



CAMILA BITENCOURT MENDES SILVERIO

**EFEITO DO BAY 60-2770, ATIVADOR DA GUANILIL CICLASE
SOLÚVEL INDEPENDENTE DE ÓXIDO NÍTRICO, NA FUNÇÃO
PLAQUETÁRIA HUMANA**

CAMPINAS
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

CAMILA BITENCOURT MENDES SILVERIO

EFEITO DO BAY 60-2770, ATIVADOR DA GUANILIL CICLASE SOLÚVEL
INDEPENDENTE DE ÓXIDO NÍTRICO, NA FUNÇÃO PLAQUETÁRIA HUMANA

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. EDSON ANTUNES

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestra em
Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
CAMILA BITENCOURT MENDES SILVERIO, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. EDSON ANTUNES.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Si39e Silvério, Camila Bitencourt Mendes, 1984-
 Efeito do BAY 60-2770, ativador da guanilil ciclase
 solúvel independente de óxido nítrico, na função
 plaquetária humana / Camila Bitencourt Mendes Silvério.
 -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

 Orientador : Edson Antunes.
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Plaquetas. 2. Óxido nítrico. 3. Guanilato ciclase. I.
 Antunes, Edson, 1960-. II. Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effect of BAY 60-2770, activator independent of nitric oxide of soluble guanylyl cyclase in human platelet function.

Palavras-chave em inglês:

Platelets

Nitric oxide

Guanylate cyclase

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestra em Farmacologia

Banca examinadora:

Edson Antunes [Orientador]

Alessandra Gambero

Gerson Jhonatan Rodrigues

Data da defesa: 29-01-2013

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

CAMILA BITENCOURT MENDES SILVERIO

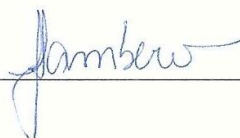
ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON ANTUNES

MEMBROS:

1. PROF. DR. EDSON ANTUNES



2. PROFA. DRA. ALESSANDRA GAMBERO



3. PROF. DR. GERSON JHONATAN RODRIGUES



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

Data: 29 de janeiro de 2013

Dedicatória

Àqueles com laços de sangue

e os que no caminho eu escolhi também chamar de

Família.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, meu Pai e salvador. Obrigada pela vida e pela graça de vivê-la inteiramente.

Ao Prof. Dr. Edson, pela oportunidade e confiança, exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa. Minha admiração, respeito e gratidão.

Ao Luciano, meu marido, pelo amor, cuidado e apoio.

A minha mãe, exemplo de amor, força e fé.

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

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

Aos meus queridos amigos de Farmacologia da UNICAMP, “celulares”, “edemasiadas”, “cascateiros”, e claro, “as do laboratório mais rico do mundo”, pela amizade, companheirismo e boa convivência. Muito obrigada a todos.

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

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

Sumário

Lista de Materiais.....	xi
Lista de Abreviaturas	xii
Lista de Figuras.....	xiv
Resumo	xvi
Abstract	xviii
1. Introdução	20
1.1. Plaquetas	20
1.2. Agonistas plaquetários	22
1.3. Ativação plaquetária	23
1.4. Mecanismos de mobilização citosólica de Ca^{2+} em plaquetas	25
1.5. Mecanismos de inibição da ativação plaquetária	27
1.6. Óxido nítrico.....	28
1.7. Guanilil ciclase solúvel	29
1.8. Estimuladores e ativadores da GCs	30
1.9. BAY 60-2770	32
2. Objetivo	34
2.1. Os objetivos específicos	34
3. Materiais e Métodos.....	35
3.1. Obtenção de plaquetas lavadas	35
3.2. Protocolo experimental	36
3.3. Agregação plaquetária.....	36

3.4.	Adesão plaquetária.....	37
3.5.	Dosagem dos nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc)	38
3.6.	Ensaio de mobilização citosólica de cálcio em plaquetas	39
3.7.	Mudança da conformação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa)	41
3.8.	Western blotting	42
3.9.	Análise estatística	43
4.	Resultados.....	44
4.1.	Agregação de plaquetas lavadas humanas	44
4.1.1.	Efeito inibitório do BAY 60-2770 sobre a agregação de plaquetas induzida por colágeno.....	44
4.1.2.	Efeito inibitório do BAY 60-2770 sobre a agregação de plaquetas induzida por trombina.....	45
4.1.3.	Efeito inibitório do SNP sobre a agregação de plaquetas induzida por colágeno ou trombina.....	47
4.1.4.	Efeito inibitório do 8-Br-GMPc sobre a agregação de plaquetas induzida por colágeno ou trombina	49
4.2.	Adesão de plaquetas lavadas humanas	51
4.2.1.	Efeito inibitório do BAY 60-2770 e SNP sobre a adesão de plaquetas humanas ao fibrinogênio imobilizado.....	51
4.3.	Análise dos níveis de nucleotídeos cíclicos em plaquetas lavadas humanas	53
4.3.1.	GMPc.....	53
4.3.2.	AMPc	55
4.4.	Mobilização citosólica de cálcio plaquetário	56

4.4.1. Mobilização de cálcio intracelular em plaquetas estimuladas por colágeno	57
4.4.2. Mobilização intracelular de cálcio em plaquetas estimuladas por trombina	59
4.4.3. Mobilização de cálcio em plaquetas incubadas com 8-Br-GMPc.....	61
4.5. Análise da conformação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ através da ligação com PAC-1	62
4.6. Expressão protéica das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs em plaquetas lavadas	
humanas.....	65
5. Discussão	67
6. Conclusão	74
7. Referências Bibliográficas.....	75
8. Anexos.....	88

Lista de Materiais

SUBSTÂNCIA

ADP

BAY 60-2770

BSA

Colágeno

DMSO

EGTA

Fibrinogênio (fração I)

FluoFort

IBMX

Iloprost

Kit GMPc/AMPC

ODQ

PAC-1

***p*-nitrophenil phosphate**

SNP

SQ 22536

Triton-X-100

Trombina (plasma humano)

PROCEDÊNCIA

Sigma (EUA)

Bayer AG (Alemanha)

Sigma (EUA)

Chrono-log (EUA)

Sigma (EUA)

Sigma (EUA)

Sigma (EUA)

Enzo Life Sciences International (EUA)

Sigma (EUA)

Schering (Alemanha)

Cayman (EUA)

Sigma (EUA)

Becton Dickinson (EUA)

Sigma (EUA)

Sigma (EUA)

Sigma (EUA)

Sigma (EUA)

Sigma (EUA)

Lista de Abreviaturas

8-Br-GMPc	8-bromo- monofosfato cíclico de guanosina
ADP	Adenosina difosfato
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Adenosina trifosfato
Ca²⁺	Cálcio
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetil sulfóxido
E.P.M	Erro padrão da média
EDTA	Ácido tetracético etilenodiamina
EGTA	Ácido tetracético etileno glicol
GCs	Guanilil Ciclase Solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPIIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
GTP	Guanosina trifosfato
IP₃	Trifosfato de inositol
min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
Nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
ODQ	1-H-[1,2,4] oxidiazolo quinoxalin-1-one
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAR	Receptor ativado por protease
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PECAM-1	<i>Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PF-4	Fator plaquetário 4

PIP₂	fosfatidil-inositol-2-fosfato
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
SNP	Nitroprussiato de sódio
TXA₂	Tromboxano A ₂
U	Unidade
VASP	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
vWF	Fator de von Willebrand
β-TG	Tromboglobulina beta
μg	Micrograma
μL	Microlitro (s)
μM	Micromolar

Lista de Figuras

Figura 1	Sinalização do cálcio em plaquetas.....	23
Figura 2	Estrutura química dos ativadores da GCs.....	29
Figura 3	Efeito inibitório do BAY 60-2770 na agregação de plaquetas lavadas humanas induzida pelo colágeno, na presença ou ausência do inibidor da GCs, ODQ.....	45
Figura 4	Efeito inibitório do BAY 60-2770 na agregação de plaquetas lavadas humanas induzida por trombina, na presença ou ausência do inibidor da GCs, ODQ.....	46
Figura 5	Traçados originais referentes à agregação de plaquetas lavadas humanas estimuladas com colágeno ou trombina.....	47
Figura 6	Efeito inibitório do nitroprussiato de sódio (SNP) na agregação de plaquetas lavadas humanas induzida por colágeno, na presença ou ausência do inibidor da GCs, ODQ.....	48
Figura 7	Efeito inibitório do nitroprussiato de sódio (SNP) na agregação de plaquetas lavadas humanas induzida por trombina, na presença ou ausência do inibidor da GCs, ODQ.....	49
Figura 8	Efeito inibitório do 8-Br-GMPc na agregação de plaquetas lavadas humanas induzida por colágeno ou trombina, na presença ou ausência do inibidor da GCs, ODQ.....	50

Figura 9	Efeito inibitório do BAY 60-2770 e do nitroprussiato de sódio (SNP) sobre a adesão plaquetária em placas recobertas com fibrinogênio.....	52
Figura 10	Efeito do BAY 60-2770 nos níveis de GMPc em plaquetas lavadas humanas estimuladas com colágeno e trombina.....	54
Figura 11	Efeito do BAY 60-2770 nos níveis de AMPc em plaquetas lavadas humanas estimuladas com colágeno ou trombina.....	56
Figura 12	Efeito inibitório do BAY 60-2770 e nitroprussiato de sódio (SNP) sobre a mobilização de Ca^{2+} em plaquetas lavadas humanas estimuladas com colágeno.....	58
Figura 13	Efeito inibitório do BAY 60-2770 e nitroprussiato de sódio (SNP) sobre a mobilização de Ca^{2+} em plaquetas lavadas humanas estimuladas com trombina.....	60
Figura 14	Efeito inibitório do 8-Br-GMPc sobre a mobilização de Ca^{2+} em plaquetas lavadas humanas estimuladas com colágeno ou trombina.....	62
Figura 15	Efeito inibitório do BAY 60-2770 sobre a fluorescência média da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ de plaquetas lavadas estimuladas com colágeno.....	63
Figura 16	Efeito inibitório do BAY 60-2770 sobre a fluorescência média da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ de plaquetas lavadas estimuladas com trombina.....	64
Figura 17	Efeito protetor do BAY 60-2770 sobre a degradação das subunidades da GCs pelo ODQ.....	66

O BAY 60-2770 constitui-se um novo ativador da guanilil ciclase solúvel (GCs) independente de óxido nítrico (NO). Há relatos de que ativadores da GCs independente de NO podem reativar esta enzima, mesmo em seu estado heme-oxidada, condição encontrada em doenças vasculares. Neste trabalho, temos por hipótese que a oxidação do grupamento heme da GCs pelo ODQ leva à potencialização dos efeitos antiplaquetários *in vitro* do BAY 60-2770.

Foram utilizadas plaquetas humanas purificadas de voluntários sadios. Realizamos ensaios de agregação e de adesão plaquetária, bem como análise da ativação da integrina plaquetária, $\alpha_{IIb}\beta_3$, por citometria de fluxo. Realizamos Também ensaios de Western blotting para a quantificação protéica das subunidades α_1 e β_1 da GCs. Os níveis intracelulares de Ca^{2+} foram quantificados por fluorimetria, utilizando-se o fluoróforo FluoFort.

