloreto de sódio de 118 mM, bicarbonato de sódio 25 mM, 18 mM de dihidrogenado de potássio, fosfato de diidrogênio, 1,7 mM de sulfato de magnésio hepta-hidrato e 5,6 mM de glicose). O número de plaquetas foi ajustado para $1,5 \times 10^8$ plaquetas/ml para ensaio de agregação de plaquetas ou $3,0 \times 10^8$ plaquetas/ml para ensaios de Western blot, ambos na presença de cloreto de cálcio 1 mM.

4.3. ENSAIOS FUNCIONAIS

A agregação plaquetária foi realizada com um agregômetro óptico (Profiler, 8 canais PAP-8 v2.0 óptica. Bio-Data) a 37 °C com 200 μ L de PRP ou plaqueta lavada colocados em cubetas de vidro contendo uma barra de agitação descartável para agitação constante. O PRP foi estimulado com ADP (3 ou 10 μ M), colágeno (1 μ g/ml)

ou ácido araquidônico (AA;300 μM). Em um segundo conjunto de experimentos, o PRP foi pré-incubado com o doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (SNP; 3 ou 10 μM), com o análogo estável da prostaciclina (iloprost, 3 ou 10 nM), dimetilsulfóxido (1%), ácido acetilsalicílico (10 μM), ticagrelor (2 μM) ou cilostazol (10 μM), e depois estimulados com ADP 3 μM .

As plaquetas lavadas obtidas de voluntários saudáveis foram pré-incubadas com anticorpos IgG (500 $\mu\text{g/ml}$ de IgG total; 30 min) isolados do soro de voluntários saudáveis ou pacientes com SAF e depois estimulados com ADP 30 μM na ausência e na presença de presença de SNP (0,1 μM), iloprost (1 nm) ou ticagrelor (2 μM). Os anticorpos IgG isolados de voluntários saudáveis contêm 0,72 unidades de anti- $\beta\text{2GPI-IgG}$ e 0,46 unidades de anticardiolipina-IgG em 500 $\mu\text{g/ml}$ de IgG total, enquanto os anticorpos IgG isolados de pacientes com SAF contêm 41,6 unidades de anti- $\beta\text{2GPI-IgG}$ e 1780 unidades de anticardiolipina-IgG em 500 $\mu\text{g/ml}$ de IgG total. As concentrações de ADP, SNP e iloprost escolhidas para este protocolo foram baseadas em experimentos preliminares. Concentrações mais baixas de ADP (3 ou 10 μM) não produziram agregação visual, enquanto concentrações mais altas de SNP (3 ou 10 μM) ou iloprost (3 ou 10 nM) produziram forte inibição de plaquetas em plaquetas lavadas.

4.4. QUANTIFICAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS

As plaquetas lavadas foram pré-incubadas com IBMX (1 mM), um inibidor de fosfodiesterase não seletivo, por 20 min seguido de incubação com SNP (1 ou 3 μM) ou iloprost (1 ou 3 nM) por 3 minutos. Em seguida, as amostras plaqueta lavada foram centrifugadas (4000g a 4°C) por 30 minutos e, em seguida, o ácido clorídrico frio (0,1 M) foi adicionado ao pellet e as amostras foram agitadas por 30 segundos. A preparação de amostras de marcador, padrões e incubação com anticorpo foram realizados conforme descrito em kits disponíveis comercialmente. O limite da detecção do kit é de 1 pmol/ml para GMPC e 0,1 pmol/ml para o AMPc.

4.5. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A mesma quantidade de amostra de plaqueta lavada (400 μL de $3,0 \times 10^8$ plaquetas/ml) foi usada para carregar o gel. As plaquetas foram tratadas com tampão Laemmli 4x contendo 2-mercaptoetanol 10%, aquecidas por 10 minutos e resolvidas por SDS-PAGE. A eletrotransferência (20V, 20 min) de proteínas para membrana de

nitrocelulose foi realizada em aparelho semi-seco (Bio-Rad Laboratórios). As membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com tampão de bloqueio. Anticorpos primários contra beta-actina (1:25.000), os subtipos de receptores de ADP P2Y12 (1:200) e P2Y1 (1:1000), fosfodiesterases tipo 5 (1:1000) e tipo 3 (1:1000), sGC α 1 (1:1000), sGC β 1 (1:500) e proteína Gs alfa (Gs α , 1:500) foram incubados durante a noite a 4°C em solução basal contendo 3% de BSA. Em alguns ensaios, foi utilizado o peptídeo bloqueador (1:1) na presença do anticorpo anti-P2Y12. Resumidamente, o peptídeo bloqueador (1:200) foi incubado durante 1 h juntamente com o anticorpo P2Y12 à temperatura ambiente e depois incubado overnight com a membrana. As membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (IgG anti-rabbit ligado a HRP; 1:5000) em solução basal durante 1 h. Bandas imunorreativas foram detectadas usando um sistema de quimiluminescência BioRad aprimorado. A densitometria foi realizada no software ImageJ (National Institutes of Health), e os resultados representados como porcentagem em relação à expressão proteica total. As membranas foram fotografadas no ChemiDoc XRS + System (Bio-Rad Laboratories) e as imagens foram salvas em formato TIFF. As fotos foram transferidas para o software ImageJ e as bandas correspondentes foram selecionadas. Em seguida, as linhas das bandas selecionadas foram plotadas e a área correspondente a cada banda foi medida. Após o cálculo das áreas de cada banda, a área da proteína de interesse foi dividida pela área da proteína endógena (beta-actina ou GAPDH). É importante ressaltar que as amostras para determinação de proteínas foram escolhidas aleatoriamente dentro de nossa coorte de pacientes.

4.6. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IgG

As amostras de soro foram diluídas (1:1) com solução salina tamponada com fosfato 1x e centrifugadas a 10.000 g por 15 min. Em seguida, a IgG total foi purificada a partir de amostras de soro pela coluna de proteína G-Sepharose e as amostras foram eluídas com um tampão de eluição (glicina 0,1 M; pH 2) e depois neutralizadas com Tris 2 M (pH 8). A concentração total de IgG purificada foi determinada usando o ensaio de proteína Lowry. As concentrações anti- β 2GPI-IgG e anticardiolipina-IgG foram determinadas usando imunoensaio quimioluminescente. Os kits de ensaio Quanta Flash β 2GP1 IgG e Quanta Flash Cardiolipin IgG foram utilizados no analisador de imunoensaio automático de Bio-Flash. Resumidamente, o ensaio consiste em um imunoensaio quimioluminescente em duas etapas, no qual partículas magnéticas

revestidas com β 2GP1 humano purificado ou anticorpos anti- β 2GP1 ou anti-cardiolipina na amostra, quando presentes. Um marcador (iso-luminol) que se liga à IgG anti- β 2GP1 ou IgG anti-cardiolipina nas partículas é então adicionado. Os reagentes que ativam a reação luminescente são adicionados e a luz emitida é medida como unidades de luz relativa, que são diretamente proporcionais à concentração de anticorpos na amostra. Não quantificamos o anticorpo total de IgG ou complexos imunes isolados não específicos.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média \pm DP, sendo que o “n” indica o número de voluntários utilizados em cada protocolo. O delineamento experimental inicial do estudo foi realizado utilizando cálculo amostral considerando o nível de significância de 5% e o poder de 80% a partir de uma análise exploratória. Foram realizados os seguintes testes: teste de Mann-Whitney (comparação de dois grupos) ou teste de Kruskal-Wallis (comparação de três ou mais grupos), seguido de teste post hoc de Dunn para comparações múltiplas. O programa Statistical Analysis System (versão 9.4) (SAS Institute Inc) foi utilizado para análise estatística. O número de voluntários testados não foi igual em todos os ensaios porque quando as estatísticas atingiram significância os experimentos foram finalizados. Os protocolos envolvendo a quantificação de proteínas e nucleotídeos cíclicos foram encerrados prematuramente. As amostras utilizadas para os ensaios de proteína e kit foram escolhidas aleatoriamente. Este manuscrito segue a lista de verificação STROBE.

5. RESULTADOS

O formato de escrita da presente tese é o formato alternativo ao modo tradicional. A formatação segue as normas presentes na Instrução Normativa CCPG nº 002/2021 (art. 2º, inciso 1º).

O artigo apresentado abaixo foi publicado em abril de 2022 na revista “*The Journal of Thrombosis and Haemostasis*”.

ORIGINAL ARTICLE

Adenosine diphosphate-induced aggregation is enhanced in platelets obtained from patients with thrombotic primary antiphospholipid syndrome (t-PAPS): Role of P2Y₁₂-cAMP signaling pathway

Guilherme Ruiz Leonardi¹  | Caroline Honaiser Lescano¹  | Jose Luiz Costa²  |
Bruna Mazetto³  | Fernanda Andrade Orsi^{3,4}  | Fabiola Zakia Monica¹ 

¹Department of Translation Medicine (Pharmacology), Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

²Campinas Poison Control Center, University of Campinas, Campinas, Brazil

³Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Campinas, Brazil

⁴Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

Correspondence

Fabiola Zakia Monica, Department of Translational Medicine (Pharmacology), University of Campinas (Unicamp), Faculty of Medical Sciences-Building FCM10, Alexander Fleming Street, Campinas, Sao Paulo 13083-881, Brazil.
Email: fabiolataufic@gmail.com; fzm@unicamp.br

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2017/15175-1 and 2018/21880-2

Abstract

Background: Thrombotic antiphospholipid syndrome (t-PAPS) is characterized by arterial, venous, or microvascular occlusions, which are explained, in part, by the presence of antiphospholipid (aPL) antibodies. Although there is much evidence indicating that isolated aPL antibodies increase the activity of platelets obtained from healthy volunteers, platelet function in t-PAPS has not been as widely studied.

Objective: To evaluate platelet reactivity in t-PAPS patients.

Methods: Platelet aggregation, protein expression, and cyclic nucleotide levels were carried out in platelet rich plasma (PRP) or washed platelets (WPs) obtained from t-PAPS or healthy volunteers.

Results: ADP-induced aggregation was significantly higher in PRP obtained from t-PAPS than obtained from the control. The protein expression of P2Y₁₂ receptor and Gs alpha was significantly higher and lower, respectively in WPs from t-PAPS patients. In PRP incubated with iloprost or sodium nitroprusside, the residual platelet reactivity induced by ADP was still higher in PRP from t-PAPS than from the control. Lower intracellular levels of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) were observed in unstimulated PRP from t-PAPS patients. The protein expression of soluble guanylate cyclase subunits and phosphodiesterases types 3 and 5 did not differ. The antiplatelet activity of ticagrelor was similar between the groups and cilostazol significantly potentiated this response. Isolated aPL antibodies obtained from t-PAPS patients potentiated ADP-induced aggregation in healthy platelets but did not affect the inhibitory responses induced by iloprost or sodium nitroprusside.

Guilherme Ruiz Leonardi and Caroline Honaiser Lescano contributed equally

Manuscript Handled by: Wolfgang Bergmeier

Final decision: Wolfgang Bergmeier, 04 April 2022

© 2022 International Society on Thrombosis and Haemostasis

Conclusions: The overexpression of P2Y₁₂ receptor, accompanied by lower levels of cAMP and cGMP levels produced greater amplitude of ADP aggregation in platelets from t-PAPS patients.

KEY WORDS

adenosine diphosphate, antiphospholipid syndrome, cilostazol, cyclic nucleotides, P2Y₁₂ receptor, platelet, ticagrelor

1 | INTRODUCTION

Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disease in which antiphospholipid (aPL) antibodies lead to inflammation, hypercoagulability, and, ultimately, thrombotic and obstetric complications.¹ These antibodies are detected in blood circulation in the form of lupus anticoagulant (LAC), anticardiolipin (aCL), or anti- β 2-glycoprotein 1.² Thrombotic APS is a heterogeneous vascular disease characterized by arterial, venous, or microvascular occlusions, with different degrees of severity and response to treatment.³ Part of the disease severity is explained by the patient's aPL profile; triple positivity for LAC, aCL, and anti- β 2-glycoprotein 1 is associated with higher risk of thrombosis.⁴ The activation of complement,^{4,5} endothelial cells,^{6,7} leukocytes,^{5,8,9} and platelets⁵ contribute to thrombotic manifestations in APS by adding to the inflammatory and pro-coagulant stimulus. However, the mechanisms behind thrombus formation in APS patients remain poorly understood and, hence, there are no therapies that target the underlying pathophysiology. Anticoagulation and/or antiplatelets are considered the cornerstone therapy; nevertheless, the optimal agents and the intensity of treatment remain a matter of debate.³

Thrombus formation involves endothelial dysfunction and the activation of platelets, coagulation system,¹⁰ and inflammatory pathways.^{11,12} Regarding the mechanisms by which aPL could interfere in platelet reactivity, the majority of the studies evaluated the role of isolated aPL antibodies from APS patients in platelets from healthy volunteers.¹³⁻¹⁵ Although antibodies isolated from aPL carriers, especially anti- β 2GP, have been demonstrated to increase the activity of platelets from healthy controls; from a clinical perspective, it is not clear whether platelet functions and intrinsic mechanisms behind platelet activation in APS is increased and contribute to thrombotic manifestations. This study aimed to evaluate platelet aggregation in thrombotic primary APS (t-PAPS) patients and characterize, by means of functional, biochemical, and molecular assays, the purinergic and the cyclic nucleotide signaling pathways. In another set of experiments, we evaluated the effect of immunoglobulin G (IgG) antibodies isolated from t-PAPS and controls on adenosine diphosphate (ADP)-induced platelet aggregation and the potential of endothelial mediators and ticagrelor to mitigate these antibodies effects.