O BAY 60-2770 (0,001 - 10 μ M) produziu inibição significativa da agregação plaquetária induzida pelo colágeno (2 μ g/mL) ou trombina (0,1 U/mL), sendo este efeito marcadamente potencializado pelo inibidor da GCs, ODQ (10 μ M). Em placas recobertas pelo fibrinogênio, o BAY 60-2770 (0,1 - 10 μ M) inibiu significativamente a adesão plaquetária, sendo esta inibição também potencializada pelo ODQ (10 μ M). O BAY 60-2770 (0,01 - 10 μ M) aumentou os níveis de GMPc e reduziu a mobilização de Ca^{2+} , e ambos os efeitos foram potencializados pelo ODQ. O análogo permeável do GMPc, 8-Bromo-GMPc (8-Br-GMPc; 100 μ M), inibiu a agregação plaquetária e os níveis de Ca^{2+} de maneira ODQ-resistente. Os níveis de AMPc não foram alterados pelo BAY 60-2770. O colágeno (2 μ g/mL) e trombina (0,1 U/mL) ativaram a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Este efeito foi inibido pelo BAY 60-2770

(0,01 – 10 μ M), e potencializado pelo ODQ. Os efeitos antiplaquetários do nitroprussiato de sódio (SNP) foram totalmente revertidos pelo ODQ. O tratamento com ODQ (10 μ M) reduziu significativamente os níveis protéicos das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs, os quais foram prevenidos pelo tratamento com BAY 60-2770.

Os efeitos inibitórios do BAY 60-2770 sobre a agregação e adesão plaquetária, mobilização intracelular de Ca^{2+} e ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ foram todos potencializados em condições de heme-oxidação. O BAY 60-2770 impediu a diminuição dos níveis protéicos da GCs produzida por ODQ. Assim, o BAY 60-2770 pode ser de grande interesse terapêutico em doenças cardiovasculares associadas à complicações tromboembólicas.

Abstract

Nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase (sGC) activators reactivate the haem-oxidized enzyme in vascular diseases. This study was undertaken to investigate the anti-platelet mechanisms of the haem-independent sGC activator BAY 60-2770 in human washed platelets. The hypothesis that sGC oxidation potentiates the anti-platelet activities of BAY 60-2770 has been tested.

Human washed platelet aggregation and adhesion assays, as well as flow cytometry for $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin activation and Western blot for α_1 and β_1 sGC subunits were performed. Intracellular calcium levels were monitored in platelets loaded with a fluorogenic calcium-binding dye (FluoForte).

BAY 60-2770 (0.001–10 μ M) produced significant inhibition of collagen (2 μ g/ml)- and thrombin (0.1 U/ml)-induced platelet aggregation that was markedly potentiated by the sGC inhibitor ODQ (10 μ M). In fibrinogen-coated plates, BAY 60-2770 (0.1 - 10 μ M) significantly inhibited platelet adhesion, an effect potentiated by ODQ. BAY 60-2770 (0.01 – 10 μ M) increased the cGMP levels and reduced the intracellular Ca^{2+} levels, both of which were potentiated by ODQ. The cell-permeable cGMP analogue 8-Br-cGMP (100 μ M) inhibited platelet aggregation and Ca^{2+} levels in an ODQ-insensitive manner. The cAMP levels remained unchanged by BAY 60-2770. Collagen- and thrombin-induced $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation was markedly inhibited by BAY 60-2770 that was further inhibited by ODQ. The effects of sodium nitroprusside (3 μ M) were all prevented by ODQ. Incubation with ODQ (10 μ M) significantly reduced the protein levels of α_1 and β_1 sGC subunits, which were prevented by BAY 60-2770.

The inhibitory effects of BAY 60-2770 on aggregation, adhesion, intracellular Ca^{2+} levels and $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation are all potentiated in haem-oxidizing conditions. BAY 60-2770 prevents ODQ-induced decrease in sGC protein levels. BAY 60-2770 could be of therapeutic interest in cardiovascular diseases associated with thrombotic complications.

1. Introdução

1.1. Plaquetas

As plaquetas são pequenos fragmentos de células hematopoiéticas, oriundas de megacariócitos da medula. As plaquetas têm a forma de discos diminutos sendo consideradas corpúsculos celulares e não células propriamente ditas. Estes elementos estão presentes no sangue em concentração de $140-400 \times 10^6/\text{mL}$ e possuem meia-vida na circulação de 8 a 14 dias, quando então são retiradas do sangue, principalmente pelo baço e fígado (Hartwig e col., 1999; Varga-Szabo e col., 2009).

Embora as plaquetas sejam anucleadas, estes elementos possuem organelas comuns a outros tipos celulares como mitocôndrias, sistemas de Golgi, ribossomos e microtúbulos. A função primordial das plaquetas é manter a hemostasia, formando tampões hemostáticos que ocluem sítios danificados do sistema vascular (Acikel e col., 2010; Abdulla e col., 2011; Ashavaid e col., 2011).

Em condições basais, as plaquetas permanecem na forma “inativada”; entretanto, após a transecção de vasos sanguíneos, as plaquetas se tornam “ativas”, quando então são capazes de aderir ao tecido conectivo às margens da lesão. Depois de alguns minutos, forma-se um tampão hemostático plaquetário que oclui a lesão e detém a perda de sangue, restabelecendo a hemostasia (Oberfell e col., 2002; Adam, Guillin e col., 2003; Varga-Szabo e col., 2009).

As plaquetas possuem três tipos de grânulos, morfologicamente distintos, classificados como grânulos densos, alfa e lisossomos (Blockmans e col., 1995).

Pequenas moléculas não protéicas como serotonina, ATP, ADP, Ca^{2+} e pirofosfato ficam estocadas nos grânulos densos (Holmsen e col., 1979).

Os grânulos alfa possuem moléculas de adesão importantes para a interação plaqueta-plaqueta e plaqueta com outras células sanguíneas, como a glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa, integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e CD41/61), fator de von Willebrand (vWF), P-selectina (CD62P), fator plaquetário-4 (PF-4), beta-tromboglobulina (β -TG), trombospondina-1, o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), e fatores de coagulação, como o fibrinogênio, o fator V, fator VII e o plasminogênio (Rendu e col., 2001).

Nos grânulos lisossomais encontram-se algumas hidrolases ácidas como a β -glucuronidase e β -galactosidase, as quais são capazes de desfazer agregados plaquetários circulantes (Alberio e col., 1999; Adam, Verbeuren e col., 2003; Bergmeier e col., 2009).

A membrana plasmática das plaquetas expressa receptores que medeiam as interações adesivas. Estes receptores de adesão são estruturalmente diversos e compreendem a família das integrinas ($\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$), leucina (GPIb/IX), imunoglobulina (PECAM-1) e selectina (P-selectina) (Shattil e col., 1994; Bouchard e col., 1997).

As integrinas formam a maior família de receptores heterodiméricos $\alpha\beta$ transmembrânicos que regulam a adesão plaquetária (Clark e col., 1995).

A integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) é a mais detalhadamente estudada, representando cerca de 17% do total de proteínas da membrana plaquetária. A $\alpha_{IIb}\beta_3$ foi identificada como o principal receptor plaquetário para fibrinogênio. É um heterodímero dependente de Ca^{2+} que medeia a agregação, adesão firme e estabilização do trombo plaquetário (Calvete e col., 1999). A integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ é o receptor que medeia a adesão

plaquetária seletiva e irreversível ao fibrinogênio, sendo que esta ligação não requer necessariamente a ativação da plaqueta. Normalmente, o complexo $\alpha_{IIb}\beta_3$ está no estado de baixa afinidade, incapaz de se ligar a ligantes solúveis, mas pode se ligar ao fibrinogênio e ao vWF imobilizados (Savage e col., 1992).

Quando ativadas, as plaquetas secretam o conteúdo dos seus grânulos denso e α que facilitam sua interação com outras plaquetas, células endoteliais e leucócitos.

As plaquetas também sintetizam e liberam o tromboxano A_2 (TXA₂) e o fator de ativação plaquetária (PAF), dois mediadores conhecidos pela capacidade de liberarem o conteúdo granular para o meio externo, amplificando a ativação plaquetária (Blockmans e col., 1995).

1.2. Agonistas plaquetários

Várias são as substâncias capazes de se ligar às plaquetas e desencadear uma cascata de reações bioquímicas que culminam na ativação plaquetária, secreção granular e por fim agregados de plaquetas. Como exemplos destas substâncias temos a trombina, ADP, TXA₂, vWF e colágeno (O'brien e col., 2011).

A trombina é o agonista plaquetário mais potente, sendo capaz de ativar plaquetas em concentrações de nM. A ativação plaquetária induzida por trombina é mediada pela interação com a família de receptores acoplados à proteína G, denominadas PARs (receptor ativado por protease) (Gandhi e col., 2011).

São conhecidos quatro PARs: PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4, sendo que o PAR 1 e PAR 4 são expressos em plaquetas humanas. A trombina ativa PAR através da clivagem de um sítio específico do resíduo N-terminal, que expõe um novo domínio N-

terminal, capaz de se ligar e ativar o receptor anteriormente clivado, promovendo então a ativação da fosfolipase C (PLC) através da proteína Gq, desencadeando uma cascata de sinalização que resulta na ativação plaquetária (Kim e col., 2002; Fälder K e col., 2011; Gandhi e col., 2011).

Em comparação à trombina, o ADP é um agonista menos potente e atua em dois receptores acoplados à proteína G, o P_2Y_1 que está acoplado à proteína Gq e o P_2Y_{12} acoplado à proteína Gi (Jantzen e col., 1999; Gandhi e col., 2011). A ativação de ambos os receptores é necessária para induzir a secreção plaquetária e agregação irreversível em resposta ao ADP (Jantzen e col., 1999; Fälder K e col., 2011).

O agregado plaquetário é determinado por um mecanismo de *feedback* entre dois mediadores o ADP (liberado pelos grânulos densos) e TXA_2 (sintetizado a partir do ácido araquidônico) (Unsworth e col., 2011).

O colágeno é a maior molécula subendotelial capaz de oferecer substrato à adesão de plaquetas, bem como provocar ativação plaquetária. O colágeno induz ativação plaquetária principalmente pela ligação aos receptores GPVI, e posteriormente, $\alpha_{IIb}\beta_3$ que leva à formação de TXA_2 , aumento da concentração de Ca^{2+} e mudança no citoesqueleto (Alberio e col., 1999; Cohen e col., 2011).

1.3. Ativação plaquetária

A ativação plaquetária compreende quatro diferentes fenômenos: a) *shape change*; b) secreção; c) adesão e d) agregação.

O *shape change* envolve a mudança da forma discóide para a forma esférica que é acompanhada de emissão de pseudópodes. A secreção compreende a extrusão do

conteúdo granular durante a adesão e agregação, ou mesmo na ausência de ambas. A adesão plaquetária é o primeiro evento resultante da ligação das plaquetas aos componentes da matriz extracelular e celular da parede vascular danificada. É o processo no qual as plaquetas se juntam a superfícies que não a de outras plaquetas, normalmente à membrana de outras células e aos componentes da matriz extracelular. A agregação é o processo onde as plaquetas se juntam e se ligam a superfícies de outras plaquetas (Blockmans e col., 1995; Do Ceu Monteiro e col., 1999; Bodie e col., 2001; Bakry e col., 2010).

A ativação plaquetária se dá através de uma sequência de sinalização denominada *inside-out*, etapa esta responsável por promover a mudança de estado de baixa afinidade para o estado de alta afinidade do receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ pelo seu ligante, o fibrinogênio; e *outside-in*, caracterizada pela ligação do fibrinogênio com o receptor glicoprotéico $\alpha_{IIb}\beta_3$ plaquetário, provocando uma segunda onda de agregação e estabilização do trombo (Levy-Toledano e col., 1999).

A sinalização *inside-out* é iniciada a partir da ativação da PLC pela subunidade α da proteína G acoplada aos receptores dos agonistas plaquetários.

A PLC cliva o fosfatidil-inositol-2-fosfato (PIP₂) na membrana plasmática gerando dois segundos mensageiros intracelulares, o trifosfato de inositol (IP₃) e o diacilglicerol (DAG) (Shattil e col., 1998).

O IP₃ libera Ca²⁺ do sistema tubular denso da plaqueta, permitindo a fosforilação da miosina de cadeia leve e ativação de enzimas dependentes de Ca²⁺, como a proteína quinase C (PKC) e a fosfolipase A₂ (PLA₂) (Varga-Szabo e col., 2009).