Essentials

- The pathways involved in higher platelet activity in APS patients are not well explored.
- We assessed platelet reactivity obtained from patients with t-PAPS.
- The aggregation induced by ADP and the protein expression for P2Y₁₂ are increased in platelets from t-PAPS patients.
- The intraplatelet levels of cAMP and cGMP are reduced in platelets from t-PAPS patients leading to lower inhibitory responses induced by endothelial mediators.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Participants

The present study was approved by the Human Ethics Committee of the University of Campinas (Protocol Number: 59362216.7.0000.5404 and 72739517.9.0000.5404). The research was conducted in accordance with the Helsinki Declaration. Sixty-two healthy volunteers and 40 t-PAPS patients were recruited and, approximately 30 ml of blood was collected to obtain platelet rich plasma (PRP) or washed platelets (WPs). Inclusion criteria were as follows: (1) healthy volunteers: men or women who had not received any medication 10 days before the experiment and (2) t-PAPS patients: men or women t-PAPS, on anticoagulation, and who had had at least one episode of venous or arterial thrombosis and were single-positive for at least one of the aPL antibodies (anti- β 2GPI, aCL, and LAC) on 2 independent measures of 12 weeks apart. Exclusion criteria were as follows: (1) healthy volunteers: men or women who did not sign the inform consent or had taken antiplatelet or any anti-inflammatory drugs 10 days before the experiment and (1) t-PAPS patients: men or women with diabetes mellitus, taking any antiplatelet drug, or who did not sign the inform consent.

2.2 | Reagents and antibodies

Sodium nitroprusside, iloprost, adenosine diphosphate sodium, dimethyl sulfoxide, 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX), arachidonic

acid, aspirin, and anti-beta-actin antibody (Cat. no. A3554) were obtained from Sigma Chemical. The cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) assay kits, guanylate cyclase $\beta 1$ subunit antibody (sGC $\beta 1$; Cat. no. 160897), and ticagrelor were supplied from Cayman Chemical. Cilostazol was supplied from Chongqing Kangle Pharmaceutical. Collagen was obtained from Chrono-log Corporation. Citric acid, dextrose, sodium citrate, sodium chloride, sodium bicarbonate, potassium dihydrogen phosphate, magnesium sulfate heptahydrate, calcium chloride (CaCl_2), sodium hydrogen phosphate, glycine, Tris base, and chloride acid were obtained from Merck KGaA (Darmstadt, DA, DEU). Protein G Sepharose Column (Cat. no. ab193260) was obtained from Abcam Plc. (London, UK). Primary antibodies against P2Y_{12} receptor (Cat. no. APR-012; Alomone Labs), P2Y_1 (Cat. no. MA531815, Thermo Scientific), guanylate cyclase $\alpha 1$ subunit (Cat. no. NBP2-13000; Novus Biologicals), guanylate cyclase $\beta 1$ subunit (Cat. no. 160897; Cayman Chemical), GAPDH (Cat. no. sc-25778; Santa Cruz), phosphodiesterase-5 (Cat. no. ab64179; Abcam), phosphodiesterase-3 (Cat. no. ab244337, Abcam), and Gs alpha (Cat. no. MABN543, Merck) were obtained. HRP-linked anti-rabbit IgG (Cat. no. 7074) was obtained from Cell Signaling.

2.3 | Platelet-rich plasma and washed platelets

Blood from healthy volunteers or t-PAPS patients was collected in 3.8% sodium citrate (9:1 v/v; for PRP assays) or ACD-C (13 mM sodium citrate, 13 mM citric acid, and 11 mM glucose; 9:1 v/v) containing tube and centrifuged at room temperature (400g for 12 min) to obtain PRP. Next, the PRP obtained from the ACD-C tube was centrifuged at 800g for 12 min and the platelets were gently resuspended in Krebs solution (118 mM sodium chloride, 25 mM sodium bicarbonate, 1.2 mM potassium dihydrogen phosphate, 1.7 mM magnesium sulfate heptahydrate, and 5.6 mM glucose; pH 7.4) to obtain WPs. Platelet number was adjusted to 1.5×10^8 platelets/mL for platelet aggregation assay or 3.0×10^8 platelets/mL for western blot assays, both in the presence of 1 mM calcium chloride.

2.4 | Functional assays

Platelet aggregation was performed with an optical aggregometer (Profiler, 8 channel PAP-8 V2.0 optics. Bio-Data Corporation) at 37°C with 200 μl of PRP or WPs placed in glass cuvettes containing a disposable stir bar for constant stirring. PRP was stimulated with ADP (3 or 10 μM), collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), or arachidonic acid (AA; 300 μM). In a second set of experiments, PRP was preincubated with the nitric oxide donor, sodium nitroprusside (SNP; 3 or 10 μM), the stable analogue of prostacyclin (iloprost, 3 or 10 nM), dimethyl sulfoxide (1%), aspirin (10 μM), ticagrelor (2 μM), and cilostazol (10 μM) and then stimulated with ADP 3 μM .

Washed platelets obtained from healthy volunteers were preincubated with IgG antibodies (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of total IgG; 30 min) isolated from the serum of healthy volunteers or t-PAPS patients and then stimulated with ADP 30 μM in the absence and in the presence of SNP (0.1 μM), iloprost (1 nM), or ticagrelor (2 μM). The IgG antibodies isolated from healthy volunteers contain 0.72 CU of anti- $\beta 2\text{GPI}$ -IgG and 0.46 CU of anticardiolipin-IgG in 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of total IgG, whereas IgG antibodies isolated from t-PAPS patients contain 41.6 CU of anti- $\beta 2\text{GPI}$ -IgG and 1780 CU of anticardiolipin-IgG in 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of total IgG. The concentrations of ADP, SNP, and iloprost chosen for this protocol were based on preliminary experiments. Lower concentrations of ADP (3 or 10 μM) produced no visual aggregation, whereas higher concentrations of SNP (3 or 10 μM) or iloprost (3 or 10 nM) produced strong platelet inhibition in washed platelets.

2.5 | Intraplatelet levels of cyclic nucleotides

Washed platelets were preincubated with IBMX (1 mM), a nonselective phosphodiesterase inhibitor, for 20 min followed by incubation with SNP (1 or 3 μM) or iloprost (1 or 3 nM) for 3 min. Next, WP samples were centrifuged (4000g at 4°C) for 30 min and then cold chloride acid (0.1 M) was added to the pellet and samples were agitated for 30 seconds. Preparation of tracer samples, standards and incubation with antibody were performed as described in commercially available kits. The limit of the kit detection is 1 pmol/ml for cGMP and 0.1 pmol/ml for cAMP.

2.6 | Western blotting

The same quantity of WP (400 μl of 3.0×10^8 platelets/ml) was used to load the gel. Platelets were treated with 4 \times Laemmli buffer containing 2-mercaptoethanol 10%, heated for 10 min and resolved by SDS-PAGE. Electrotransfer (20V, 20 min) of proteins to nitrocellulose membrane was performed in a semidry device (Bio-Rad Laboratories). Membranes were incubated overnight at 4°C with blocking buffer. Primary antibodies against beta-actin (1:25 000), the ADP receptor subtypes P2Y_{12} (1:200) and P2Y_1 (1:1000), phosphodiesterases type 5 (1:1000) and type 3 (1:1000), sGC $\alpha 1$ (1:1000), sGC $\beta 1$ (1:500), and protein Gs alpha ($\text{Gs}\alpha$, 1:500) were incubated overnight at 4°C in basal solution containing 3% BSA. In some experiments, a blocking peptide (1:1) for anti- P_2Y_{12} was used. Briefly, the blocking peptide (1:200) was incubated for 1 h along with the P_2Y_{12} antibody at room temperature and then incubated overnight. The membranes were incubated with the secondary antibody (HRP-linked anti-rabbit IgG; 1:5000) in basal solution for 1 h. Immunoreactive bands were detected using an enhanced BioRad chemiluminescence system. Densitometry was performed using the ImageJ software (National Institutes of Health), and results represented as the percentage in relation to total protein expression. The membranes were photographed

at ChemiDoc XRS + System (Bio-Rad Laboratories) and the images were saved in TIFF format. The photos were transferred to the ImageJ software and the corresponding bands were selected. Next, the selected band lines were plotted and the corresponding area to each band was measured. After calculating the areas of each band, the area of the protein of interest was divided by the area of the endogenous protein (beta-actin or GAPDH). It is important to emphasize that the samples for protein determination were randomly chosen within our patient cohort (42/60 patients/control).

2.7 | Isolation and purification of IgG antibodies

First, blood from healthy volunteers or t-PAPS patients was collected in a tube without anticoagulants to obtain the serum. Next, serum samples were diluted (1:1) with phosphate-buffered saline 1X and centrifuged at 10 000g for 15 min. Then, total IgG was purified from serum samples by protein G-Sepharose column and the samples were eluted with an elution buffer (glycine 0.1 M; pH 2), and then neutralized with Tris 2 M (pH 8) (Billoir et al, 2018). The total concentration of purified IgG was determined using the Lowry protein assay. Anti- β 2GPI-IgG and anticardiolipin-IgG concentrations were determined using chemoluminescent immunoassay. QUANTA Flash β 2GPI IgG and QUANTA Flash Cardiolipin IgG assay kits were used in Bio-Flash Automatic Immunoassay Analyzer. Briefly, the assay consists of a two-step chemoluminescent immunoassay, in which magnetic particles coated with purified human β 2GPI or aCL capture anti- β 2GPI or anti-aCL phospholipid antibodies in the sample, when present. A marker (ISO luminol) that binds to the anti- β 2GPI IgG or anti-aCL IgG on the particles is then added. The reagents that activate the luminescent reaction are added and the emitted light is measured as relative light units, which are directly proportional to the concentration of antibodies in the sample. We did not quantify total IgG antibody or nonspecific isolated immune complexes.

2.8 | Statistical analysis

Data are shown as mean \pm SD and "n" indicates the number of volunteers used in each protocol. The initial experimental design of the study was performed using the sample calculation considering the significance level of 5% and the power of 80% from an exploratory analysis. A nonparametric Mann-Whitney test (comparison of two groups) or Kruskal-Wallis test (comparison of three or more groups) were performed, followed by a Dunn post hoc test for multiple comparisons. Statistical Analysis System program (version 9.4) (SAS Institute Inc) was used for statistical analysis. The number of volunteers tested was not equal in all figures because when the statistics reached significance, the protocols involving protein and cyclic nucleotide quantification were terminated prematurely. The samples

used for the protein and the kit assays were randomly chosen. This manuscript follows the STROBE checklist.

3 | RESULTS

3.1 | Baseline characteristics

Sixty-two healthy volunteers and 40 t-PAPS patients were included in the study. Most of the t-PAPS patients were women (62%) and the mean age was 44 years (SD = 14). In the control group, the mean age was 37 years (SD = 12) and most of the participants were women (64%). Triple positivity for aPL was detected in 40% of the patients. Thirty-five percent of the t-PAPS patients were hypertensive. No difference in the mean platelet volume and platelet count was observed between the groups. All patients were using warfarin. Demographic and clinical characteristics of both groups are described in Table 1.

3.2 | Aggregation in PRP from t-PAPS patients: role of ADP-P2Y₁₂ signaling pathway

The aggregation induced by ADP (Figure 1A) was increased by 17.4% (3 μ M, $p = .02$, $N_{\text{Control}} = 62$, $N_{\text{t-PAPS}} = 40$) and 8.8% (10 μ M, $p = .04$, $N_{\text{Control}} = 62$, $N_{\text{t-PAPS}} = 40$) in PRP from t-PAPS when compared with the control group. No difference in AA- ($p = .95$, $N_{\text{Control}} = 53$, $N_{\text{t-PAPS}} = 34$) or collagen- ($p = .56$, $N_{\text{Control}} = 42$, $N_{\text{t-PAPS}} = 25$) induced aggregation was observed between the groups (Figure 1B).

The protein expression for the ADP receptor subtypes was determined. The expression of P2Y₁₂ was 1.6-fold higher ($p = .01$, $N_{\text{Control}} = 10$, $N_{\text{t-PAPS}} = 10$) in platelets obtained from t-PAPS patients than in the control group (Figure 1C), whereas no difference was observed in the protein expression for the receptor subtype P2Y₁ ($p = .9$, $N_{\text{Control}} = 10$, $N_{\text{t-PAPS}} = 10$) (Figure 1D). No bands appeared in membranes incubated with the blocking peptide against the P2Y₁₂ receptor (Figure 1C).