O DAG ativa a PKC que, por sua vez, regula a formação do citoesqueleto da plaqueta e ativa o complexo $\alpha_{IIb}\beta_3$, provocando mudanças conformacionais (Abrams e col.,

1990). Assim, a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ expõe seu sítio de ligação, passando de um estado de baixa atividade (plaqueta em repouso), para o estado de alta afinidade (plaqueta ativada) (Chernovets e col., 2007; Bergmeier e col., 2009; Harper e col., 2010).

A integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ participa dos processo de agregação e adesão sendo responsável pela ligação das plaquetas ao fibrinogênio, vWF, vitronectina e fibronectina (Shattil e col., 1994).

Após a ligação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ ao seu ligante, inicia-se a segunda etapa de sinalização denominada *outside-in*, responsável pela segunda onda da agregação e reorganização do citoesqueleto, sendo esta última importante para a firme adesão bem como para a estabilização dos grandes agregados de plaquetas (Peerschke e col., 1999; Shattil e col., 1999).

Na adesão, o processo de ativação plaquetária começa a partir da etapa *outside-in* enquanto que na agregação, geralmente, inicia-se pela sinalização *inside-out* (Shattil e col., 1994; Levy-Toledano e col., 1999; Obergfell e col., 2002).

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

Em geral, todos os agonistas plaquetários, mesmo atuando em distintos receptores, desencadeiam diferentes cascatas de sinalização que levam ao aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Varga-Szabo e col., 2009) (Figura 1).

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

indispensável para adesão firme e agregação (Shattil e col., 1999; Berridge e col., 2003; Varga-Szabo e col., 2009).

A liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares é um processo bem estabelecido, e envolve a ativação da PLC que por sua vez hidrolisa PIP_2 a IP_3 (induz principalmente a liberação de Ca^{2+} dos estoques) e DAG (envolvida na entrada de Ca^{2+} do meio extracelular) (Figura 1). A PLC é exclusivamente regulada por receptores acoplados à proteína G através da subunidade α da proteína Gq (Rink e col., 1990; Berridge e col., 2003; Berridge e col., 2008; Varga-Szabo e col., 2009).

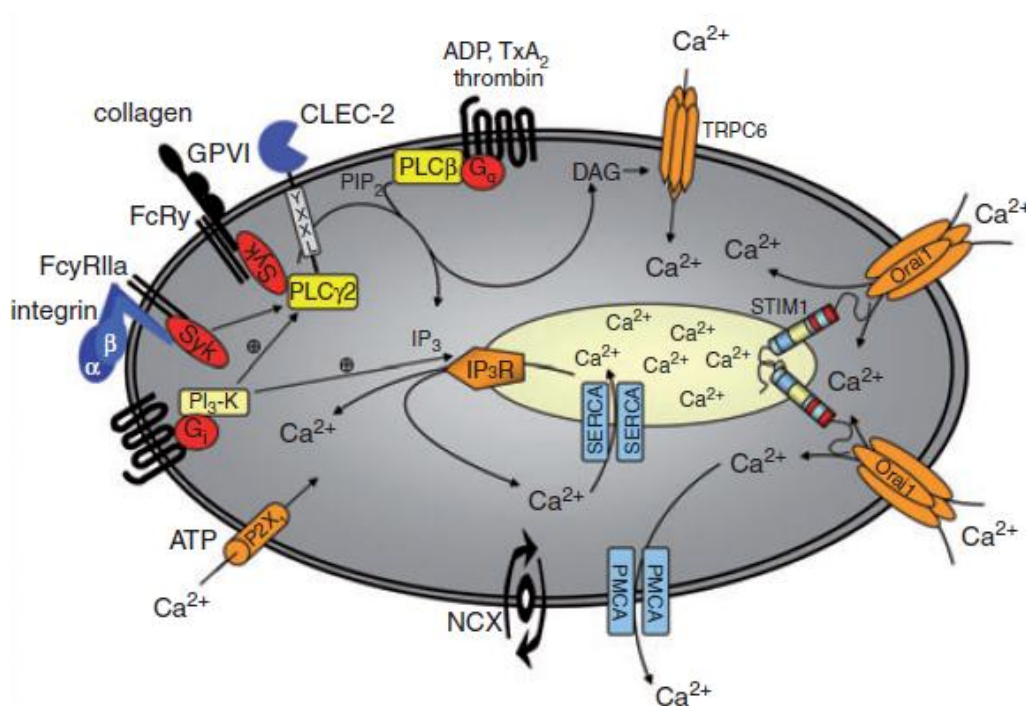


Figura 1. Sinalização do cálcio em plaquetas (Varga-Szabo e col., 2009).

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

reservatório de Ca^{2+} plaquetário. A regulação dos receptores de IP_3 se dá através da fosforilação destes por diversas proteínas quinases (Varga-Szabo e col., 2009).

A manutenção estável dos níveis $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é essencial para manter as plaquetas em estado de repouso na circulação. Assim, dois mecanismos reguladores são conhecidos em plaquetas: as enzimas Ca^{2+} ATPases sarcoplasmáticas/endoplasmáticas (SERCAs) que bombeiam Ca^{2+} para os estoques intracelulares e as enzimas Ca^{2+} ATPases de membranas (PMCAs), que são responsáveis por bombear o Ca^{2+} para fora da célula (Lopez e col., 2005; Jardin e col., 2008; Varga-Szabo e col., 2009).

1.5. Mecanismos de inibição da ativação plaquetária

A ativação plaquetária pode ser inibida em várias de suas etapas, tais como na ligação do agonista à membrana plaquetária, na liberação de TXA_2 ou na translocação de Ca^{2+} . Entretanto, de modo geral, as respostas plaquetárias são inibidas a partir da elevação dos níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos como GMPc e AMPc (Dickinson e col., 1997).

Inibidores plaquetários como a prostaciclina e o NO são capazes de elevar os níveis plaquetários destes nucleotídeos, que por sua vez ativam proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG) e AMPc (PKA) que leva à redução de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Wilhelm e col., 1993; Lessiani e col., 2011).

A proteína de adesão focal VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*), constituída por 46 kDa, é um substrato comum tanto para PKA quanto para PKG. A PKA fosforila a VASP principalmente no resíduo de serina 157, enquanto que a PKG o resíduo de serina 239 (Horstrup e col., 1994; Smolenski e col., 1998).

Massberg e colaboradores (2004) demonstraram que há um aumento de adesão plaquetária em ratos deficientes de VASP, comprovando que a mesma está envolvida na regulação negativa da adesão plaquetária à parede vascular sob condições fisiológicas. Nas plaquetas, a VASP, está estrategicamente localizada na interseção das duas maiores vias inibitória.

A ativação das PKA ou PKG leva à fosforilação da VASP, sendo esta intimamente relacionada à regulação negativa da adesão plaquetária (Massberg e col., 2004). A fosforilação da VASP também leva à inibição da ligação do fibrinogênio com o receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ plaquetário (Horstrup e col., 1994).

1.6. Óxido nítrico

O NO é uma molécula vasodilatadora e potente inibidor plaquetário. O NO foi o primeiro mediador gasoso a ser identificado e desde então tem sido o mais amplamente estudado (Schafer e col., 1980; Moncada e col., 1991).

O NO é formado pela conversão de L-arginina a L-citrulina, NO e oxigênio pela enzima NO sintase (NOS). Há três isoformas de NOS: NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS), que se expressam constitutivamente, e NOS induzível (iNOS), presente principalmente em estados inflamatórios (Moncada e col., 1991; Li e col., 2009).

Estudos anteriores demonstraram a presença de eNOS em plaquetas humanas (Mehta e col., 1995; Chen e col., 1996). Estes autores notaram um aumento da conversão de L-arginina para L-citrulina em plaquetas incubadas com L-arginina e ADP ou adrenalina, sendo esta conversão inibida em meio desprovido de Ca^{2+} e magnésio.

O NO ativa a GCs aumentando os níveis de GMPc em plaquetas, inibindo a adesão destas ao subendotélio, prevenindo a formação de trombos plaquetários (Danielewski e col., 2005; Priora e col., 2011).

Nitrovasodilatadores, como o nitroprussiato de sódio (SNP), são doadores de NO bastante utilizados como ferramenta para se entender o papel fisiológico e patológico da via do NO-GMPc.

Outra droga utilizada como ferramenta no estudo desta via de sinalização é o ODQ (1-H-[1,2,4] oxidiazolo quinoxalin-1-one), reconhecido como inibidor potente e seletivo da GCs (Garthwaite e col., 1995; Schrammel e col., 1996).

O mecanismo de ação do ODQ na GCs purificada de pulmão bovino foi investigado por Schrammel et al. (1996). Estes autores demonstraram que a incubação desta enzima com doadores de NO, na presença de ODQ, resulta em diminuição dos níveis de GMPc. Os autores observaram que a atividade desta enzima, medida na ausência de NO (ou de doadores de NO), também foi inibida pelo ODQ. Portanto, sugeriu-se que a inibição da GCs se faz de modo competitivo com o NO, resultado na oxidação do grupo heme ferroso à forma férrica, que apresenta baixa afinidade pelo NO, contribuindo deste modo para a inativação da enzima.

1.7. Guanilil ciclase solúvel

A GCs é uma proteína citosólica heterodimérica que apresenta quatro subunidades, sendo duas maiores α (α_1 e α_2) e duas menores β (β_1 e β_2). A melhor caracterização dos heterodímeros em humanos são α_1/β_1 e α_2/β_1 . Cada subunidade contém um domínio regulatório N-terminal (grupo prostético heme), uma região de dimerização e

um domínio catalítico C-terminal, sendo necessária a expressão das duas subunidades para a atividade catalítica da GCs (Evgenov e col., 2006; Pyriochou e col., 2006).

A GCs está amplamente distribuída no organismo sendo responsável por diversas funções fisiológicas, através da conversão de GTP em seu segundo mensageiro, o GMPc.

O NO é a principal molécula que ativa a GCs por ligar-se diretamente ao grupo heme formando um complexo heme-ferrosonitrosil. A ligação do NO promove mudanças conformacionais que levam à ativação da GCs e, conseqüentemente, à elevação nos níveis de GMPc, formado a partir do GTP (Ribeiro e col., 2008).

São propostos vários mecanismos para explicar a atividade biológica resultante do aumento nos níveis de GMPc induzido pelo NO. Estes incluem: (1) inibição da geração de IP₃; (2) aumento do sequestro de Ca²⁺ citosólico; (3) desfosforilação da cadeia leve da miosina; (4) inibição do influxo de Ca²⁺; (5) ativação de PK; (6) estimulação da Ca²⁺-ATPase de membrana e (7) abertura de canais de K⁺ (Adam, Guillin e col., 2003; Agren e col., 2008).

1.8. Estimuladores e ativadores da GCs

Durante a década passada muito se estudou sobre a atividade da enzima GCs. As recentes descobertas de agonistas da GCs independentes de NO permitiram uma abordagem farmacológica de uma perspectiva diferente (Evgenov e col., 2006).

Duas classes de moléculas, denominadas “estimuladores” e “ativadores” da GCs, emergiram como valiosas ferramentas que permitiram elucidar, com riqueza de

detalhes, tanto a fisiologia quanto a patofisiologia da via do NO-GCs-GMPc (Schmidt e col., 2004; Evgenov e col., 2006; Schmidt e col., 2009; Stasch e col., 2009).

O YC-1, derivado indazol, foi o primeiro estimulador descrito da GCs. A otimização química desta molécula levou ao descobrimento dos derivados pirazol-pirimida, a exemplo do BAY 41-2272, composto que apresenta maior especificidade e potência ao estimular a GCs, além de possuir um forte sinergismo quando combinado com NO. A ativação da GCs pelo BAY 41-2272 requer que o ferro esteja no seu estado reduzido, semelhante à ativação pelo NO (Schmidt e col., 2001; Schmidt e col., 2004; Stasch e col., 2009).