3.3 | Antiplatelet activity induced by the NO donor or the prostacyclin analog is impaired in PRP from t-PAPS patients

Platelet reactivity is reduced when the intracellular levels of cAMP and cGMP are increased. As expected, SNP or iloprost (Figure 2A) significantly reduced the aggregation induced by ADP in PRP from both groups. However, the residual aggregation induced by ADP, even in the presence of SNP, remained higher (SNP 3 μ M: 46.4% \pm 25.8% vs 34.7% \pm 20.9%, $p = .02$ and SNP 10 μ M: 31.4% \pm 23.1% vs 18.8% \pm 14.9%, $p = .008$, $N_{\text{t-PAPS}} = 33$, $N_{\text{Control}} = 52$, respectively) in PRP from t-PAPS than in controls. Similar findings were observed when PRP was preincubated with iloprost (3 nM: 23.3% \pm 23.3% vs 12.1% \pm 14%, $p = .02$, $N_{\text{t-PAPS}} = 33$, $N_{\text{Control}} = 50$, respectively). On the other hand, the inhibitory effect induced by SNP or iloprost did not differ between groups when PRP was stimulated with collagen

TABLE 1 Baseline characteristics of t-PAPS and healthy participants

Feature	Control (n = 62)	t-PAPS (n = 40)	p
Sex			
Female, n (%)	40 (64.5)	25 (62.5)	.99
Male, n (%)	22 (35.5)	15 (37.5)	.90
Age, mean ± SD	37.3 ± 12.5	44.2 ± 14.5	.002**
BMI ≥30 kg/m ² , n (%)	5 (7.3)	14 (34.1)	.06
aPL profile			
Non-triple positive, n (%)	0	24 (60)	<.001***
Simply positivity for aβ2GPI or aCL, n	0	4	—
Simply positivity for LAC, n	0	11	—
Double positivity for aCL and aβ2GPI, n	0	3	—
Double positivity for LAC and aβ2GPI (or aCL), n	0	6	—
Triple positive, n (%)	0	16 (40)	<.001***
Platelet count, mean ± SD	254 ± 72.4	228 ± 73.1	.33
MPV, mean ± SD	8.4 ± 1.3	7.6 ± 1.1	.08
Serum biochemical parameters			
Total cholesterol, mean ± SD	193 ± 23.8	186.5 ± 37.4	.5
LDL, mean ± SD	112.7 ± 25.3	111.7 ± 31.7	.98
HDL, mean ± SD	54.5 ± 17.7	47.9 ± 14.2	.07
Triglycerides, mean ± SD	141.8 ± 78.4	140.5 ± 90.3	.92
Blood glucose, mean ± SD	86.5 ± 10	91.8 ± 11.8	.07
Obstetric complications, n (%)			
<3 unexplained consecutive spontaneous Abortions (<10 weeks), n (%)	3 (4.8)	8 (19.5)	.22
≥3 unexplained consecutive spontaneous Abortions (<10 weeks), n (%)	3 (100)	6 (75)	.50
Premature birth due to preeclampsia, n (%)	0	1 (12.5)	—
Fetal death, n (%)	0	2 (25)	—
Thrombotic complications			
Time elapsed since the last thrombotic event, mean (in months)	0	102.5	—
Site of the first thrombosis			
Arterial, n (%)	0	7 (17.1)	—
Venous, n (%)	0	33 (82.5)	—
Recurrent thrombosis, n (%)			
Recurrence of arterial thrombosis, n (%)	0	20 (48.7)	<.001***
Recurrence of venous thrombosis, n (%)	0	5 (25)	—
Medications			
Anticoagulants, n	0	40	—
Antihypertensive drugs, n	6	15	.05
Corticosteroids, n	0	4	—
Central nervous system drugs, n	3	8	.13
Hormones, n	5	5	.99
Statins and/or fibrates, n	6	6	.99
Immunosuppressants, n	0	3	—
Proton-pump inhibitors, n	0	3	—
5α-Reductase inhibitors, n	0	1	—
Oral hypoglycemic drugs, n	0	1	—
PDE-5 inhibitors, n	0	1	—

Note: ** $p < .01$; *** $p < .001$; $p \geq .05$ means not significant; '—' don't require statistical analysis.

Abbreviations: BMI, body mass index; HDL, high density lipoprotein; LAC, lupus anticoagulant; LDL, low density lipoprotein; MPV, mean platelet volume; n, number of volunteers; SD, standard deviation.

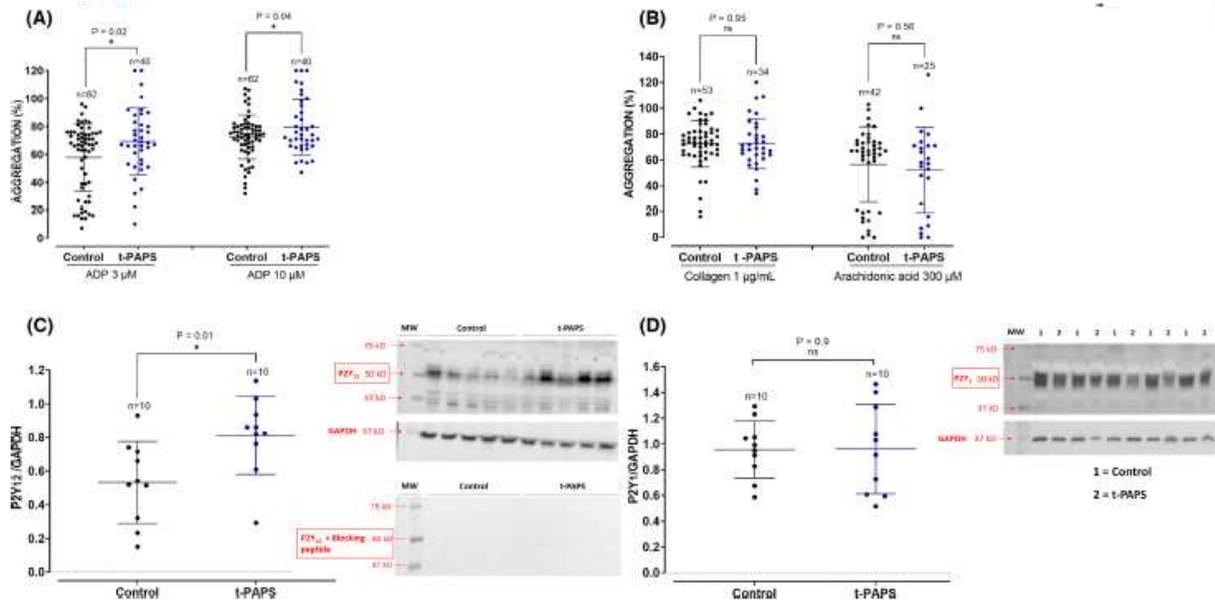


FIGURE 1 Platelet-rich plasma was obtained from healthy or thrombotic antiphospholipid syndrome (t-PAPS) participants and stimulated for 5 min with ADP (3 or 10 μ M, A), collagen (1 μ g/ml, B), or arachidonic acid (300 μ M, B). Protein expressions for P2Y₁₂ (C) in the absence and presence of the blocking peptide and P2Y₁ (D) receptors in washed platelets from healthy or t-PAPS participants. Data represent the mean values \pm SD. The N above each bar represents the number of volunteers used in each assay. * $p < .05$, ns, nonsignificant

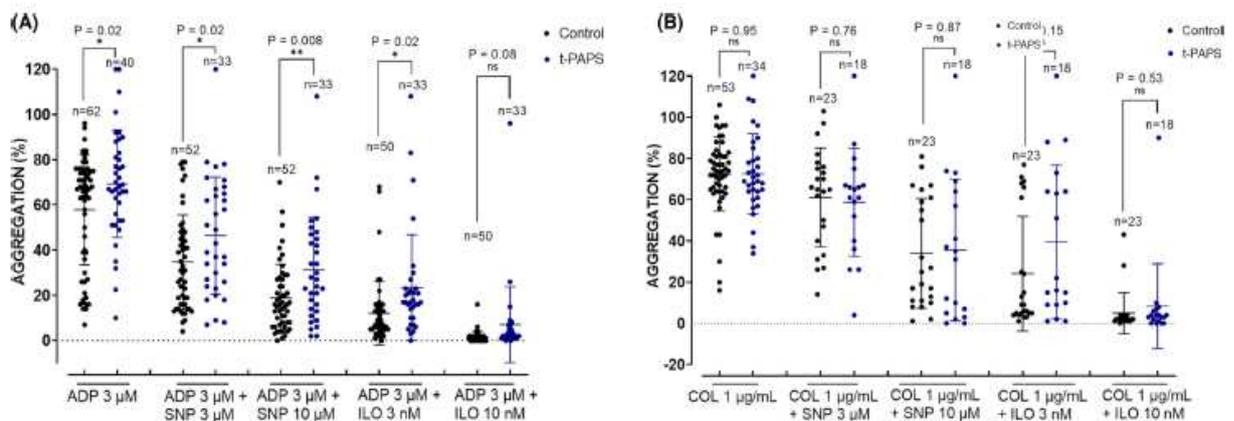


FIGURE 2 Sodium nitroprusside (SNP; 3 or 10 μ M) or iloprost (ILO; 3 or 10 nM) were preincubated for 3 min, followed by activation with ADP 3 μ M (5 min, A) or collagen 1 μ g/ml (5 min, B) in platelet-rich plasma obtained from healthy or thrombotic antiphospholipid syndrome (t-PAPS) participants. Data represent the mean values \pm SD. The N above each bar represents the number of volunteers used in each assay. * $p < .05$; ** $p < .01$, ns, nonsignificant

(SNP 3 μ M: $p = .76$; SNP 10 μ M: $p = .87$; iloprost 3 nM: $p = .15$; iloprost 10 nM: $p = .53$, $N_{t-PAPS} = 18$, $N_{Control} = 23$) (Figure 2B).

3.4 | Intracellular levels of cyclic nucleotides and protein expression for sGC-PDE5

Platelet-rich plasma from t-PAPS and controls was stimulated with iloprost or SNP to increase cAMP (Figure 3A) and cGMP (Figure 3B)

levels, respectively. In comparison with the control, the levels of cyclic nucleotides in t-PAPS were significantly reduced (%) in unstimulated PRP (cAMP: 45%, $p = .03$, $N = 10$ and cGMP: 40%, $p = .02$, $N = 9-10$) and in PRP stimulated with iloprost (1 nM: 56%, $p = .01$ and 3 nM: 41%, $p = .03$, $N = 10$) or with SNP (1 μ M: 50%, $p = .01$ and 3 μ M: 57%, $p = .002$, $N = 9-10$).

The protein expression of PDE5 ($p = .98$, $N_{Control} = 13$, $N_{t-PAPS} = 14$, Figure 4A), PDE3A ($p = .69$, $N_{Control} = 11$, $N_{t-PAPS} = 12$, Figure 4B), sGC $\alpha 1$ ($p = .69$, $N = 6$, Figure 4C), sGC $\beta 1$ ($p = .9$,

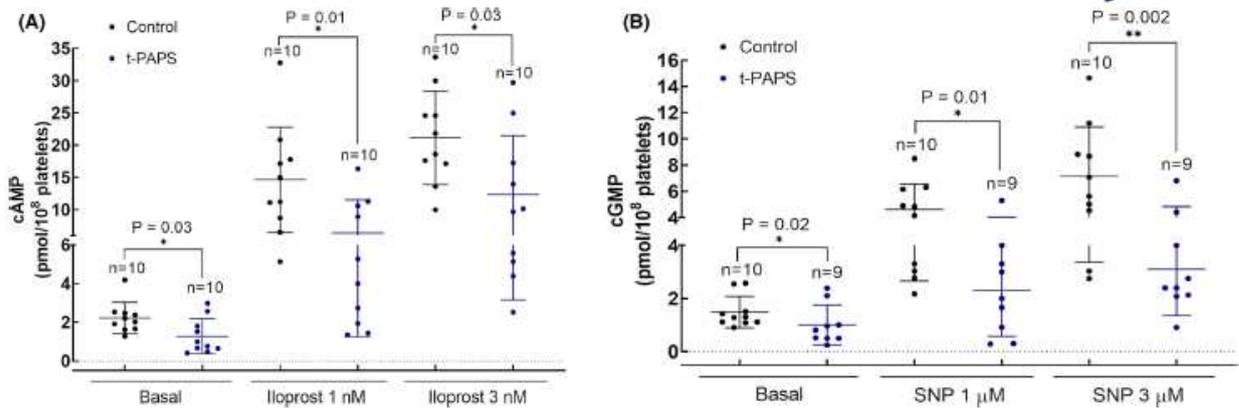


FIGURE 3 Intracellular levels of cAMP (A) or cGMP (B) in platelet-rich plasma from healthy or thrombotic antiphospholipid syndrome (t-PAPS) participants. Briefly, platelet-rich plasma was preincubated with 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; 1 mM; 20 min) in the absence (basal) and in the presence of iloprost (1 or 3 nM; 3 min) or SNP (1 or 3 μM; 3 min)

$N_{\text{Control}} = 13$, $N_{\text{t-PAPS}} = 14$, Figure 4D) did not differ between the groups. On the other hand, the protein expression for Gs alpha, which activates adenylate cyclase to produce cAMP, was more reduced in platelets from t-PAPS than in healthy participants ($p = .04$, $N_{\text{Control}} = 15$, $N_{\text{t-PAPS}} = 15$, Figure 4E).

3.5 | Ticagrelor alone or co-incubated with cilostazol reduced ADP-induced aggregation in PRP from both groups

The role of antiplatelet agents, other than aspirin, in patients with aPL/t-PAPS has been less studied. Because ADP-induced aggregation is enhanced in PRP from t-PAPS, we evaluated the effect of the P₂Y₁₂ antagonist, ticagrelor. As shown in Figure 5A, ticagrelor practically abolished the aggregation induced by ADP with similar magnitude in both groups ($p = .8$, $N_{\text{Control}} = 30$, $N_{\text{t-PAPS}} = 20$). Aspirin also reduced ADP-induced aggregation in both groups ($p = .09$, $N_{\text{Control}} = 25$, $N_{\text{t-PAPS}} = 20$), though, as expected, with less efficacy than ticagrelor. We further carried out concentration-response curves to ticagrelor in the absence and presence of therapeutic concentrations of cilostazol (Figure 5B). The magnitude of inhibition induced by ticagrelor did not differ between the groups even in the lower concentrations used. A significant potentiation by 1000-fold in the inhibitory effect induced by ticagrelor was observed in PRP from both groups pre-incubated with cilostazol (Figure 5B).

3.6 | Isolated IgG antibodies from t-PAPS patients enhanced ADP-induced aggregation

Washed platelets obtained from healthy volunteers were stimulated with ADP 30 μM in the absence and presence of isolated IgG antibodies from t-PAPS or healthy volunteers. Although IgG antibodies alone did not induce aggregation, IgG antibodies from t-PAPS patients potentiated ADP-induced aggregation in comparison

to WP incubated with IgG antibodies from healthy volunteers ($66.2\% \pm 7.9\%$ vs $52.2\% \pm 10.6\%$, $p = .004$, $N = 10$) and in comparison to the vehicle ($66.2\% \pm 7.9\%$ vs $46.0\% \pm 16.6\%$, $p = .004$, $N = 10$). To verify whether isolated IgG antibodies from t-PAPS could affect the inhibitory effect of SNP or iloprost, WP was preincubated with IgG antibodies followed by SNP (0.1 μM, 3 min) or iloprost (1 nM, 3 min). Contrary to the results in the PRP samples, isolated IgG antibodies did not interfere in the inhibitory effects induced by SNP or iloprost in comparison with platelets incubated only with control IgG or and with the vehicle (Figure 6A). Ticagrelor (2 μM; 3 min) abolished ADP-induced aggregation in the absence and in the presence of these antibodies (Figure 6B).

4 | DISCUSSION

Our results showed that platelets obtained from t-PAPS patients have enhanced reactivity upon ADP stimulation and are less susceptible to the inhibitory effect of SNP and iloprost. Additionally, resting platelets from t-PAPS patients have a higher protein expression of P2Y₁₂ receptor and a lower expression of Gsα, contributing to lower intraplatelet levels of cAMP under basal and iloprost stimulation conditions. The intracellular levels of cGMP and the inhibitory response induced by SNP were also reduced.

Among the 15 hypertensive t-PAPS patients, who represent 35% of the t-PAPS cohort, 46%, 33%, 26%, 20%, and 20% of them were using angiotensin II receptor antagonists, thiazide diuretics (hydrochlorothiazide), angiotensin-converting enzyme inhibitors, calcium channel blockers (amlodipine), and beta-blockers. Previous studies showed that angiotensin II receptor antagonists,¹⁶ angiotensin-converting enzyme inhibitors,¹⁷ beta-blockers,¹⁶ and amlodipine¹⁹ reduced or did not affect platelet reactivity. We found no information regarding the role of hydrochlorothiazide on platelet activity. Thus, because platelets from the t-PAPS groups showed greater ADP response in comparison with the healthy controls, the antihypertensives drugs did not interfere in this response.

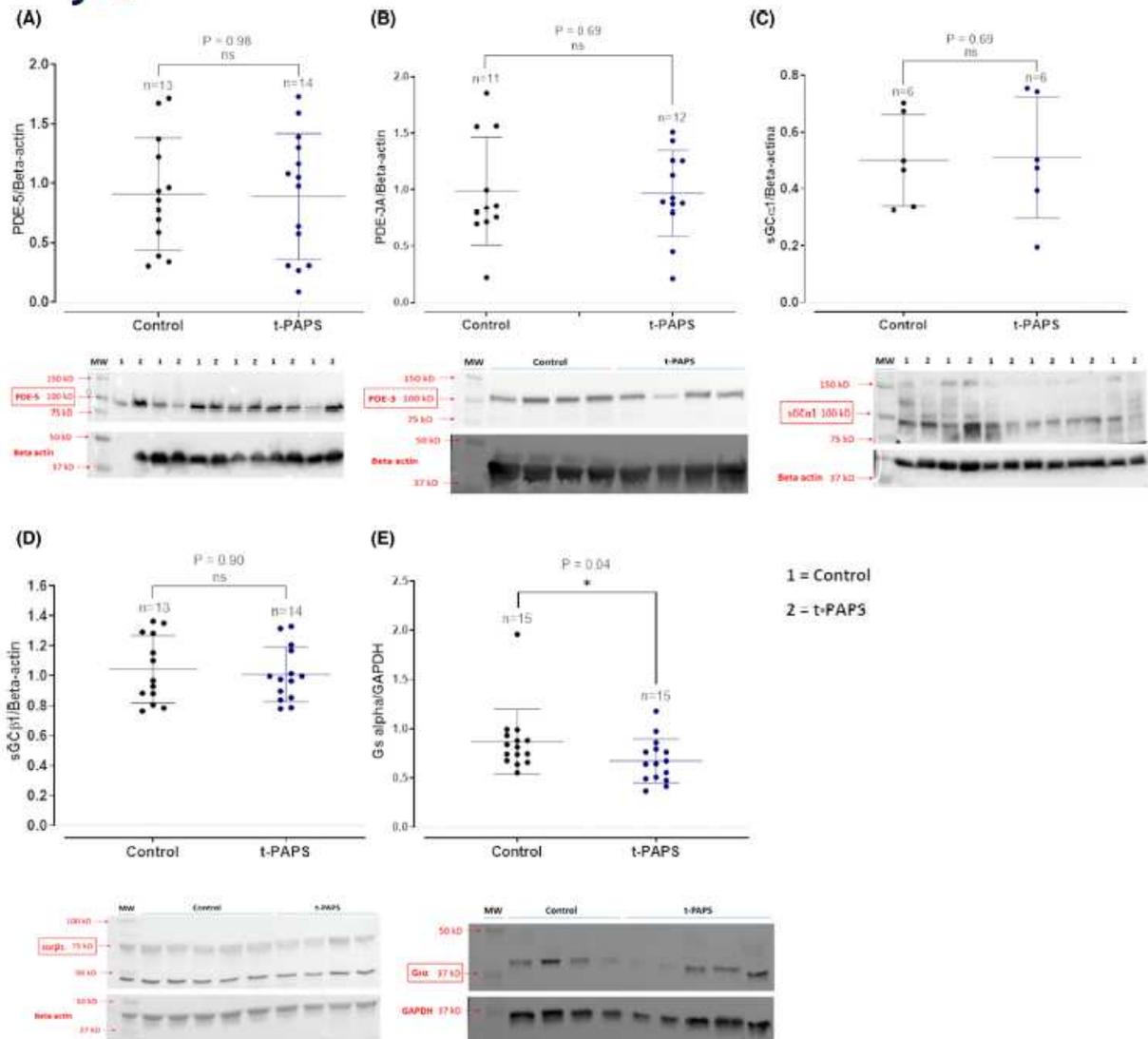


FIGURE 4 Protein expression for phosphodiesterase type 5 (PDE5, A), phosphodiesterase type 3 (PDE3, B), soluble guanylate cyclase subunits alpha 1 (sGC α 1, C) and beta 1 (sGC β 1, D), and Gs alpha subunit (Gs α , E) in washed platelets from healthy or thrombotic antiphospholipid syndrome (t-PAPS) volunteers. Data represent the mean values \pm SD. The N above each bar represents the number of volunteers used in each assay. * $p < .05$, ns, nonsignificant

The majority of our patients presented with venous thrombosis. Platelets have attracted much interest in the arterial diseases, whereas their role in venous thromboembolism (VTE) has gained much less attention. However, recent evidence has shown that platelets may play a role in VTE. A recent paper²⁰ showed that participants in the highest quartile of platelet-derived microvesicles (%) had an odds ratio of 1.78 (95% CI: 1.21–2.64) and 1.99 (95% CI: 1.24–3.26) for provoked VTE in comparison with those patients in the lowest quartile. Another study evaluated platelet function obtained from patients with isolated pulmonary embolism (iPE), isolated deep vein thrombosis (iDVT), and DVT + PE. No platelets from healthy participants were included in this study. Briefly, the authors

observed that the aggregation induced by epinephrine and ADP was lower in iPE or DVT + PE. Lower expressions for PAC-1 and thrombin generation were observed in platelets from DVT + PE and iPE in comparison with iDVT. This study suggests that platelet phenotypes vary between iPE and iDVT and lower activity of platelet in iPE patients suggest higher platelet degranulation.²¹

Adenine-derived nucleotides (ATP, ADP, and adenosine monophosphate) and nucleoside (adenosine) are continuously released from different cells in the bloodstream and, hence, these mediators play an important role in platelet reactivity. Platelets express P2X₁R, P2Y₁R, and P2Y₁₂R. The subtypes P2Y₁ and P2Y₁₂ are involved in platelet activation. Although P2Y₁ is a Gq-coupled

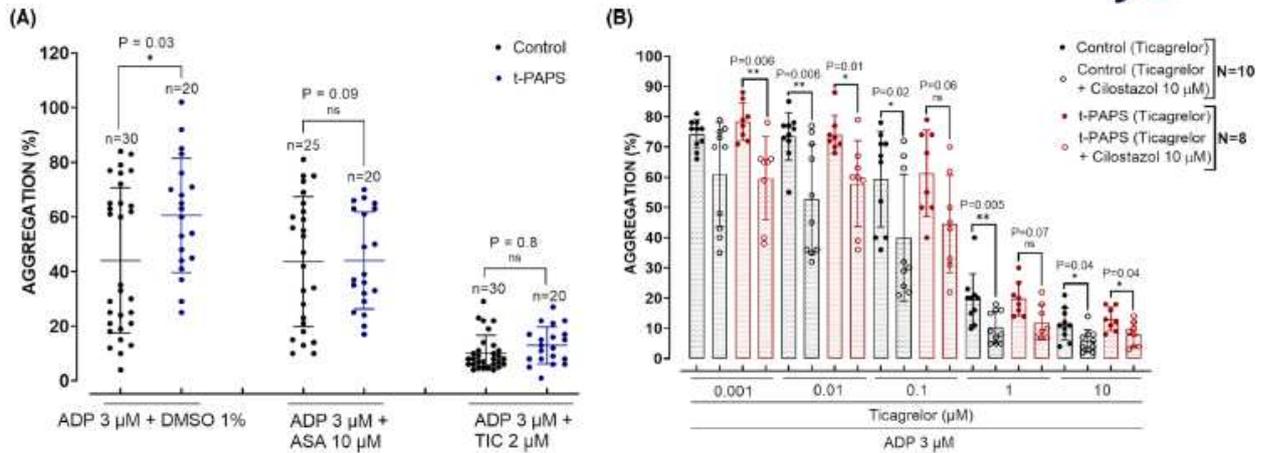


FIGURE 5 (A) ADP-induced platelet aggregation in the presence of antiplatelet drugs. Acetylsalicylic acid (ASA; 10 μM), ticagrelor (TIC; 2 μM), or vehicle (dimethyl sulfoxide 1%) were preincubated for 3 min, followed by activation with ADP 3 μM (5 min) in platelet-rich plasma obtained from healthy or thrombotic antiphospholipid syndrome (t-PAPS) participants. (B) In another set of experiments, the concentration response curves for ticagrelor (0.001–10 μM) were carried out in the absence and presence of cilostazol (10 μM). Data represent the mean values \pm SD. The N above each bar represents the number of volunteers used in each assay. *** $p < .05$, ns: nonsignificant

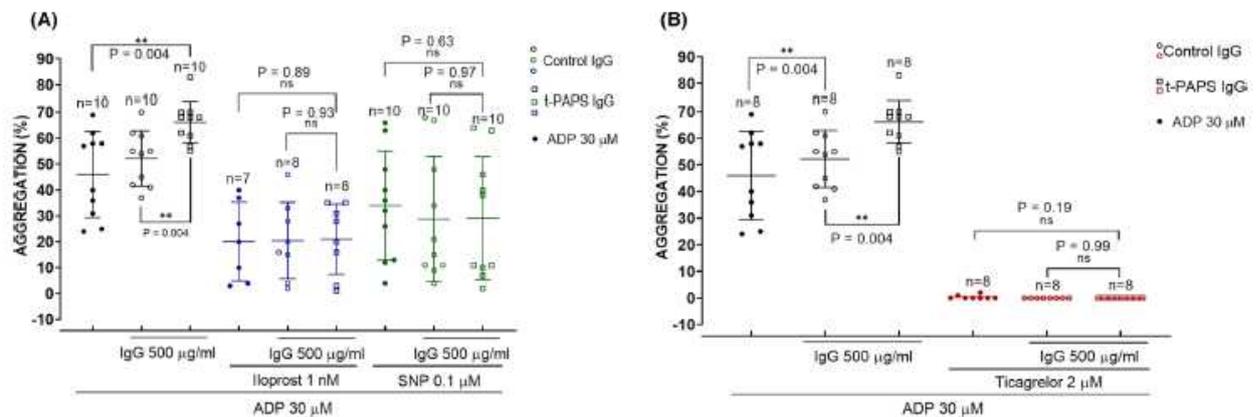


FIGURE 6 (A) ADP-induced platelet aggregation in the presence of IgG antibodies isolated from healthy or thrombotic antiphospholipid syndrome (t-PAPS) participants. Briefly, washed platelet from healthy volunteers was incubated with IgG antibodies (500 $\mu\text{g/ml}$ total IgG, 30 min) isolated from the serum of healthy volunteers or t-PAPS patients and then stimulated with ADP 30 μM in the absence and in the presence of sodium nitroprusside (SNP; 0.1 μM ; 3 min) or iloprost (ILO; 1 nM; 3 min). (B) Washed platelets from healthy volunteers were incubated with IgG antibodies from healthy or t-PAPS participants in the absence (vehicle) and in the presence of ticagrelor (TIC; 2 μM ; 3 min) followed by the activation of ADP 30 μM . Data represent the mean values \pm SD. The N above each bar represents the number of volunteers used in each assay. * $p < .05$, ns: nonsignificant

receptor that initiates platelet activation through the stimulation of phospholipase C and phosphatidylinositol pathways, the subtype P2Y_{12} is coupled to G_{α_i} , which reduces the intraplatelet levels of cAMP and the activation of protein kinase A.²² Among the platelet agonists tested, only ADP induced greater amplitude of aggregation in PRP from t-PAPS patients, probably because of greater protein expression for P2Y_{12} , accompanied by lower intraplatelet levels of cAMP. Our results are corroborated by previous findings that demonstrated an enhanced platelet activity under ADP stimulation in patients with thrombotic APS, in comparison to control or asymptomatic individuals with aPL.²³ In contrast to that study, however, our study characterizes the intracellular pathways involved in this response.