Em 2002, em um novo programa de derivação química da Bayer, de aproximadamente 800 análogos, o BAY 58-2667 (Figura 2) foi selecionado como o primeiro ativador da GCs independente de NO. Este composto apresentou características completamente diferentes daquelas já conhecidas pelos estimuladores da enzima. Ou seja, a ativação da GCs pelo BAY 58-2667 foi maior após a oxidação ou remoção do grupo prostético, indicando um mecanismo desconhecido de ativação da enzima (Evgenov e col., 2006; Schmidt e col., 2009; Martin e col., 2010; Surmeli e col., 2012).

Outra propriedade importante dos ativadores da GCs é a capacidade de prolongar a meia vida da enzima ou até mesmo aumentar seus níveis protéicos, prevenindo a degradação induzida pela oxidação do grupamento heme (Stasch e col., 2006; Hoffmann e col., 2009).

1.9. BAY 60-2770

O BAY 60-2770 (ácido 4-((4-carboxybutyl) [2- (5-fluoro-2-[[4'-(trifluoromethyl) biphenyl-4-yl]methoxy2phenyl)ethyl] amino)methyl)benzoic) é um análogo do BAY 58-2667, recentemente descrito. O BAY 58-2667, HMR 1766 e S3448, constituem a nova classe de ativadores da GCs (Figura 2).

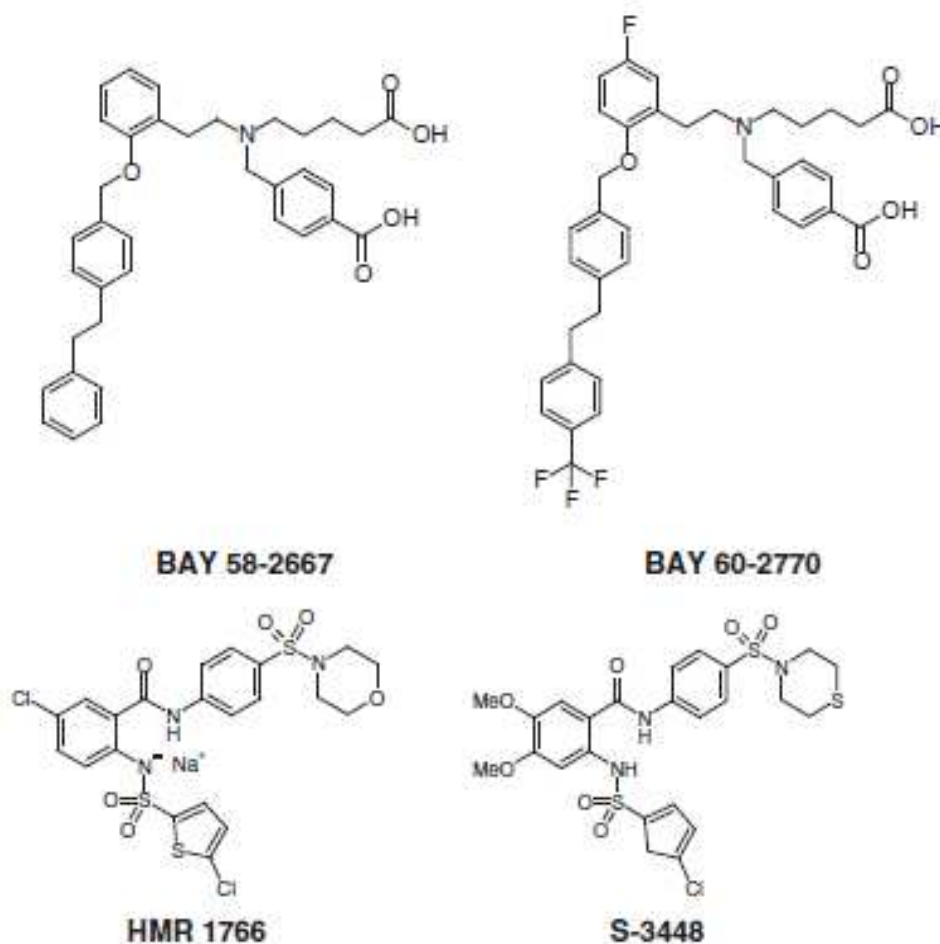


Figura 2. Estrutura química dos ativadores da GCs (Evgenov e col., 2006; Schmidt e col., 2009).

O primeiro trabalho utilizando o BAY 60-2770 foi descrito em 2008. O estudo mostrou que o tratamento oral com BAY 60-2770 em modelo de fibrose hepática em ratos não afeta a pressão sanguínea, mas previne o acúmulo total de colágeno e o aumento de fibras colágenas no fígado (Knorr e col., 2008).

Jones e colaboradores mostraram o efeito do BAY 60-2770 em camundongos *knockout* para a heme-oxigenase-1. Estes animais exibem lesões vasculares e resposta contrátil maior em resposta à fenilefrina (agonista de adrenoreceptores α_1). Nestes animais, o BAY 60-2770 foi cerca de 15 vezes mais efetivo em promover relaxamento vascular do que o estimulador BAY 41-2272 (Jones e col., 2010).

Pankey e colaboradores relataram o efeito do BAY 60-2770 na vasculatura pulmonar e pressão arterial de ratos. Estes autores mostraram que infusões intravenosas do BAY 60-2770, em condições basais, causa discreta diminuição da pressão pulmonar e sistêmica. Entretanto, produz grande redução de ambas as pressões quando o tônus vascular é elevado pela infusão de U-46619 (mimético do TXA₂). Demonstraram ainda que a atividade vasodilatadora do BAY 60-2770 é potencializada em animais previamente tratados com ODQ (Pankey e col., 2011).

Contudo nada é conhecido sobre a ação desta droga sobre a ativação plaquetária. Assim, dado o potencial terapêutico da família dos ativadores de GCs e a falta de informações literárias sobre o mecanismo de ação do BAY 60-2770 em plaquetas humanas, pretendemos investigar as ações antiplaquetárias deste composto. Trabalhamos com a hipótese que a oxidação do grupamento heme pelo ODQ potencializa os efeitos antiplaquetários do BAY 60-2770.

2. Objetivo

O objetivo geral deste projeto é investigar os efeitos antiplaquetários *in vitro* produzidos pelo BAY 60-2770 em plaquetas humanas de voluntários saudáveis.

2.1. Os objetivos específicos

➤ Investigar os efeitos do BAY 60-2770 na adesão e agregação de plaquetas humanas *in vitro*, realizando-se curvas concentração-resposta;

➤ Investigar a sinalização intracelular determinada pelo BAY 60-2770 na adesão e agregação plaquetária, avaliando-se a produção de nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc), mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.

➤ Investigar os efeitos da oxidação do grupamento heme da GCs pelo ODQ, sobre os efeitos antiplaquetários do BAY 60-2770.

➤ Investigar o efeito do BAY 60-2770 na expressão protéica das subunidades α_1 e β_1 da enzima GCs frente à oxidação pelo ODQ.

3. Materiais e Métodos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas- Unicamp, sob o parecer n.º 487/2011 (ANEXO), de acordo com as exigências da Resolução 196/96 e suas complementares.

3.1. Obtenção de plaquetas lavadas

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

O sangue foi coletado na presença de ACD-C (ácido cítrico 3%, citrato trissódico 4%, glicose 2%; 9:1 v/v). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação do sangue total à 200 x g em temperatura ambiente por 12 min. Ao PRP, adicionou-se uma solução de tampão de lavagem (cloreto de sódio 140 mM, cloreto de potássio 5 mM, citrato trissódico 12 mM, glicose 10 mM, sacarose 12.5 mM, pH=6; 5:7 v/v) e então centrifugados à 800 x g, também em temperatura ambiente por 12 min. O sobrenadante foi desprezado. O resíduo plaquetário foi cuidadosamente ressuspense em solução de Krebs-Ringer desprovida de cálcio (NaCl 118 mM, NaHCO₃ 35 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄.7H₂O 1,17 mM, glicose 5,6 mM).

O número de plaquetas foi ajustado para $1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL através de contagem manual utilizando-se câmara de Neubauer. Ao começo de cada protocolo foi adicionado o CaCl₂ à suspensão plaquetária na concentração final de 1 mM.

3.2. Protocolo experimental

A suspensão de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi previamente incubada durante 3 min com o inibidor da GCs, ODQ (10 μ M), ou seu veículo correspondente DMSO (0,5% v/v). Em seguida, as plaquetas foram incubadas com o BAY 60-2770 (0,001 a 10 μ M), DMSO (0,5% v/v), ou SNP (0,1 a 10 μ M) por 3 min. As plaquetas foram então estimuladas com trombina (0,1 U/mL) ou colágeno (2 μ g/mL) para realização dos ensaios de agregação, quantificação dos níveis de nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc) e Ca^{2+} intracelular, assim como no estudo da mudança de conformação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. A concentração final de DMSO nunca foi excedida a níveis maiores de 1%, a qual não interferiu nos ensaios realizados.

3.3. Agregação plaquetária

O estudo da agregação plaquetária foi realizado utilizando-se ensaio turbidimétrico (Born, 1962) em agregômetro de 2 canais (Chrono-log Lumi-Aggregometer model 560-Ca, Havertown, PA, EUA). Alíquotas de 400 μ l de suspensão plaquetária foram transferidas para cuvetas de agregação, provida de dispositivo agitador, mantendo-se a suspensão em constante agitação (600 *r.p.m*), à 37°C. Após a estimulação com os agonistas descritos, a agregação foi monitorada até que a curva atingisse um *plateau*. A resposta ao agonista foi expressa como % de agregação, calculada pela diferença da transmissão de luz do Krebs-Ringer (100% de transmitância) pela transmissão de luz da suspensão plaquetária.

3.4. Adesão plaquetária

Os ensaios de adesão, baseado na atividade da enzima fosfatase alcalina, foram realizados como descritos previamente por Bellavite e colaboradores, com algumas modificações (Bellavite e col., 1994).

Microplacas de alta ligação, contendo 96 poços, foram revestidas com fibrinogênio mantendo-a em repouso em geladeira *overnight*. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com solução de Krebs-Ringer desprovida de cálcio e os sítios inespecíficos foram bloqueados pela adição de 100 µM/poço de uma solução de albumina de soro bovino (BSA) (1%). Após 1h à 37°C, o BSA foi removido e a microplaca lavada duas vezes com 200 µL de Krebs-Ringer, e deixadas à 37°C.

Duzentos microlitros da suspensão de plaquetas (1.2×10^8 plaqueta/ml) foram transferidos para microtubos e incubados com o BAY 60-2770 ou SNP, na presença ou ausência de ODQ, segundo o protocolo experimental. Em seguida, 50 µL do conteúdo dos microtubos foram adicionados a cada poço da microplaca. As plaquetas foram mantidas em estufa úmida à 37°C por 30 min. As plaquetas não aderidas neste período foram removidas e os poços lavados duas vezes com solução de Krebs-Ringer.

Os poços ensaiados receberam 50 µL de Krebs-Ringer e os poços reservados ao controle receberam 50 µL da curva padrão plaquetária (concentrações variadas da suspensão plaquetária original), em triplicata. Em seguida, foram adicionados a todos os poços 150 µL de substrato para a fosfatase ácida (tampão citrato 0,1 M, pH=5,4 contendo fosfato de *p*-nitrofenil 5 mM e triton X-100 0,1%). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora, e após esse período, 100 µL de NaOH 2M foram adicionados a cada poço para interromper a reação. A absorbância foi determinada à 405

nm em leitor de ELISA (Synergy™ H1 Hybrid Reader, Biotek, USA). A adesão plaquetária foi calculada, pela medida da atividade da fosfatase ácida, das plaquetas aderidas ao fibrinogênio. Para tanto, foi confeccionado uma curva padrão de plaquetas ($0,3-6 \times 10^6$ plaquetas/poço). Os resultados foram expressos em porcentagem de adesão em relação ao controle (100%).