The alteration of the ADP- P2Y_{12} signaling pathway on platelets was further observed in other cardiovascular-related diseases. For instance, hyperactivated platelets from diabetic type 2 patients presented a two-fold increase in the expression of P2Y_{12} receptor, accompanied by higher response induced by ADP in comparison to platelets from healthy volunteers.²⁴ Another study in platelets from diabetic individuals showed that the expression of miR-223, which regulates P2Y_{12} expression, was reduced and P2Y_{12} increased in comparison with the healthy and obese participants. The human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, treated with high concentrations of glucose (33 mM) for 8 h up to 4 weeks presented lower and higher expression of miR-223 and P2Y_{12} , respectively.²⁵ To date, there are no studies that evaluated the role of miR-223 in

the context of t-PAPS. Patients with secondary progressive multiple sclerosis have a high risk of ischemic events. Platelets and megakaryocytes obtained from secondary progressive multiple sclerosis showed higher gene and protein expression for P2Y₁₂ and greater ADP-induced aggregation in comparison to platelets from healthy controls.²⁶ In the study from Hu et al., the aggregation induced by ADP (10 μM) is well correlated with the protein level of P2Y₁₂ receptor. Because we did not carry out protein expression for P2Y₁₂ in the entire cohort (N = 102 participants), we were not able to carry out this analysis, which we consider a limitation of the present study. Previous studies^{27–30} have already shown that polymorphisms in the P2Y₁₂ gene can interfere in the receptor activity and, hence, in the magnitude of ADP response. Therefore, protein levels do not always correlate with this activity when dealing with variants. For example, if we compare the aggregation induced by ADP in our healthy group and with the healthy group from the previous study,²⁴ carried out in Chinese participants, the variability of ADP response is higher in our cohort. There is a lack of data regarding P2Y₁₂ and P2Y₁ variants in the Brazilian population, in which there is a higher miscegenation than the in the Chinese population.

The intracellular levels of cyclic nucleotides are controlled by their rate of formation through the actions of sGC and adenylate cyclase and the degradation by phosphodiesterases (PDEs)³¹ or by their extrusion through the action of multidrug resistance proteins type 4 (MRP4).^{32–34} Agonists that activate Gs-coupled receptors, such as PGI₂ or iloprost (IP receptor), prostaglandin E₂ (EP2/EP4 receptor subtypes), and adenosine (A₂ receptor subtype) increase the intraplatelet levels of cAMP. Nitric oxide is the main mediator that increases cGMP levels through the activation of its intracellular receptor named sGC, a heterodimeric protein composed of α1 and β1 subunits.³⁵

Impairment in the IP-Gsα pathways has been studied in platelets from patients suffering from a condition classified as Albright hereditary osteodystrophy, which is characterized by a mutation in the gene encoding the GTPase subunit Gsα leading to lower expression. Five patients with this syndrome presented lower inhibitory response induced by increasing concentrations of iloprost (1–10 nM) in comparison with the age- and sex-matched healthy controls.³⁶ In addition to the greater expression for P2Y₁₂, the lower protein expression for Gsα is another factor that can contribute to the reduced intracellular levels of cAMP and the less inhibitory response induced by iloprost seen in the platelets from t-PAPS patients.

Platelets express PDE2, PDE3, and PDE5. The isoforms PDE2 and PDE3 hydrolyze cAMP and cGMP, whereas PDE5 degrades preferentially cGMP.^{31,37} cGMP also regulates the intracellular levels of cAMP by stimulating and inhibiting, respectively PDE2 and PDE3.^{31,37} In our functional and biochemical assays, the magnitude of inhibition clearly induced by SNP is impaired accompanied by lower intracellular levels of cGMP in platelets from t-PAPS; however, we found no significant difference in the protein expression for PDE3, PDE5, and sGC subunits. At first, we hypothesized that sGC subunits and PDE2/PDE3/PDE5 expression could be lower and higher, respectively, in the t-PAPS patients, thus interfering in both

cAMP and cGMP levels. One limitation of the present manuscript is that we did not assess the activity of the enzymes PDEs and sGC. Other mechanisms could interfere in reducing the cytosolic levels of cGMP, such as the oxidation of the heme portion of sGC induced by, for example, higher production of reactive oxygen species or the greater expression of MRP4; however, because of issues with the tools available, we were not able to confirm these hypotheses.

In *in vitro* experiments with washed platelets obtained from healthy volunteers, isolated aPL from seven APS patients markedly potentiated thrombin-induced platelet aggregation.¹³ Recombinant JGG9 (rJGG9), which binds to anti-β2GPI, induced PRP aggregation, and potentiated the aggregation induced by sub-threshold concentrations of adenosine diphosphate (ADP, 0.05–0.1 μM). Prior incubation of rapamycin (20 μM), an mTOR inhibitor, prevented rJGG9-induced aggregation.¹⁵ Isolated healthy platelets exposed to the immobilized anti-β2GPI/β2GPI complex presented greater expression of GPα2β3 and P-selectin as well as thromboxane B₂ production in comparison to platelets exposed to IgG/β2GPI or anti-β2GPI/BSA. Inhibitor of apoER2' or the GPIα antibody reversed the activation induced by the complex.¹⁴ Our results corroborate previous findings and results obtained with PRP from t-PAPS patients as isolated IgG antibodies from t-PAPS patients produced increased platelet aggregation induced by ADP (30 μM). The P2Y₁₂ antagonist, ticagrelor almost abolished ADP-induced aggregation in PRP from both groups. However, IgG antibodies isolated from t-PAPS failed to reproduce the resistance to the inhibitory effect of SNP and iloprost and the reduction in cAMP or cGMP levels observed in PRP from t-PAPS patients. One possible explanation for this apparent discrepancy is that platelet and plasma from t-PAPS release pro-inflammatory, pro-coagulant, pro-oxidant mediators,^{38,39} ectonucleotidases on the membrane surfaces from cells⁴⁰ that contribute to the exacerbation of the pathological responses induced by ADP and/or by the reduction in the efficacy of substances that increase the levels of cAMP or cGMP.

Because the P2Y₁₂ pathway showed increased activity in PRP from t-PAPS, ticagrelor was incubated *in vitro*. The antiplatelet activity of ticagrelor was similar in both groups, even at the lowest concentrations. Our results corroborate a previous study where a two-fold increase in P2Y₁₂ was observed in platelets from diabetic patients thus leading to higher ADP aggregation, the antiplatelet activities induced by the P2Y₁₂ antagonist, cangrelor (1 nM), or the inverse agonist AR-C78511 (1 nM), however, did not differ in platelets from both healthy and diabetic patients. Ticagrelor was chosen for the *in vitro* assays because of the pharmacokinetics advantages over clopidogrel and prasugrel; ticagrelor is considered an inverse agonist of the P₂Y₁₂ receptor and is not a prodrug, presenting a rapid onset and offset action and inhibits the equilibrative nucleoside transporter 1 in increasing the extracellular concentration of adenosine, which also contributes to platelet inhibition.⁴¹ The therapeutic dose of ticagrelor for treating patients with stable coronary artery disease is a loading dose of 180 mg followed by a maintenance dose of 90 mg twice/day. Pharmacokinetics parameters of ticagrelor at day 14 in patients receiving 50, 100, 200, and 400 mg twice/day showed a

maximal concentration value of, respectively, 375, 810, 2278, and 3653 ng/ml.⁴² Therefore, the concentration of ticagrelor chosen for the *in vitro* assays was 2 μ M (~maximal concentration of a 100 mg dose), which corresponds to a therapeutic dose.

Although PDE2 inhibitors are still under preclinical testing, the PDE3 inhibitors such as cilostazol and milrinone are used for the treatment of intermittent claudication/peripheral artery disease and congestive heart failure, respectively. The role of cilostazol as an antiplatelet agent has been demonstrated in preclinical and in clinical trials. Although its primary mechanism of action is PDE3 inhibition, other targets such as inhibition of MRP4⁴³ and the adenosine reuptake transporter⁴⁴ have been reported. The adjunctive treatment of cilostazol with P2Y₁₂ inhibitors reduced the stroke/transient ischemic attack events and improved claudication symptoms.^{45,46} A more recent study showed that the results of patients who received P2Y₁₂ inhibitors with cilostazol were non-inferior when compared with the aspirin arm group in preventing the incidence of all-cause death and acute myocardial infarction.⁴⁷ Bleeding time was not increased in these trials. In the present manuscript, we carried out concentration-response curves for ticagrelor in the absence and presence of cilostazol (10 μ M). Cilostazol potentiated by, approximately, 1000-fold (considering the therapeutic concentration of ticagrelor, that is in the range of 1–2 μ M), the inhibitory response induced by ticagrelor in both groups. The therapeutic concentration of cilostazol (100 mg/twice daily) is in the concentration range of 2–10 μ M and can vary under the fed and fasted states.^{48,49}

It is well established that aspirin alone or in association with the P2Y₁₂ blockers (clopidogrel, prasugrel, or ticagrelor) reduce the risk of acute thrombotic events. Aspirin is one of the oldest antiplatelet agents and trials in the past few decades were conducted in a manner that aspirin was always presented in the arm groups, even in the presence of more efficacious P2Y₁₂ blockers. More recently, several studies have been comparing the efficacy and safety of a monotherapy of ticagrelor in patients with coronary artery diseases.^{50–55} Therefore, our study paves the way to test the role of a monotherapy with ticagrelor alone or in association with cilostazol in patients with APS and arterial thrombosis and/or who are resistant or intolerant to aspirin. Furthermore, because the intraplatelet levels of cyclic nucleotides are reduced in platelets from t-PAPS individuals, our study also opens up the possibility to test approved agents in clinic practice that increase the levels of AMPc or GMPc such as sGC modulators (riociguat or vericiguat), PDE5 inhibitors (sildenafil, vardenafil, or tadalafil), PDE3 inhibitor (cilostazol), or a dual PDE inhibitor/nucleoside transporter inhibitor (dipyridamole) in association with a lower dose of aspirin or P2Y₁₂ antagonists, especially in those patients with a high risk of bleeding.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP 2017/15175-1; 2018/21880-2), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 405024/2018-5), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

(CAPES- Finance Code 001). We also thank Raquel S. Foglio for the English revision.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

INFORMED CONSENT

The study was undertaken in accordance with the Declaration of Helsinki and International Conference on Harmonization guidelines for Good Clinical Practice. All participants gave written informed consent prior to participation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Guilherme Leonardi, Caroline Lescano, José Luiz Costa, and Bruna Mazetto contributed to the study design and the analysis and interpretation of the data. Fabiola Zakia Monica and Fernanda Orsi were the principal investigators and were responsible for the design, conducting, and funding of the study and data report.

ORCID

Guilherme Ruiz Leonardi  <https://orcid.org/0000-0002-3003-4194>

Caroline Honaiser Lescano  <https://orcid.org/0000-0003-4193-7361>

Jose Luiz Costa  <https://orcid.org/0000-0001-9607-3391>

Bruna Mazetto  <https://orcid.org/0000-0002-8778-4658>

Fernanda Andrade Orsi  <https://orcid.org/0000-0002-7908-9073>

Fabiola Zakia Monica  <https://orcid.org/0000-0002-8449-6677>

REFERENCES

1. Meroni PL, Borghi MO, Grossi C, Chighizola CB, Durigutto P, Tedesco F. Obstetric and vascular antiphospholipid syndrome: same antibodies but different diseases? *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14:433-440.
2. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. 2006;4:295-306.
3. P Schreiber K, Sciascia S, de Groot PG, et al. Antiphospholipid syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:17103.
4. Peerschke EI, Yin W, Alpert DR, Roubey RA, Salmon JE, Ghebrehwet B. Serum complement activation on heterologous platelets is associated with arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibodies. *Lupus*. 2009;18:530-538.
5. Vreede AP, Bockenstedt PL, Knight JS. Antiphospholipid syndrome: an update for clinicians and scientists. *Curr Opin Rheumatol*. 2017;29:458-466.
6. Ramesh S, Morrell CN, Tarango C, et al. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via β 2GPI and apoER2. *J Clin Invest*. 2011;121:120-131.
7. Sacharidou A, Chambliss KL, Ulrich V, et al. Antiphospholipid antibodies induce thrombosis by PP2A activation via apoER2-Dab2-SHC1 complex formation in endothelium. *Blood*. 2018;131:2097-2110.
8. Müller-Calleja N, Hollerbach A, Häuser F, Canisius A, Orning C, Lackner KJ. Antiphospholipid antibody-induced cellular responses depend on epitope specificity: implications for

- treatment of antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 2017;15:2367-2376.
9. Ali RA, Gandhi AA, Meng H, et al. Adenosine receptor agonism protects against NETosis and thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Nat Commun.* 2019;10:1916.
 10. Wolberg AS, Rosendaal FR, Weitz JI, et al. Venous thrombosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15006.
 11. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature.* 2021;592:524-533.
 12. Soehnlein O, Libby P. Targeting inflammation in atherosclerosis - from experimental insights to the clinic. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20:589-610.
 13. Vega-Ostertag M, Harris EN, Pierangeli SS. Intracellular events in platelet activation induced by antiphospholipid antibodies in the presence of low doses of thrombin. *Arthritis Rheum.* 2004;50:2911-2919.
 14. Zhang W, Gao F, Lu D, et al. Anti- β 2 glycoprotein I antibodies in complex with β 2 glycoprotein I induce platelet activation via two receptors: apolipoprotein E receptor 2' and glycoprotein I α . *Front Med.* 2016;10:76-84.
 15. Hollerbach A, Müller-Calleja N, Ritter S, et al. Platelet activation by antiphospholipid antibodies depends on epitope specificity and is prevented by mTOR inhibitors. *Thromb Haemost.* 2019;119:1147-1153.
 16. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Fukuhara S, Iwasaka T. Losartan and simvastatin inhibit platelet activation in hypertensive patients. *J Thromb Thrombolysis.* 2004;18:177-185.
 17. Schwieler JH, Kahan T, Wallén NH, Nussberger J, Hjendahl P. Inhibition of the renin-angiotensin system does not reduce platelet activity at rest or during stress in hypertension. *J Hypertens.* 2013;31:1676-1682.
 18. Ilardi F, Gargiulo G, Schiattarella GG, et al. Effects of carvedilol versus metoprolol on platelet aggregation in patients with acute coronary syndrome: the PLATE-BLOCK study. *Am J Cardiol.* 2018;122:6-11.
 19. Li AY, Ng FH, Chan FK, Tunggal P, Chan K, Lau YK. Effect of amlodipine on platelet inhibition by clopidogrel in patients with ischaemic heart disease: a randomised, controlled trial. *Heart.* 2013;99:468-473.
 20. Snir O, Wilsgård L, Latysheva N, et al. Plasma levels of platelet-derived microvesicles are associated with risk of future venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2022;20(4):899-908.
 21. Panova-Noeva M, Wagner B, Nagler M, et al. Variation of platelet function in clinical phenotypes of acute venous thromboembolism - results from the GMP-VTE project. *J Thromb Haemost.* 2021;20(3):705-715.
 22. Anderson R, Theron AJ, Steel HC, Nel JG, Tintinger GR. ADP-mediated upregulation of expression of CD62P on human platelets is critically dependent on co-activation of P2Y1 and P2Y12 receptors. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020;13:420.
 23. Levy Y, Shenkman B, Tamarin I, et al. Increased platelet deposition on extracellular matrix under flow conditions in patients with antiphospholipid syndrome who experience thrombotic events. *Arthritis Rheum.* 2005;52:4011-4017.
 24. Hu L, Chang L, Zhang Y, et al. Platelets express activated P2Y12 receptor in patients with diabetes mellitus. *Circulation.* 2017;136:817-833.
 25. Fejes Z, Pólska S, Czimmerer Z, et al. Hyperglycaemia suppresses microRNA expression in platelets to increase P2RY12 and SELP levels in type 2 diabetes mellitus. *Thromb Haemost.* 2017;117:529-542.
 26. Dziedzic A, Miller E, Saluk-Bijak J, Niwald M, Bijak M. The molecular aspects of disturbed platelet activation through ADP/P2Y12 pathway in multiple sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2021;22:6572.
 27. Bouman HJ, Parlak E, van Werkum JW, et al. Which platelet function test is suitable to monitor clopidogrel responsiveness? A pharmacokinetic analysis on the active metabolite of clopidogrel. *J Thromb Haemost.* 2010;8:482-488.
 28. Lee SJ, Jung IS, Jung EJ, et al. Identification of P2Y12 single-nucleotide polymorphisms and their influences on the variation in ADP-induced platelet aggregation. *Thromb Res.* 2011;127:220-227.
 29. Zhang S, Zhu J, Li H, et al. Study of the association of PEAR1, P2Y12, and UGT2A1 polymorphisms with platelet reactivity in response to dual antiplatelet therapy in Chinese patients. *Cardiology.* 2018;140:21-29.
 30. Li Z, Dong W, Yang D, et al. Body weight, CYP2C19, and P2Y12 receptor polymorphisms relate to clopidogrel resistance in a cohort of Chinese ischemic stroke patients with aspirin intolerance. *Eur J Clin Pharmacol.* 2020;76:1517-1527.
 31. Gresle P, Momi S, Falcinelli E. Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;72:634-646.
 32. Mendes-Silverio CB, Lescano CH, Zaminelli T, et al. Activation of soluble guanylyl cyclase with inhibition of multidrug resistance protein inhibitor-4 (MRP4) as a new antiplatelet therapy. *Biochem Pharmacol.* 2018;152:165-173.
 33. Alemanno L, Massimi I, Klaus V, et al. Impact of multidrug resistance protein-4 inhibitors on modulating platelet function and high on-aspirin treatment platelet reactivity. *Thromb Haemost.* 2018;118:490-501.
 34. Belleville-Rolland T, Leuci A, Mansour A, et al. Role of membrane lipid rafts in MRP4 (ABCC4) dependent regulation of the cAMP pathway in blood platelets. *Thromb Haemost.* 2021;121(12):1628-1636.
 35. Walter U, Gambaryan S. cGMP and cGMP-dependent protein kinase in platelets and blood cells. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;191:533-548.
 36. Swieringa F, Solari FA, Pagel O, et al. Impaired iloprost-induced platelet inhibition and phosphoproteome changes in patients with confirmed pseudohypoparathyroidism type Ia, linked to genetic mutations in GNAS. *Sci Rep.* 2020;10:11389.
 37. Hidaka H, Asano T. Platelet cyclic 3':5'-nucleotide phosphodiesterase released by thrombin and calcium ionophore. *J Biol Chem.* 1976;251:7508-7516.
 38. Arantes FT, Mazetto BM, Saraiva SS, et al. Inflammatory markers in thrombosis associated with primary antiphospholipid syndrome. *J Thromb Thrombolysis.* 2020;50:772-781.
 39. Vaz CO, Mazetto BM, Vasconcelos PENS, et al. Association between plasmatic oxidative stress and thrombosis in primary antiphospholipid syndrome. *J Thromb Thrombolysis.* 2021;52(3):730-737.
 40. Samudra AN, Dwyer KM, Selan C, et al. CD39 and CD73 activity are protective in a mouse model of antiphospholipid antibody-induced miscarriages. *J Autoimmun.* 2018;88:131-138.
 41. Aungraheeta R, Conibear A, Butler M, et al. Inverse agonism at the P2Y12 receptor and ENT1 transporter blockade contribute to platelet inhibition by ticagrelor. *Blood.* 2016;128:2717-2728.
 42. Dobesh PP, Oestreich JH. Ticagrelor: pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical efficacy, and safety. *Pharmacotherapy.* 2014;34:1077-1090.
 43. Guarino ML, Massimi I, Alemanno L, Conti L, Angiolillo DJ, Pulcinelli FM. MRP4 over-expression has a role on both reducing nitric oxide-dependent antiplatelet effect and enhancing ADP induced platelet activation. *J Thromb Thrombolysis.* 2021;51:625-632.
 44. Kherallah RY, Khawaja M, Olson M, Angiolillo D, Birnbaum Y. Cilostazol: a review of basic mechanisms and clinical uses. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2021. doi: 10.1007/s10557-021-07187-x
 45. Kalantzi K, Tentolouris N, Melidonis AJ, et al. Efficacy and safety of adjunctive cilostazol to clopidogrel-treated diabetic patients with symptomatic lower extremity artery disease in the prevention of ischemic vascular events. *J Am Heart Assoc.* 2021;10:e018184.
 46. Uchiyama S, Toyoda K, Omae K, et al. Dual antiplatelet therapy using cilostazol in patients with stroke and intracranial arterial stenosis. *J Am Heart Assoc.* 2021;10:e022575.

47. Zhao Y, Zhou P, Gao W, et al. Cilostazol combined with P2Y₁₂ receptor inhibitors: a substitute antiplatelet regimen for aspirin-intolerant patients undergoing percutaneous coronary stent implantation. *Clin Cardiol*. 2022;45:189-197.
48. Bramer SL, Forbes WP, Mallikarjun S. Cilostazol pharmacokinetics after single and multiple oral doses in healthy males and patients with intermittent claudication resulting from peripheral arterial disease. *Clin Pharmacokinet*. 1999;37(Suppl 2):1-11.
49. Yokoyama T, Yamauchi S, Yamagata K, et al. Impact of cilostazol pharmacokinetics on the development of cardiovascular side effects in patients with cerebral infarction. *Biol Pharm Bull*. 2021;44:1767-1774.
50. Mehran R, Baber U, Sharma SK, et al. Ticagrelor with or without aspirin in high-risk patients after PCI. *N Engl J Med*. 2019;381:2032-2042.
51. Franzone A, McFadden E, Leonardi S, et al. Ticagrelor alone versus dual antiplatelet therapy from 1 month after drug-eluting coronary stenting. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74:2223-2234.
52. Franzone A, McFadden EP, Leonardi S, et al. Ticagrelor alone or conventional dual antiplatelet therapy in patients with stable or acute coronary syndromes. *EuroIntervention*. 2020;16:627-633.
53. Gamal AS, Hara H, Tomaniak M, et al. Ticagrelor alone vs. dual antiplatelet therapy from 1 month after drug-eluting coronary stenting among patients with STEMI: a post hoc analysis of the randomized GLOBAL LEADERS trial. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2021;10:756-773.
54. Gelbenegger G, Schoergenhofer C, Jilma B, et al. Efficacy and safety of Ticagrelor monotherapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention; a meta-analysis. *Clin Pharmacol Ther*. 2021;110:424-431.
55. Valgimigli M, Mehran R, Franzone A, et al. Ticagrelor monotherapy versus dual-antiplatelet therapy after PCI: an individual patient-level meta-analysis. *JACC Cardiovasc Interv*. 2021;14:444-456.

How to cite this article: Leonardi GR, Lescano CH, Costa JL, Mazetto B, Orsi FA, Monica FZ. Adenosine diphosphate-induced aggregation is enhanced in platelets obtained from patients with thrombotic primary antiphospholipid syndrome (t-PAPS): Role of P2Y₁₂-cAMP signaling pathway. *J Thromb Haemost*. 2022;20:1699-1711. doi:[10.1111/jth.15724](https://doi.org/10.1111/jth.15724)

6. CONCLUSÃO

As plaquetas isoladas de pacientes com SAF primária trombótica apresentaram alteração na via $P2Y_{12}$ – AMPc e nos níveis intracelulares de GMPc. A maior reatividade plaquetária de pacientes com SAF pode ser atribuída, em parte, aos menores níveis intracelulares de AMPc e GMPc. A redução significativa da reatividade plaquetária na presença de outros antiplaquetários além da aspirina, abre a possibilidade para avaliar a eficácia e segurança da monoterapia com ticagrelor, associado ou não ao cilostazol, em pacientes com SAF primária e trombose arterial, que sejam resistentes ou intolerantes à aspirina ou irresponsivos à terapia com clopidogrel.