3.5. Dosagem dos nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc)

3.5.1. Extração e dosagem de GMPc e AMPc

As plaquetas foram isoladas como descrito anteriormente e incubadas com o inibidor inespecífico de fosfodiesterases 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX, 1 mM) por 20 min à temperatura ambiente. Posteriormente, as plaquetas foram incubadas como descrito no protocolo experimental e então estimuladas com colágeno (2 µg/ml) ou trombina (0,1 U/mL) durante 5 min. A reação foi interrompida adicionando-se etanol absoluto acidificado (99%) gelado, e as amostras agitadas durante 30 segundos por vortex. Em seguida, as amostras foram incubadas em gelo por 30 min e centrifugadas à 4000 x g, 4°C, por 30 min.

Os sobrenadantes das amostras foram recolhidos e guardados, sendo os precipitados lavados com 0,5 mL de etanol acidificado (67%) gelado e centrifugado novamente nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram adicionados aos primeiros.

As amostras foram secas à 55 – 60 °C, sob fluxo constante de nitrogênio e estocados à -80°C até a dosagem.

A dosagem foi realizada utilizando-se kits comerciais da Cayman (Cayman Chemical Cyclic GMP ou AMP EIA kit, Ann Arbor, MI, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante. A intensidade da cor determinada pelo espectrofotômetro é proporcional aos nucleotídeos livres durante a incubação. Cada poço recebeu material proveniente de $1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL (50 μ L), sendo que cada amostra foi realizada em triplicata. A leitura foi realizada a 412 nm. O limite de detecção é de 1 pmol/mL para o GMPc e 0,1 pmol/ml para AMPc.

3.6. Ensaio de mobilização citosólica de cálcio em plaquetas

3.6.1. Marcação de cálcio plaquetário com FluoForte

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

3.6.2. Medida de Ca^{2+} citosólico

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

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

A fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro (SynergyTM H1 Hybrid Reader, Biotek, EUA), utilizando-se comprimento de onda de 410 nm de excitação e 514 nm de emissão. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em nM foi calculada utilizando a equação (Grynkiewicz e col., 1985): $[\text{Ca}^{2+}]_i = k_d \cdot (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{máx}} - F)$, onde o k_d (389) é a constante de dissociação do marcador fluorescente fluoforesce.

Para estimar a concentração dos estoques de Ca^{2+} plaquetário, foram adicionados o quelante de Ca^{2+} EGTA (10 μM) às alíquotas (300 μL) da suspensão plaquetária, permitindo-se estabilização por 1 minuto. Após a incubação com BAY 60-2770 e SNP, na presença ou na ausência de ODQ, as plaquetas foram estimuladas com trombina ou colágeno, obtendo-se valores de fluorescência pós-estímulos de mobilização interna de Ca^{2+} .

O influxo total de Ca^{2+} foi estimado em nM, utilizando-se 300 μL da suspensão plaquetária. Após 1 minuto de incubação com Ca^{2+} (CaCl_2 1 mM), as plaquetas foram novamente incubadas com o inibidores da GCs, na presença ou na ausência do ODQ e

então estimuladas com colágeno ou trombina, obtendo-se valores de fluorescência pós-estímulo de mobilização total (influxo externo + mobilização dos estoques internos de Ca^{2+}).

3.7. Mudança da conformação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa)

A análise da mudança da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ do seu estado inativado para o estado ativado foi realizada através da ligação do anticorpo específico PAC-1 conjugado com FITC, específico para a conformação ativada desta proteína.

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

Para minimizar a presença de agregados, adicionou-se 450 μl de solução Krebs-Ringer.

A ligação do anticorpo foi quantificada usando um citometro de fluxo (FACSCalibur BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) equipado com laser de argônio (488 nm) e utilizando o canal 1 (FL1). Foi feito um *gate* com a população de plaquetas, a qual foi identificada pelos sinais *forward* e *side scatter*. Dez mil eventos foram analisados e a fluorescência média foi considerada como parâmetro para descrever a intensidade de ligação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ ao PAC-1.

3.8. Western blotting

As suspensões de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaq/mL) foram incubadas com ODQ (10 μ M) ou seu veículo correspondente, na presença ou na ausência de BAY 60-2770 (10 μ M) por 150 minutos. Após a incubação, a suspensão plaquetária (1,5 mL) foi centrifugada à $12,000 \times g$ por 20 min à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de plaquetas foi ressuspenso em 50 μ L de tampão de extração (SDS 1%, Tris 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 100 mM; pH 7,4). As plaquetas foram homogeneizadas utilizando-se um sonicador (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) e então submetidas à uma nova centrifugação ($12,000 \times g$, 4°C, 20 min) para remoção do material insolúvel. Parte do sobrenadante das amostras foi utilizado para determinação protéica por espectrofotometria com reagente Bradford (Biorad, CA, EUA). Foi adicionado tampão Laemmli, posteriormente à equalização das amostras à 50 μ g de proteína. A eletroforese das amostras foi feita em SDS-PAGE (2,6%C e 8-12%T) em aparelho para minigel (*Mini-Protean*, Bio-Rad) e transferidas para membranas de nitrocelulose em sistema semi-dry (60 min; 15V) (Bio-Rad, CA, USA). A fim de bloquear as ligação não específicas, a membrana de nitrocelulose foi incubada à uma solução de leite 0,5%, Tris-Base (10 mM), NaCl (100 mM) e Tween-20 (0,02%) por 12 horas à 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos contra as subunidades da GCs $\alpha 1$ (AbCam Technology, Cambridge, England, Reino Unido), $\beta 1$ (NovusBiologicals, Littleton, CO, EUA) ou GAPDH (Santa Cruz, CA, EUA). Após a marcação com anticorpo primário, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente (GE Healthcare, USA). Para detecção das bandas, as membranas foram incubadas por 1 minuto com uma

solução contendo luminol, ácido p-cumárico e H_2O_2 e, então, expostas durante tempos variados, à filmes de raio-X. A quantificação foi realizada através da análise de densitometria óptica pelo Software Scion Image (Scioncorp, NIH, EUA). Os valores foram normalizados utilizando a banda do GAPDH.

3.9. Análise estatística

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

4. Resultados

4.1. Agregação de plaquetas lavadas humanas

4.1.1. Efeito inibitório do BAY 60-2770 sobre a agregação de plaquetas induzida por colágeno

A incubação do BAY 60-2770 (0,001 – 10 μ M) em plaquetas lavadas humanas provocou inibição significativa da agregação induzida por colágeno (2 μ g/mL; Figura 3). A agregação plaquetária foi praticamente abolida pelo BAY 60-2770 nas concentrações maiores ou iguais a 0,1 μ M. Observa-se ainda que o efeito inibitório do BAY 60-2770 (0,001 e 0,01 μ M) foi significativamente potencializado pela incubação prévia das plaquetas com o ODQ.

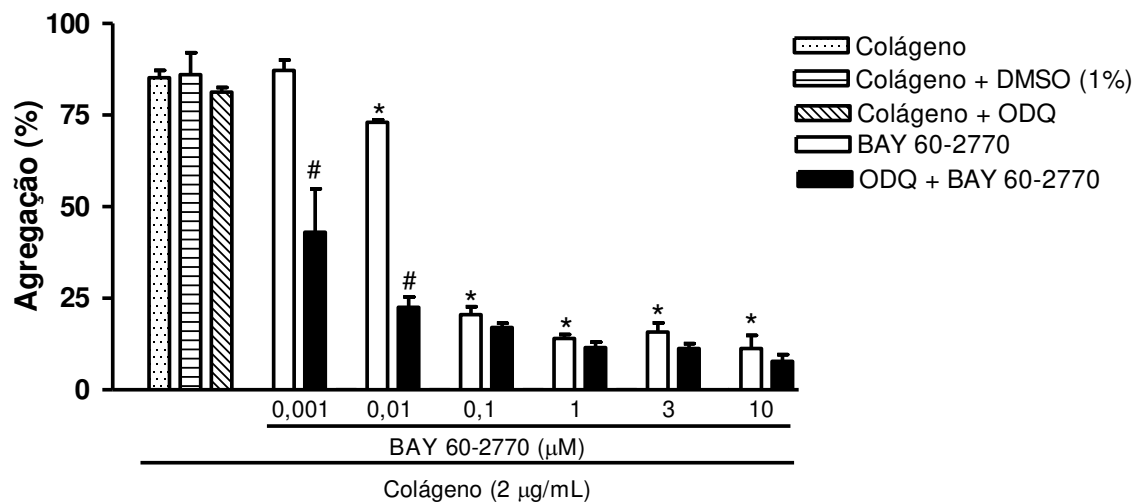


Figura 3. Efeito inibitório do BAY 60-2770 na agregação de plaquetas lavadas humanas induzida pelo colágeno, na presença ou ausência do inibidor da GCs, ODQ. A suspensão de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com o BAY 60-2770 (0,001 – 10 µM) por 3 min, na presença ou na ausência do ODQ (10 µM), previamente incubado por 3 min. Em seguida, as plaquetas foram estimuladas com colágeno (2 µg/mL). Os resultados estão expressos como média da % de agregação $\pm$ E.P.M. (n = 4-5). *p<0,05 comparado com os valores controles (colágeno + DMSO); #p<0,05 comparado ao seu respectivo valor na ausência do ODQ.

4.1.2. Efeito inibitório do BAY 60-2770 sobre a agregação de plaquetas induzida por trombina

A agregação de plaquetas lavadas induzida por trombina (0,1 U/mL) foi resistente ao BAY 60-2770 para a maioria das concentrações estudadas, exceto para 10 µM, que produziu um efeito inibitório de cerca de 60% (p<0,05) (Figura 4). Contudo, na presença de ODQ (10 µM), o BAY 60-2770 inibiu, de maneira concentração – dependente, a agregação plaquetária a partir de 0,1 µM (Figura 4).

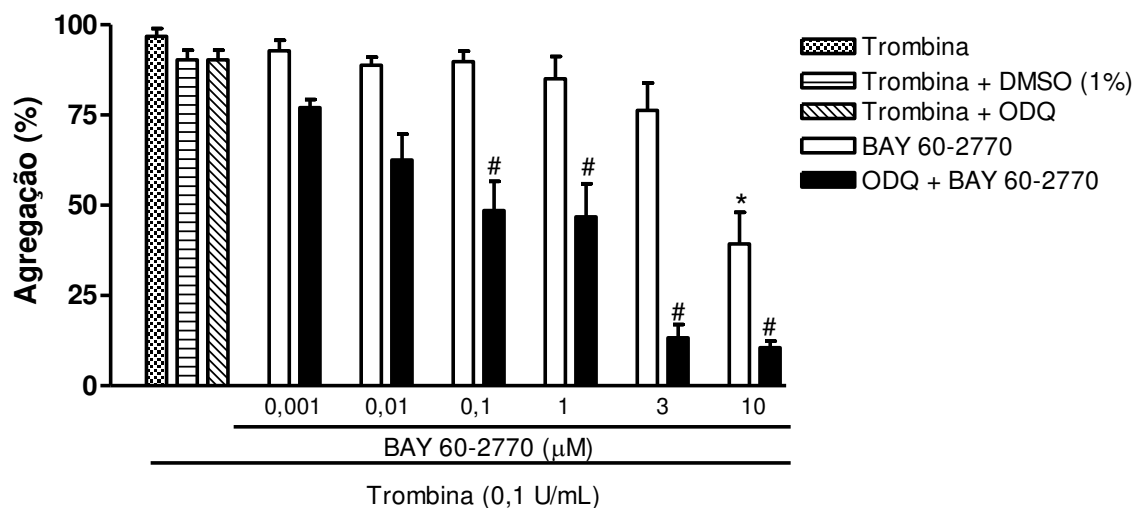


Figura 4. Efeito inibitório do BAY 60-2770 na agregação de plaquetas lavadas humanas induzida por trombina, na presença ou ausência do inibidor da GCs, ODQ. A suspensão de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com o BAY 60-2770 (0,001 – 10 μ M) por 3 min, na presença ou na ausência do ODQ (10 μ M), previamente incubado por 3 min. Em seguida, as plaquetas foram estimuladas com trombina (0,1 U/mL). Os resultados estão expressos como média da % de agregação $\pm$ E.P.M. (n = 4-5). *p<0,05 comparado com os valores controles (trombina + DMSO); #p<0,05 comparado ao seu respectivo valor na ausência do ODQ.