7. REFERÊNCIAS

1. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol*. 2011; 7(6):330-9.
2. Negrini S, Pappalardo F, Murdaca G, Indiveri F, Puppo F. The antiphospholipid syndrome: from pathophysiology to treatment. *Clin Exp Med*. 2016; 17:257–267.
3. Linnemann B. Antiphospholipid syndrome - an update. *Vasa*. 2018; 47(6):451-464.
4. Durcan L, Petri M. Epidemiology of the Antiphospholipid Syndrome. In *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases*. Elsevier Ltd. 2017.
5. Duarte-García A, Pham MM, Crowson CS, Amin S, Moder KG, Pruthi RK, Warrington KJ, Matteson EL. The Epidemiology of Antiphospholipid Syndrome: A Population-Based Study. *Arthritis Rheumatol*. 2019; 71:1545-1552.
6. Cervera R, Serrano R, Pons-Estel GJ, Ceberio-Hualde L, Shoenfeld Y, de Ramon E, et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis*. 2015; 74(6):1011–8.
7. Knight JS, Branch DW, Ortel TL. Antiphospholipid syndrome: advances in diagnosis, pathogenesis, and management. *BMJ*. 2023.
8. Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Thromb Res*. 2017; 151(1):43–7.
9. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum*. 1999; 42(7):1309-1311.
10. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RHW, de Groot PG, Koike T, Meroni PL, ReberG, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. 2006; 4: 295–306.
11. Barbhaiya M, Zuily S, Naden R, Hendry A, Manneville F, Amigo MC, Amoura Z, Andrade D, Andreoli L, Artim-Esen B, Atsumi T, Avcin T, Belmont HM, Bertolaccini ML, Branch DW, Carvalheiras G, Casini A, Cervera R, Cohen H, Costedoat-Chalumeau N, Crowther M, de Jesus G, Delluc A, Desai S, De Sancho M, Devreese KM, Diz-Kucukkaya R, Duarte-Garcia A, Frances C, Garcia D, Gris JC, Jordan N, Leaf RK, Kello N, Knight JS, Laskin C, Lee AI, Legault K, Levine SR, Levy RA, Limper M, Lockshin MD, Mayer-Pickel K, Musial J, Meroni PL, Orsolini G, Ortel TL, Pengo V, Petri M, Pons-Estel G, Gomez-Puerta JA, Raimboug Q, Roubey R, Sanna G, Seshan SV, Sciascia S, Tektonidou MG, Tincani A, Wahl D, Willis R, Yelnik C, Zuily C, Guillemin F, Costenbader K, Erkan D; ACR/EULAR APS Classification Criteria Collaborators. The 2023 ACR/EULAR Antiphospholipid Syndrome Classification Criteria. *Arthritis Rheumatol*. 2023; 75(10):1687-1702.
12. Unlu O, Domingues V, De Jesús GR, Zuily S, Espinosa G, Cervera R, Levy RA, Wahl D, Erkan D, Lockshin MD. Definition and Epidemiology of Antiphospholipid Syndrome. In: Erkan D, Lockshin MD (eds.) *Antiphospholipid Syndrome: Current*

- Research Highlights and Clinical Insights. Springer, 2017; Cham, Switzerland: 15–27.
13. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, Jacobsen S, Lakos G, Tincani A, Kontopoulou-Griva I, Galeazzi M, Meroni PL, Derksen RHW, de Groot PG, Gromnica-Ihle E, Baleva M, Mosca M, Bombardieri S, Houssiau F, Gris JC, Quéré I, Hachulla E, Vasconcelos C, Roch B, Fernández-Nebro A, Boffa MC, Hughes GRV, Ingelmo M. Antiphospholipid syndrome: Clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis & Rheumatism*. 2002; 46:1019-1027.
 14. Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*. 2013; 368(11):1033-1044.
 15. Hollerbach A, Müller-Calleja N, Ritter S, Häuser F, Canisius A, Orning C, Jurk K, Lackner KJ. Platelet Activation by Antiphospholipid Antibodies Depends on Epitope Specificity and is Prevented by mTOR Inhibitors. *Thromb Haemost*. 2019; 119(7):1147-1153.
 16. Allen KL, Fonseca FV, Betapudi V, Willard B, Zhang J, McCrae KR. A novel pathway for human endothelial cell activation by antiphospholipid/anti- β 2 glycoprotein I antibodies. *Blood*. 2012; 119:884-93.
 17. De Groot PG, de Laat B, Rand J, Vlachoyiannopoulos PG, El-Assaad F, Krilis SA, Giannakopoulos B. Natural proteins involved in antiphospholipid syndrome. In: Erkan D, Lockshin MD (eds.) *Antiphospholipid Syndrome: Current Research Highlights and Clinical Insights*. Springer, 2017; Cham, Switzerland: 15–27.
 18. Ramesh S, Morrell CN, Tarango C, Thomas GD, Yuhanna IS, Girardi G, et al. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via beta2GPI and apoER2. *J Clin Invest*. 2011; 121:120–131.
 19. Sacharidou A, Chambliss KL, Ulrich V, Salmon JE, Shen YM, Herz J, Hui DY, Terada LS, Shaul PW, Mineo C. Antiphospholipid antibodies induce thrombosis by PP2A activation via apoER2-Dab2-SHC1 complex formation in endothelium. *Blood*. 2018; 131(19):2097-2110.
 20. Vega-Ostertag M, Casper K, Swerlick R, Ferrara D, Harris EN, Pierangeli SS. Involvement of p38 MAPK in the upregulation of tissue factor on endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum*. 2005; 52:1545–1554.
 21. Pierangeli SS, Vega-Ostertag M, Harris EN. Intracellular signaling triggered by antiphospholipid antibodies in platelets and endothelial cells: a pathway to targeted therapies. *Thromb Res*. 2004; 114:467–76.
 22. Tektonidou MG. Cardiovascular disease risk in antiphospholipid syndrome: Thrombo-inflammation and atherothrombosis. *J Autoimmun*. 2022.
 23. Lopez-Pedrera C, Barbarroja N, Patiño-Trives AM, Collantes E, Aguirre MA, Perez-Sanchez C. New Biomarkers for Atherothrombosis in Antiphospholipid Syndrome: Genomics and Epigenetics Approaches. *Front Immunol*. 2019; 10:764.
 24. Vlachoyiannopoulos PG, Routsias JG. A novel mechanism of thrombosis in antiphospholipid antibody syndrome. *Journal of Autoimmunity* 2010; 35:248-55.

25. Zhang W, Gao F, Lu D, Sun N, Yin X, Jin M, Liu Y. Anti- β 2 glycoprotein I antibodies in complex with β 2 glycoprotein I induce platelet activation via two receptors: apolipoprotein E receptor 2 and glycoprotein I b alpha. *Front Med.* 2016; 10:76–84.
26. Lutters BC, Derksen RH, Tekelenburg WL, Lenting PJ, Arnout J, de Groot PG. Dimers of β 2-glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and the apolipoprotein E receptor 2. *J Biol Chem.* 2003; 278:33831–8.
27. Funke A, Danowski A, Andrade DCO, Rego J, Levy RA. A Importância de reconhecer a Síndrome Antifosfolípide na Medicina Vascular. Paraná: Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2017; 16(2):140-149.
28. Ruiz-Irastorza G, Cuadrado M, Ruiz-Arruza I, Brey R, Crowther M, Derksen R, et al. Evidence-based recommendations for the prevention and long-term management of thrombosis in antiphospholipid antibody-positive patients: report of a task force at the 13th international congress on antiphospholipid antibodies. *Lupus.* 2011; 20:206–18.
29. Crowther MA, Ginsberg JS, Julian J, et al. A comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid antibody syndrome. *N Engl J Med.* 2003; 349(12):1133-1138.
30. Tektonidou MG, Andreoli L, Limper M, Amoura Z, Cervera R, Costedoat-Chalumeau N, Cuadrado MJ, Dörner T, Ferrer-Oliveras R, Hambly K, Khamashta MA, King J, Marchiori F, Meroni PL, Mosca M, Pengo V, Raio L, Ruiz-Irastorza G, Shoenfeld Y, Stojanovich L, Svenungsson E, Wahl D, Tincani A, Ward MM. EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Ann Rheum Dis.* 2019; 78(10):1296-1304.
31. Ambati A, Knight JS, Zuo Y. Antiphospholipid syndrome management: a 2023 update and practical algorithm-based approach. *Curr Opin Rheumatol*; 2023.
32. Pastori D, Menichelli D, Cammisotto V, Pignatelli P. Use of Direct Oral Anticoagulants in Patients With Antiphospholipid Syndrome: A Systematic Review and Comparison of the International Guidelines. *Front Cardiovasc Med.* 2021; 8:715878.
33. Baroni G, Banzato A, Bison E, Denas G, Zoppellaro G, Pengo V. The role of platelets in antiphospholipid syndrome. *Platelets.* 2017; 28(08):762–766.
34. Gremmel T, Frelinger AL 3rd, Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost.* 2016; Apr;42(3):191-204.
35. Blockmans D, Deckmyn H, Vermynen J. Platelet activation. *Blood Rev.* 1995; Sep;9(3):143-56.
36. Castro HC, Ferreira BLA, Nagashima T, Schueler A, Rueff C, Camisasca D, Moreira G, Scovino G, Borges L, Leal M, Filgueira M, Paschoal P, Bernardo V, Bourguinhon S, Rodrigues CR, Santos DO. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. *J Bras Patol Med Lab.* 2006; 42:321–332.
37. Capodanno D, Bhatt DL, Eikelboom JW, Fox KAA, Geisler T, Michael Gibson C, Gonzalez-Juanatey JR, James S, Lopes RD, Mehran R, Montalescot G, Patel M, Steg PG, Storey RF, Vranckx P, Weitz JI, Welsh R, Zeymer U, Angiolillo DJ. Dual-

- pathway inhibition for secondary and tertiary antithrombotic prevention in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2020; Apr;17(4):242-257.
38. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood reviews.* 2011; 25:155-167.
 39. Oury C, Kuijpers MJ, Toth-Zsomboki E, Bonnefoy A, Danloy S, Vreys I, et al. Overexpression of the platelet P2X1 ion channel in transgenic mice generates a novel prothrombotic phenotype. *Blood;* 2003.
 40. Kannan M, Ahmad F, Saxena R. Platelet activation markers in evaluation of thrombotic risk factors in various clinical settings. *Blood reviews.* 2019; 37.
 41. Procter NEK, Hurst NL, Nooney VB. New Developments in Platelet Cyclic Nucleotide Signalling: Therapeutic Implications. *Cardiovasc Drugs Ther* 30, 505–513; 2016.
 42. Horstrup K, Jablonka B, Hönig-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.
 43. Snir O, Wilsgård L, Latysheva N, Wahlund CJE, Braekkan SK, Hindberg K, Hansen JB. Plasma levels of platelet-derived microvesicles are associated with risk of future venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2022; 20(4):899-908.
 44. Panova-Noeva M, Wagner B, Nagler M, Koeck T, Ten Cate V, Eggebrecht L, Prochaska JH, Meyer I, Gerdes C, Spronk HM, Lackner KJ, Ten Cate H, Leineweber K, Heitmeier S, Konstantinides S, Wild PS. Variation of platelet function in clinical phenotypes of acute venous thromboembolism - Results from the GMP-VTE project. *J Thromb Haemost.* 2022; Mar;20(3):705-715.
 45. Soodi D, VanWormer JJ, Rezkalla SH. Aspirin in Primary Prevention of Cardiovascular Events. *Clin Med Res.* 2020; 18(2-3):89-94.
 46. Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res.* 2003; Jun 15;110(5-6):255-8.
 47. Yeung J, Li W, Holinstat M. Platelet Signaling and Disease: Targeted Therapy for Thrombosis and Other Related Diseases. *Pharmacol Rev.* 2018; 70(3):526-548.
 48. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, Horrow J, Husted S, James S, Katus H, Mahaffey KW, Scirica BM, Skene A, Steg PG, Storey RF, Harrington RA; PLATO Investigators; Freij A, Thorsén M. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2009; Sep 10;361(11):1045-57.
 49. Jeong YH, Hwang JY, Kim IS, Park Y, Hwang SJ, Lee SW, Kwak CH, Park SW. Adding cilostazol to dual antiplatelet therapy achieves greater platelet inhibition than high maintenance dose clopidogrel in patients with acute myocardial infarction: Results of the adjunctive cilostazol versus high maintenance dose clopidogrel in patients with AMI (ACCEL-AMI) study. *Circ Cardiovasc Interv.* 2010; Feb 1;3(1):17-26.
 50. Suh JW, Lee SP, Park KW, Lee HY, Kang HJ, Koo BK, Cho YS, Youn TJ, Chae IH, Choi DJ, Rha SW, Bae JH, Kwon TG, Bae JW, Cho MC, Kim HS. Multicenter randomized trial evaluating the efficacy of cilostazol on ischemic vascular

complications after drug-eluting stent implantation for coronary heart disease: results of the CILON-T (influence of Cilostazol-based triple antiplatelet therapy ON ischemic complication after drug-eluting stenT implantation) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2011; Jan 18;57(3):280-9.

51. Uchiyama S. [Results of the Cilostazol Stroke Prevention Study II (CSPS II): a randomized controlled trial for the comparison of cilostazol and aspirin in stroke patients]. *Rinsho Shinkeigaku*. 2010; Nov;50(11):832-4.
52. Balinski AM, Preuss CV. Cilostazol. [Updated 2022 Sep 21]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.

ANEXO 1 – Parecer consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização da ativação da via do interferon 1, através da resposta imune inata de granulócitos e células dendríticas plasmocitóides, na Síndrome Antifosfolípide.

Pesquisador: Fernanda Loureiro de Andrade Orsi

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 59362216.7.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.247.619

Apresentação do Projeto:

Trata-se da apresentação de uma Emenda ao projeto CAAE 59362216.7.0000.5404

Objetivo da Pesquisa:

Apresentar uma Emenda

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios não foram alterados em relação ao projeto original

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Data da aprovação do projeto por este CEP: 05/12/2016 (parecer número 1.850.334, em 'PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_1850334.pdf', de 05/12/2016 16:04:49).