Os traçados representativos do efeito antiagregante do BAY 60-2770 na ausência e presença do ODQ estão representados na figura 5.

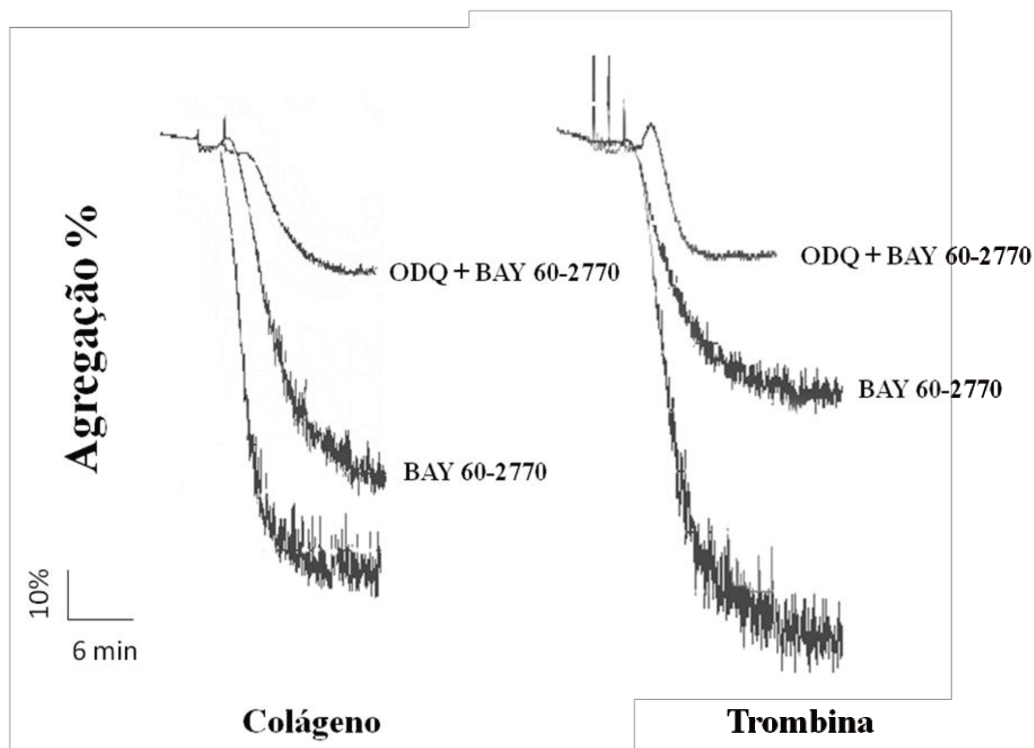


Figura 5. Traçados originais referentes à agregação de plaquetas lavadas humanas estimuladas com colágeno ou trombina. Suspensão de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com BAY 60-2770 ($0,01 \mu\text{M}$ para colágeno e $10 \mu\text{M}$ para trombina) por 3 min, na presença ou na ausência do ODQ ($10 \mu\text{M}$ – 3 min), após as incubações, as soluções foram estimuladas com colágeno ($2 \mu\text{g/mL}$) ou trombina ($0,1 \text{ U/mL}$).

4.1.3. Efeito inibitório do SNP sobre a agregação de plaquetas induzida por colágeno ou trombina

A incubação do SNP ($0,1 - 10 \mu\text{M}$) em plaquetas lavadas produziu inibição significativa da agregação induzida tanto por colágeno ($2 \mu\text{g/mL}$; Figura 6) quanto para trombina ($0,1 \text{ U/mL}$; Figura 7). O efeito inibitório do SNP sobre a agregação plaquetária foi

total ou parcialmente revertido pela pré-incubação com ODQ (10 μ M) em todas as concentrações estudadas de SNP, para ambos os agonistas utilizados.

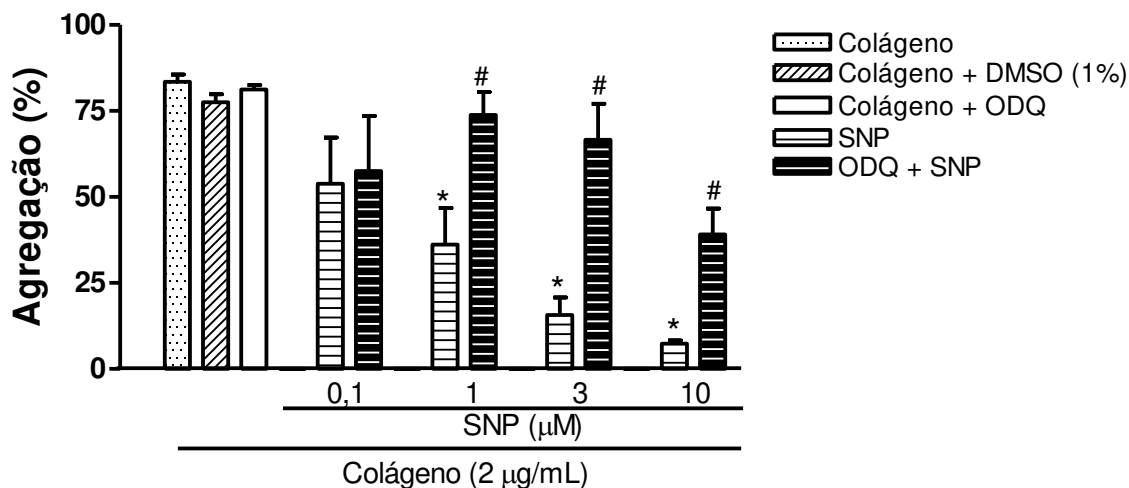


Figura 6. Efeito inibitório do nitroprussiato de sódio (SNP) na agregação de plaquetas lavadas humanas induzida por colágeno, na presença ou ausência do inibidor da GCs, ODQ. A suspensão de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com o SNP (0,1 – 10 μ M) por 3 min, na presença ou ausência do ODQ (10 μ M), previamente incubado por 3 min. Em seguida, as plaquetas foram estimuladas com colágeno (2 μ g/mL). Os resultados estão expressos como média da % de agregação $\pm$ E.P.M. (n = 4-5). *p<0,05 comparado com os valores controles (colágeno + DMSO); #p<0,05 comparado ao seu respectivo valor na ausência do ODQ.

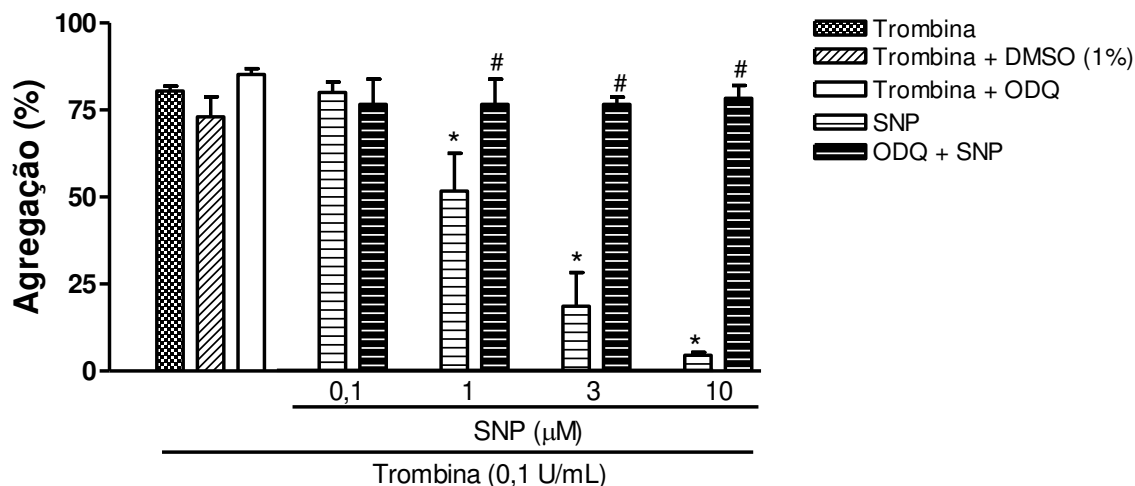


Figura 7. Efeito inibitório do nitroprussiato de sódio (SNP) na agregação de plaquetas lavadas humanas induzida por trombina, na presença ou ausência do inibidor da GCs, ODQ. A suspensão de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com o SNP (0,1 – 10 μ M) por 3 min, na presença ou ausência do ODQ (10 μ M), previamente incubado por 3 min. Em seguida, as plaquetas foram estimuladas com trombina (0,1 U/mL). Os resultados estão expressos como média da % de agregação $\pm$ E.P.M. (n = 4-5). *p<0,05 comparado com os valores controles (trombina + DMSO); #p<0,05 comparado ao seu respectivo valor na ausência do ODQ.

4.1.4. Efeito inibitório do 8-Br-GMPc sobre a agregação de plaquetas induzida por colágeno ou trombina

Em experimentos separados, as plaquetas foram pré-incubadas com ODQ (10 μ M) ou seu veículo correspondente, por 3 min. Em seguida, adicionou-se o análogo permeável do GMPc, 8-Br-GMPc (100 μ M) por 20 min. Após as incubações, as plaquetas foram estimuladas com colágeno (2 μ g/mL) ou trombina (0,1 U/mL).

O 8-Br-GMPc inibiu significativamente a agregação de plaquetas lavadas humanas induzida por colágeno e trombina ($66 \pm 9,2\%$ e $29 \pm 10\%$ de inibição, respectivamente; $p < 0,05$). O efeito inibitório do 8-Br-GMPc sobre a agregação plaquetária não foi alterado em plaquetas pré-incubadas com ODQ ($65 \pm 12\%$ e $35 \pm 6,8\%$ de inibição, respectivamente) (Figura 8).

A porcentagem de inibição da agregação plaquetária pelo 8-Br-GMPc foi maior quando a agregação era induzida pelo colágeno comparado à trombina, tanto na presença quanto na ausência do ODQ ($p < 0,02$).

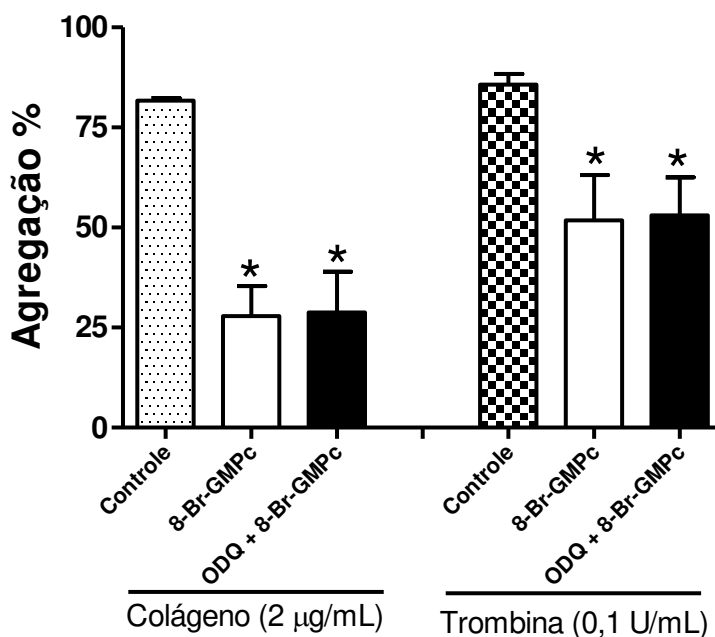


Figura 8. Efeito inibitório do 8-Br-GMPc na agregação de plaquetas lavadas humanas induzida pelo colágeno ou trombina, na presença ou ausência do inibidor da GCs, ODQ. A suspensão de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com $100 \mu\text{M}$ de 8-Br-GMPc por 20 min, na presença ou na ausência do ODQ ($10 \mu\text{M}$), previamente incubado por 3 min. Em seguida, as plaquetas foram estimuladas com colágeno ($2 \mu\text{g/mL}$) ou trombina ($0,1 \text{ U/mL}$). Os resultados estão expressos como média da % de agregação $\pm$ E.P.M. ($n = 5-7$). * $p < 0,05$ comparado com os valores controles.