Através da Emenda apresentada, o pesquisador solicita (em 'Justificativa da Emenda') que fosse "feita a inclusão da aluna Ana Paula Rosa dos Santos como pesquisadora deste projeto, pois ela é que está entrevistando os pacientes, executando as técnicas propostas e escrevendo o projeto". E ainda, "Venho também solicitar a exclusão dos nomes dos antigos pesquisadores (Dra. Ana Leda Longhini e Ingridi Rafaela de Brito), pois elas não fazem mais parte do projeto.

Além disso, nos arquivos 'Projeto_Detalhado_atualizado_CAAE59362216700005404.pdf' (de

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



Continuação do Parecer: 4.247.619

24/08/2020 11:19:25) e 'Carta_Resposta_CAAE59362216700005404.pdf' (de 24/08/2020 11:07:43) foi apresentado que:

- Houve expansão do universo amostral (originalmente, '100 voluntários'; nessa emenda '170 voluntários')
- Houve uma expansão nos grupos a serem estudados (originalmente 2 grupos: "Casos com SAF primária (50)" e "Controles saudáveis" (50) ; nessa emenda, 4 grupos: "Casos com SAF primária" (50), "Casos com SAF secundária" (50), "Controles saudáveis" (50) e "Indivíduos com anticorpo antifosfolípide" (20)).

Tais modificações se encontram devidamente documentadas (arquivo 'Projeto_Detalhado_atualizado_CAAE59362216700005404.pdf', de 24/08/2020 11:19:25) e contempladas no TCLE apresentado (arquivo 'TCLE_CAAE59362216700005404.pdf', de 24/08/2020 11:09:55).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para avaliação desta notificação foi analisado a Emenda anexado no documento intitulado 'PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1401719_E1.pdf', de 26/08/2020 12:46:34.

Relatório enviado adequadamente, em formulário próprio deste CEP

Recomendações:

A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep), do Conselho Nacional de Saúde (CNS) orienta a adoção das diretrizes do Ministério da Saúde (MS) decorrentes da pandemia causada pelo Coronavírus SARS-CoV-2 (Covid-19), com o objetivo de minimizar os potenciais riscos à saúde e a integridade dos participantes de pesquisas e pesquisadores.

De acordo com carta circular da CONEP intitulada "ORIENTAÇÕES PARA CONDUÇÃO DE PESQUISAS E ATIVIDADE DOS CEP DURANTE A PANDEMIA PROVOCADA PELO CORONAVÍRUS SARS-COV-2 (COVID-19)" publicada em 09/05/2020, referente ao item II. "Orientações para Pesquisadores":

- Aconselha-se a adoção de medidas para a prevenção e gerenciamento de todas as atividades de pesquisa, garantindo-se as ações primordiais à saúde, minimizando prejuízos e potenciais riscos, além de prover cuidado e preservar a integridade e assistência dos participantes e da equipe de pesquisa.
- Em observância às dificuldades operacionais decorrentes de todas as medidas impostas pela pandemia do SARS-CoV-2 (COVID- 19), é necessário zelar pelo melhor interesse do participante da pesquisa, mantendo-o informado sobre as modificações do protocolo de pesquisa que possam

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



Continuação do Parecer: 4.247.619

afetá-lo, principalmente se houver ajuste na condução do estudo, cronograma ou plano de trabalho.

- Caso sejam necessários a suspensão, interrupção ou o cancelamento da pesquisa, em decorrência dos riscos imprevisíveis aos participantes da pesquisa, por causas diretas ou indiretas, caberá aos investigadores a submissão de notificação para apreciação do Sistema CEP/Conep.
- Nos casos de ensaios clínicos, é permitida, excepcionalmente, a tramitação de emendas concomitantes à implementação de modificações/alterações no protocolo de pesquisa, visando à segurança do participante da pesquisa, assim como dos demais envolvidos no contexto da pesquisa, evitando-se, ainda, quando aplicável, a interrupção no tratamento dos participantes da pesquisa. Eventualmente, na necessidade de modificar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o pesquisador deverá proceder com o novo consentimento, o mais breve possível.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

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



Continuação do Parecer: 4.247.819

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

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

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

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1401719_E1.pdf	26/08/2020 12:46:34		Aceito
Outros	Carta_resposta_assinada.docx	26/08/2020 12:46:11	Femanda Loureiro de Andrade Orsi	Aceito
Outros	Carta_Resposta.docx	26/08/2020 12:45:46	Femanda Loureiro de Andrade Orsi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_atualizado_CAAE59362216700005404.pdf	24/08/2020 11:19:25	Femanda Loureiro de Andrade Orsi	Aceito
Outros	AtestadoMatricula.pdf	24/08/2020 11:16:11	Femanda Loureiro de Andrade Orsi	Aceito

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



Continuação do Parecer: 4.247.619

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CAAE59362216700005404.pdf	24/08/2020 11:09:55	Femanda Loureiro de Andrade Orsi	Aceito
Outros	Carta_Resposta_CAAE59362216700005404.pdf	24/08/2020 11:07:43	Femanda Loureiro de Andrade Orsi	Aceito
Declaração de concordância	Oficio_045_2019_alteracao_pesquisador PB Ingridi Rafaela de Brito.pdf	02/08/2019 16:07:20	Rodrigo Caetano Alves	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	cartatransferencia.pdf	30/07/2019 14:45:27	Ingridi Rafaela de Brito	Aceito
Outros	POP_biorepositorio.pdf	24/11/2016 14:58:47	Ingridi Rafaela de Brito	Aceito
Outros	carta_resposta_parecer.pdf	24/11/2016 14:37:23	Ingridi Rafaela de Brito	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Temo_de_consentimento_livre_e_esclarecido.pdf	24/11/2016 14:32:36	Ingridi Rafaela de Brito	Aceito
Outros	Comprovante_de_vinculo.pdf	15/08/2016 11:34:54	Ingridi Rafaela de Brito	Aceito
Outros	Manual_tecnico_biorepositorio.pdf	15/08/2016 11:24:53	Ingridi Rafaela de Brito	Aceito
Declaração do Patrocinador	Declaracao_do_patrocinador.pdf	04/05/2016 10:35:54	Ingridi Rafaela de Brito	Aceito
Folha de Rosto	20160503152915708.pdf	04/05/2016 10:24:19	Ingridi Rafaela de Brito	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 31 de Agosto de 2020

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador(a))

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização farmacológica dos nucleosídeos e nucleotídeos oriundos de guanina e das gliflozinas em plaquetas humanas isoladas.

Pesquisador: Fabíola Taufic Mônica Iglesias

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 72739517.9.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.531.184

Apresentação do Projeto:

Justificativa da Emenda: Nas análises de agregação plaquetária observamos que há uma variabilidade na quantidade de plaquetas entre os doadores, fato que muitas vezes ocasiona uma sobra de plasma rico em plaquetas (PRP) e plaqueta lavada (PL). Neste sentido, viemos por meio deste fazer a solicitação para a utilização do material que sobrar e que seria descartado para testar uma nova classe de medicamentos utilizada para o tratamento do diabetes tipo II, denominada de gliflozinas (canagliflozina, empagliflozina e dapagliflozina). O racional de se testar esta classe de medicamentos é que estudos clínicos recentes mostraram melhoras nos desfechos cardiovasculares em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva e diabetes tipo II como por exemplo, menor número de hospitalizações por causas cardiovasculares, menor incidência de acidente vascular cerebral e doença arterial coronariana nos voluntários que receberam a empagliflozina ou canagliflozina. Os procedimentos de coleta e processamento das amostras com o plasma dos doadores serão os mesmo do projeto inicial aprovado. A solicitação está pautada apenas no uso do material biológico que seria descartado para testar a eficácia in vitro das gliflozinas. Até o momento não existe nenhum trabalho na literatura que avaliou a eficácia in vitro das gliflozinas na agregação plaquetária. Ademais, solicitamos também a mudança do título do projeto com a inserção das Gliflozinas para "CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS NUCLEOTÍDEOS ORIUNDOS DE GUANINA E DAS GLIFLOZINAS EM PLAQUETAS HUMANAS ISOLADAS". Sendo assim, venho por meio deste incluir emenda ao projeto acima solicitando autorização para

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



Continuação do Parecer: 2.531.184

uso do PRP e PL que sobrarão para testar in vitro as gliflozinas denominadas como canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina. Estamos enviando o projeto contendo informações adicionais sobre as gliflozinas e um novo TCLE contendo as informações referentes às gliflozinas. Todas as novas informações adicionadas ao projeto e ao TCLE anteriores estão destacadas em amarelo. Os novos documentos denominam-se "Projeto_final_emenda_CHL" e "TCLE_final_emenda".

Objetivo da Pesquisa:

É introduzido outro objetivo principal:

" testar uma nova classe de medicamentos utilizada para o tratamento do diabetes tipo II, denominada de gliflozinas"

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nada é alterado em relação ao projeto original

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda solicita :

1- alteração do título do projeto.

DE

"Caracterização farmacológica dos nucleosídeos e nucleotídeos oriundos de guanina em plaquetas humanas isoladas isoladas."

Para "CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS NUCLEOTÍDEOS ORIUNDOS DE GUANINA E DAS GLIFLOZINAS EM PLAQUETAS HUMANAS ISOLADAS"

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta adequadamente justificativa da emenda, destaque no projeto final e no TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em consideração as pendências do parecer anterior (Número do Parecer: 2.496.263) de 15 de fevereiro de 2018:

- declara que não haverá inclusão de novos participantes.
- adequa cartaz

- Mantém título do projeto com repetição da palavra isoladas: "Título da Pesquisa: Caracterização

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



Continuação do Parecer: 2.531.184

farmacológica dos nucleosídeos e nucleotídeos oriundos de guanina e das gliflozinas em plaquetas humanas isoladas isoladas." no documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1046847_E1.pdf. Entretanto nega em carta resposta resposta_emenda.pdf.

- Refere em carta resposta resposta_emenda.pdf que serão incluídos apenas participantes saudáveis. Entretanto a pendência sobre DM foi devido a justificativa da emenda de " (...) Neste sentido, viemos por meio deste fazer a solicitação para a utilização do material que sobrar e que seria descartado para testar uma nova classe de medicamentos utilizada para o tratamento do diabetes tipo II, denominada de gliflozinas".

- AINDA, ORIENTAMOS QUE os critérios de exclusão são condições que impeçam os voluntários de participarem da pesquisa, ainda que preencham todos os critérios de inclusão. Não se aplica aos sujeitos que não queiram participar da pesquisa ou que não satisfaçam os critérios de inclusão.

Conclusão: projeto aprovado após esclarecimento das pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

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

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

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



Continuação do Parecer: 2.531.184

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

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

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1046847_E1.pdf	21/02/2018 10:31:47		Aceito
Outros	Cartaz.pptx	21/02/2018 10:24:04	Fabiola Taufic Mônica Iglesias	Aceito
Outros	resposta_emenda.pdf	21/02/2018 10:23:35	Fabiola Taufic Mônica Iglesias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_final_emenda_sem_rasura.docx	21/02/2018 10:20:09	Fabiola Taufic Mônica Iglesias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_final_emenda_rasurado.docx	21/02/2018 10:19:31	Fabiola Taufic Mônica Iglesias	Aceito
Outros	justificativa_emenda.pdf	18/12/2017 11:07:04	Fabiola Taufic Mônica Iglesias	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_final_emenda_CHL.pdf	18/12/2017 11:05:13	Fabiola Taufic Mônica Iglesias	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	09/11/2017 09:36:19	Fabiola Taufic Mônica Iglesias	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_final_1.pdf	09/11/2017 09:35:14	Fabiola Taufic Mônica Iglesias	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_final_grifado.pdf	09/11/2017 09:34:43	Fabiola Taufic Mônica Iglesias	Aceito

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



Continuação do Parecer: 2.531.184

Investigador	Projeto_final_grifado.pdf	09/11/2017 09:34:43	Fabiola Taufic Mônica Iglesias	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	04/08/2017 15:31:05	Fabiola Taufic Mônica Iglesias	Aceito
Outros	vinculo_empregaticio_UNICAMP.jpg	04/08/2017 12:34:06	Fabiola Taufic Mônica Iglesias	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 07 de Março de 2018

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
(Coordenador)

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

ANEXO 2 – Permissão de uso dos direitos autorais



ELSEVIER

[About Elsevier](#)

[Products & Solutions](#)

[Services](#)

[Shop & Discover](#)

[Permission guidelines](#)

[ScienceDirect content](#)

[ClinicalKey content](#)

[Tutorial videos](#)

[Help and support](#)

Is Elsevier an STM signatory publisher? ▼

Do I need to request permission to re-use work from another STM publisher? ▼

Do I need to request permission to text mine Elsevier content? ▼

Can I include/use my article in my thesis/dissertation? ▲

Yes. Authors can include their articles in full or in part in a thesis or dissertation for non-commercial purposes.

For any further clarifications, you can submit your query via our [online form](#) ↗

Which uses of a work does Elsevier view as a form of 'prior publication'? ▼

How do I obtain permission to use Elsevier Journal material such as figures, tables, or text excerpts, if the request falls within the STM permissions guidelines? ▼

How do I obtain permission to use Elsevier Journal material such as figures, tables, or text excerpts, if the amount of material I wish to use does not fall within the free limits set out in the STM permissions guidelines? ▼

How do I obtain permission to use Elsevier Book material such as figures, tables, or text excerpts? ▼

How do I obtain permission to use Elsevier material that is NOT on ScienceDirect or Clinical Key? ▼