4.2. Adesão de plaquetas lavadas humanas

4.2.1. Efeito inibitório do BAY 60-2770 e SNP sobre a adesão de plaquetas humanas ao fibrinogênio imobilizado

O ensaio de adesão de plaquetas humanas ao fibrinogênio é baseado na medida da atividade da enzima fosfatase alcalina. Assim, os experimentos foram iniciados após a exclusão da possibilidade de o BAY 60-2770 afetar diretamente a atividade desta enzima. Para tanto, 50 µL por poço da solução de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaqueta/mL) foram incubadas em placas não recobertas com fibrinogênio com BAY 60-2770 por 30 min, após o qual avaliou-se a atividade da enzima. O BAY 60-2770 (10 µM) não afetou a atividade da enzima ($3,4 \pm 0,06$ e $3,5 \pm 0,02$ de densidade ótica para o controle e BAY 60-2770, respectivamente; $n = 3$), validando-se os ensaios de adesão.

A adesão de plaquetas ao fibrinogênio imobilizado, quando incubadas por 30 min, não foi alterada pela presença do volume correspondente de DMSO, utilizado para a solubilização do BAY 60-2770 e ODQ ($p < 0,05$; Figura 9).

A incubação com o BAY 60-2770 (0,1 – 10 µM) inibiu significativamente a adesão das plaquetas a partir de 1 µM, sendo este efeito inibitório marcadamente potencializado pela incubação prévia com ODQ (10 µM) (Figura 9 A).

O SNP inibiu significativamente a adesão das plaquetas a partir de 1 µM, sendo este efeito inibitório revertido pela incubação prévia com ODQ (10 µM) (Figura 9 B).

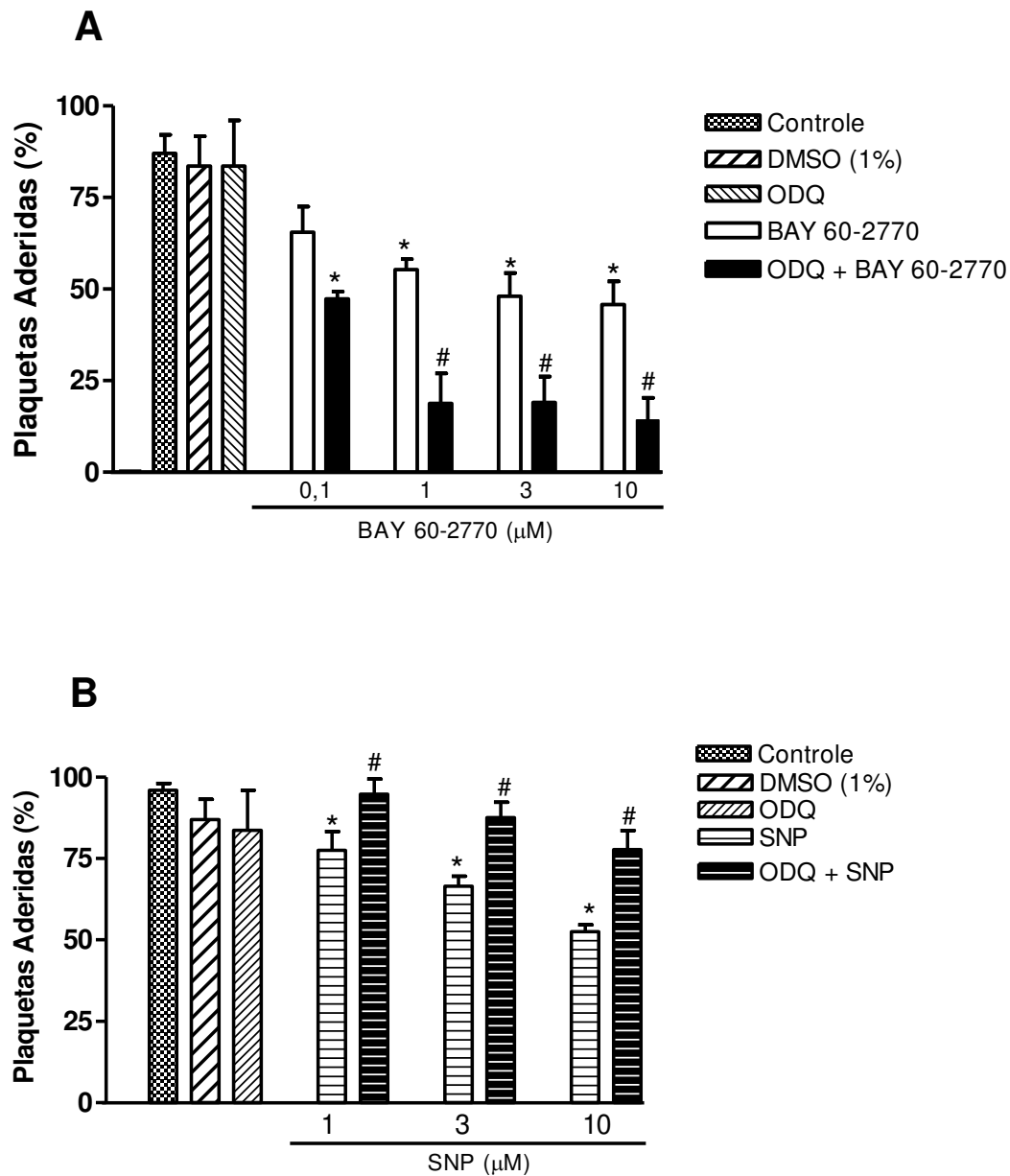


Figura 9. Efeito inibitório do BAY 60-2770 e do nitroprussiato de sódio (SNP) sobre a adesão plaquetária em placas recobertas com fibrinogênio. A solução plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi pré-incubada com ODQ (10 μM ; 3 min) e subsequentemente com BAY 60-2770 (0,1 – 10 μM) ou SNP (1 – 10 μM) por mais 3 min. Os resultados estão expressos como média da % de adesão plaquetária $\pm$ E.P.M. (n = 6-7). *p<0,05 comparado com os valores controles (DMSO); #p<0,05 comparado ao seu respectivo valor na ausência do ODQ.

4.3. Análise dos níveis de nucleotídeos cíclicos em plaquetas lavadas humanas

4.3.1. *GMPC*

O nível basal contido nas plaquetas lavadas foi de $1,8 \pm 0,25$ pmol/mL, o qual não foi significativamente diferente após a estimulação com colágeno ($2 \mu\text{g/mL}$; $1,4 \pm 0,3$ pmol /mL; Figura 10A) ou trombina ($0,1 \text{ U/mL}$; $2,3 \pm 0,5$ pmol /mL; Figura 10B). O DMSO, utilizado para solubilizar o BAY 60-2770 e ODQ, não alterou os níveis basais deste nucleotídeo (Figura 10).

A incubação das plaquetas lavadas com o BAY 60-2770 ($0,01 - 3 \mu\text{M}$) aumentou de maneira concentração-dependente os níveis de GMPC em plaquetas estimuladas com colágeno (Figura 10A). Aumento similar dos níveis de GMPC pelo BAY 60-2770 foi observado em plaquetas ativadas com trombina (Figura 10B). A incubação prévia com o ODQ ($10 \mu\text{M}$) potencializou ($p < 0,05$) o aumento de GMPC pelo BAY 60-2770, em todas as concentrações testadas, para ambos os agonistas, como mostrado na figura 10.

O SNP ($3 \mu\text{M}$) elevou os níveis de GMPC para ambos os agonistas, colágeno (Figura 10A) e trombina (Figura 10B). Porém, o pré-tratamento das plaquetas com o ODQ restaurou os níveis de GMPC para os valores basais.

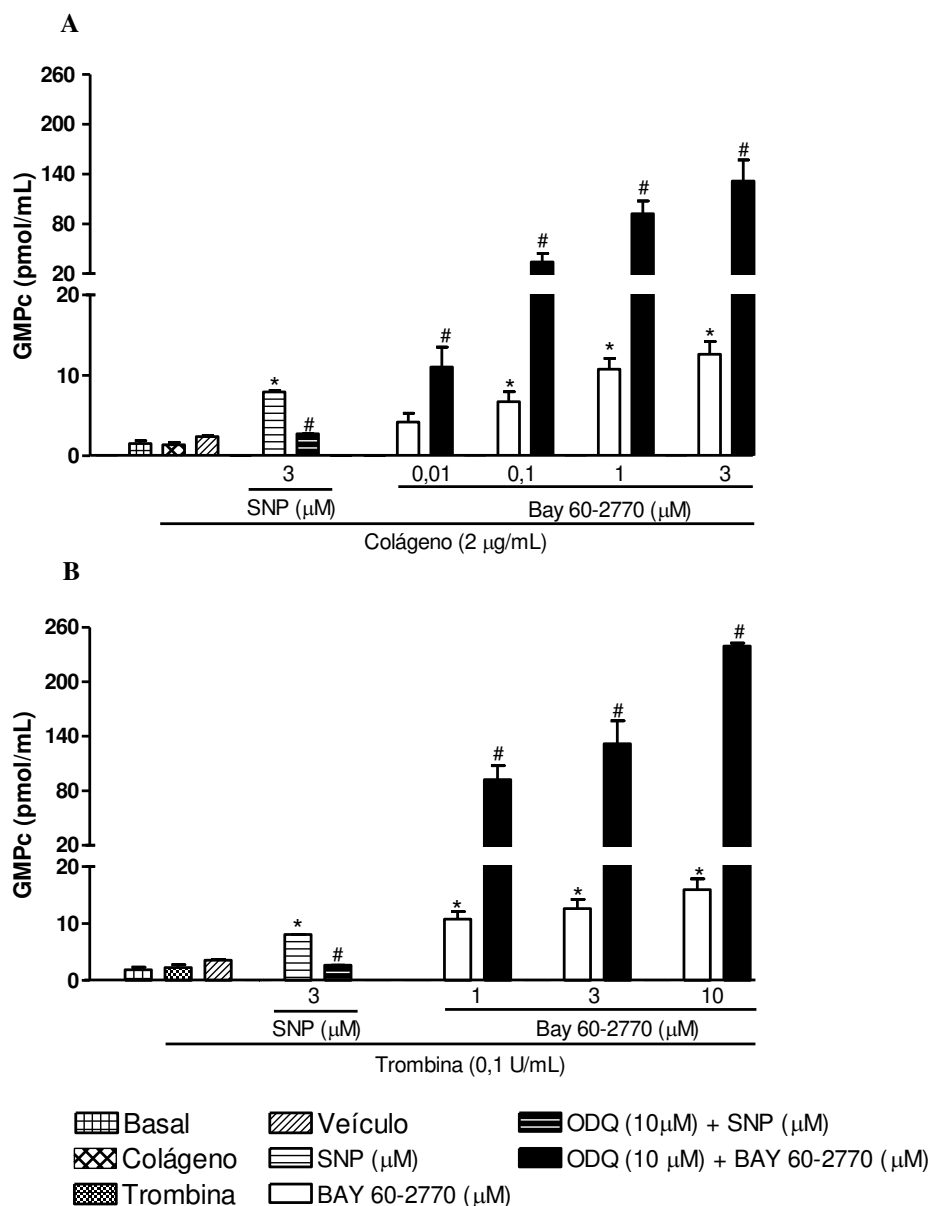


Figura 10. Efeito do BAY 60-2770 nos níveis de GMPC em plaquetas lavadas humanas estimuladas com colágeno e trombina. A suspensão de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaq/mL) foi incubada com BAY 60-2770 (0,01 – 3 µM) ou SNP (3 µM), na ausência ou na presença do ODQ (10 µM; 3 min) por 3 min seguida da estimulação com colágeno (2 µg/mL) ou trombina (0,1 U/mL). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. (n = 3). O teste foi realizado em triplicata. *p<0,05 comparado com os valores basais; #p<0,05 comparado ao seu respectivo valor na ausência do ODQ.

4.3.2. AMPc

O nível basal contido nas plaquetas lavadas foi de 18 ± 2 pmol/mL, o qual não foi significativamente diferente após a estimulação com colágeno ($2 \mu\text{g/mL}$; $18 \pm 1,4$ pmol/mL; Figura 11A) ou trombina ($0,1 \text{ U/mL}$; 19 ± 2 pmol/mL; Figura 11B). O DMSO não alterou os níveis basais de AMPc (Figura 11).

A incubação das plaquetas lavadas com o BAY 60-2770 ($1 \mu\text{M}$ para o colágeno; $10 \mu\text{M}$ para a trombina) não alterou os níveis basais de AMPc (Figura 11). A incubação prévia com o inibidor da adenilil ciclase, SQ 22536 ($100 \mu\text{M}$), não alterou os níveis basais de AMPc ($p < 0,05$).

O análogo de prostaciclina, iloprost ($0,3 \mu\text{M}$), utilizado como controle positivo, elevou marcadamente os níveis de AMPc ($p < 0,01$) tanto para o colágeno (Figura 11A) quanto para a trombina (Figura 11B). O pré-tratamento das plaquetas com o SQ 22536 ($100 \mu\text{M}$) inibiu significativamente a elevação dos níveis de AMPc pelo iloprost (Figura 11).

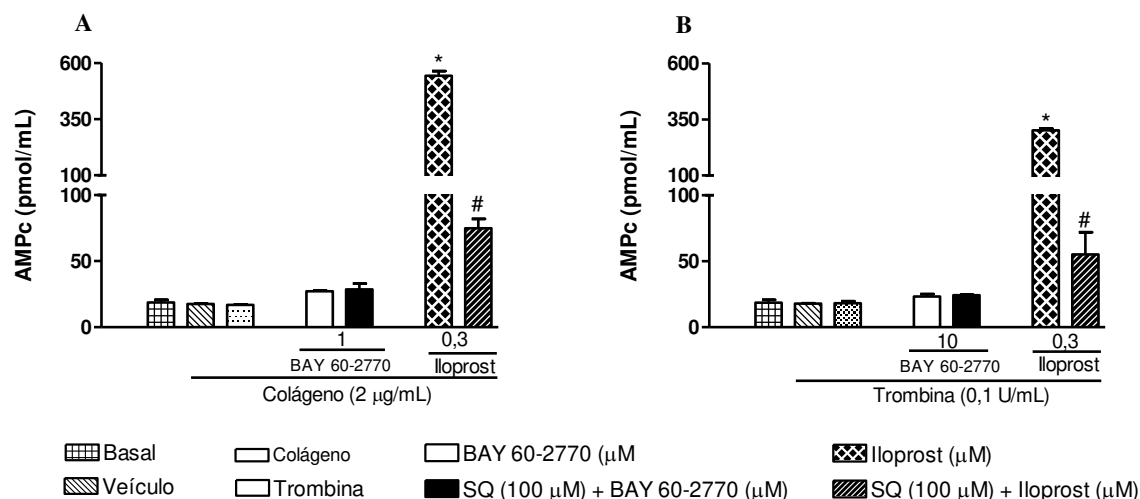


Figura 11. Efeito do BAY 60-2770 nos níveis de AMPc em plaquetas lavadas humanas estimuladas com colágeno ou trombina. A suspensão de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi incubada com BAY 60-2770 (1 µM para colágeno; 10 µM para trombina) ou iloprost (0,3 µM), na ausência ou presença do SQ 22536 (100 µM; 3 min), seguida da estimulação com colágeno (2 µg/mL; A) ou trombina (0,1 U/mL; B). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. (n = 3). O teste foi realizado em triplicata. *p<0,05 comparado com os valores basais; #p<0,05 comparado ao seu respectivo valor na ausência do SQ 22536.

4.4. Mobilização citosólica de cálcio plaquetário

A mobilização de Ca^{2+} foi estudada em plaquetas lavadas humanas ativadas com colágeno (2 µg/mL) ou trombina (0,1 U/mL) após pré-incubação com BAY 60-2770, SNP ou 8-Br-GMPc, na presença ou na ausência de ODQ (10 µM). A incubação das plaquetas com 1% de DMSO não alterou a mobilização de Ca^{2+} em nenhuma condição estudada.

A trombina provocou uma maior (p<0,05) mobilização de Ca^{2+} intracelular quando comparado ao colágeno (Figuras 12 e 13).

4.4.1. Mobilização de cálcio intracelular em plaquetas estimuladas por colágeno

Para verificar somente a mobilização dos estoques intracelulares de Ca^{2+} , utilizou-se uma solução de Krebs desprovida de Ca^{2+} , na presença de EGTA (10 μM). Sobre estas condições, o aumento dos níveis de Ca^{2+} , provocado pelo colágeno, foi marcadamente maior que o basal (Figura 12A), mas em menor grau, quando comparado com as plaquetas na presença de CaCl_2 (Figura 12B).

A incubação com BAY 60-2770 (0,01 – 1 μM) reduziu de maneira concentração-dependente a mobilização de Ca^{2+} dos estoques, sendo restaurado ao valor basal quando na presença de ODQ (Figura 12A).

Na presença de 1 mM de CaCl_2 , a estimulação das plaquetas com colágeno elevou os níveis intracelulares de Ca^{2+} total em aproximadamente 6 vezes ($p < 0,05$; Figura 12B). A incubação com BAY 60-2770 (0,01 – 1 μM) reduziu significativamente os níveis de Ca^{2+} total em resposta ao colágeno. Este efeito inibitório foi potencializado na presença de ODQ (10 μM), como visto na concentração de 0,01 μM , BAY 60-2770 (Figura 12B).

O SNP (3 μM) reduziu a mobilização intracelular de Ca^{2+} pelo colágeno em ambos os compartimentos estudados (Ca^{2+} total e intracelular). O tratamento das plaquetas com o ODQ reverteu estes efeitos (Figura 12A, B).

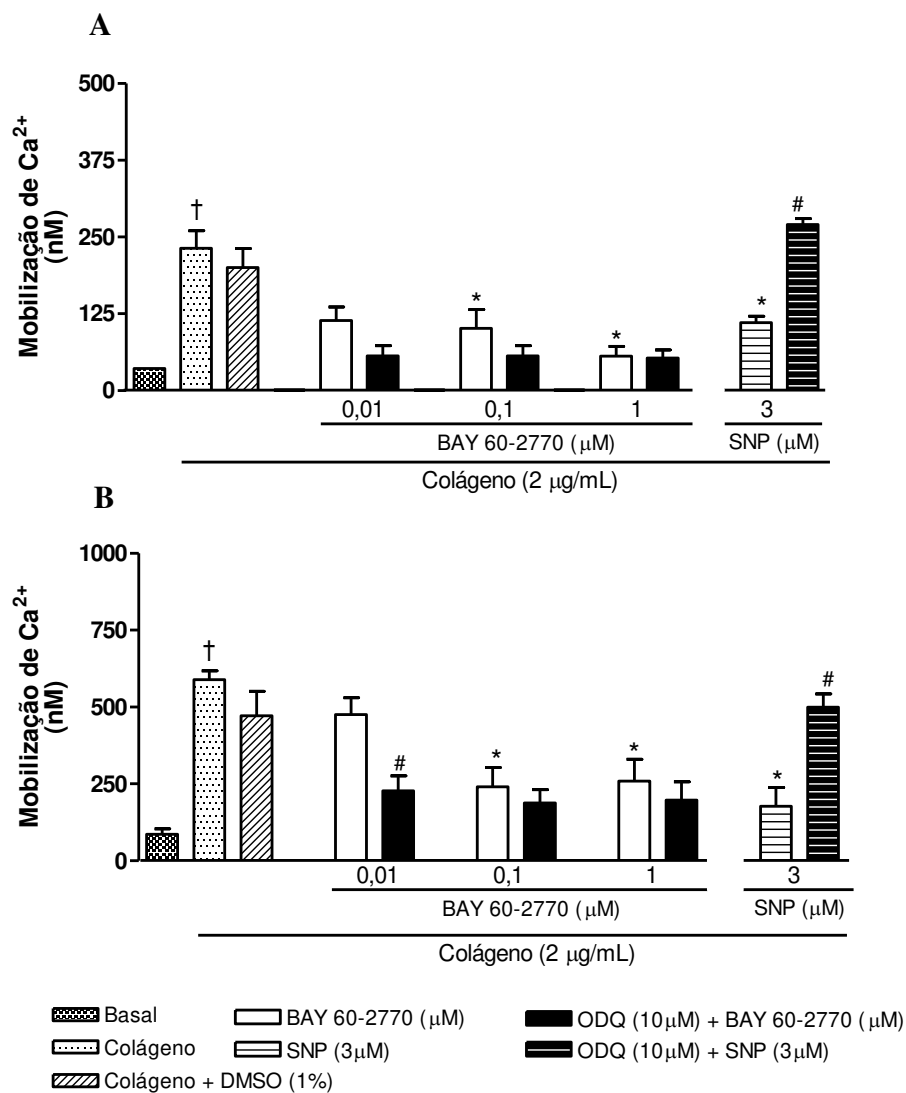


Figura 12. Efeito inibitório do BAY 60-2770 e nitroprussiato de sódio (SNP) sobre a mobilização de Ca^{2+} em plaquetas lavadas humanas estimuladas com colágeno. As plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foram marcadas com o fluoróforo Fluofort (10 μM) e incubadas com ODQ (10 μM ; 3 min) seguida de incubação com BAY 60-2770 (0,01 - 1 μM) ou SNP (3 μM) por 3 min, após o qual as plaquetas foram estimuladas com colágeno (2 $\mu\text{g/mL}$). Avaliou-se tanto o influxo de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (na presença de EGTA 1 mM; A) quanto o influxo de Ca^{2+} total (na presença de Ca^{2+} ; B). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. (n = 4 - 7). *p<0,05 comparado com colágeno; #p<0,05 comparado ao seu respectivo valor na ausência do ODQ; † p<0,05 comparado ao basal.

4.4.2. Mobilização intracelular de cálcio em plaquetas estimuladas por trombina

Na presença de EGTA (10 μ M), o aumento dos níveis de Ca^{2+} pela trombina (0,1 U/mL) foi aproximadamente 50% menor (figura 13A) quando comparado às plaquetas na presença de CaCl_2 (Figura 13B). Nesta condição, a incubação do BAY 60-2770 (1 – 10 μ M) reduziu de maneira concentração-dependente a mobilização de Ca^{2+} dos estoques, sendo este efeito potencializado pela presença de ODQ (Figura 13A).

Na presença de 1 mM de CaCl_2 , a incubação com BAY 60-2770 (1 – 10 μ M) reduziu de maneira, concentração-dependente os níveis de Ca^{2+} total. Este efeito inibitório foi potencializado na presença de ODQ (10 μ M) (Figura 13B).

O SNP (3 μ M) reduziu a mobilização intracelular de Ca^{2+} pela trombina em ambos os compartimentos estudados (Ca^{2+} total e intracelular). O tratamento das plaquetas com o ODQ reverteu este efeito (Figura 13A, B).

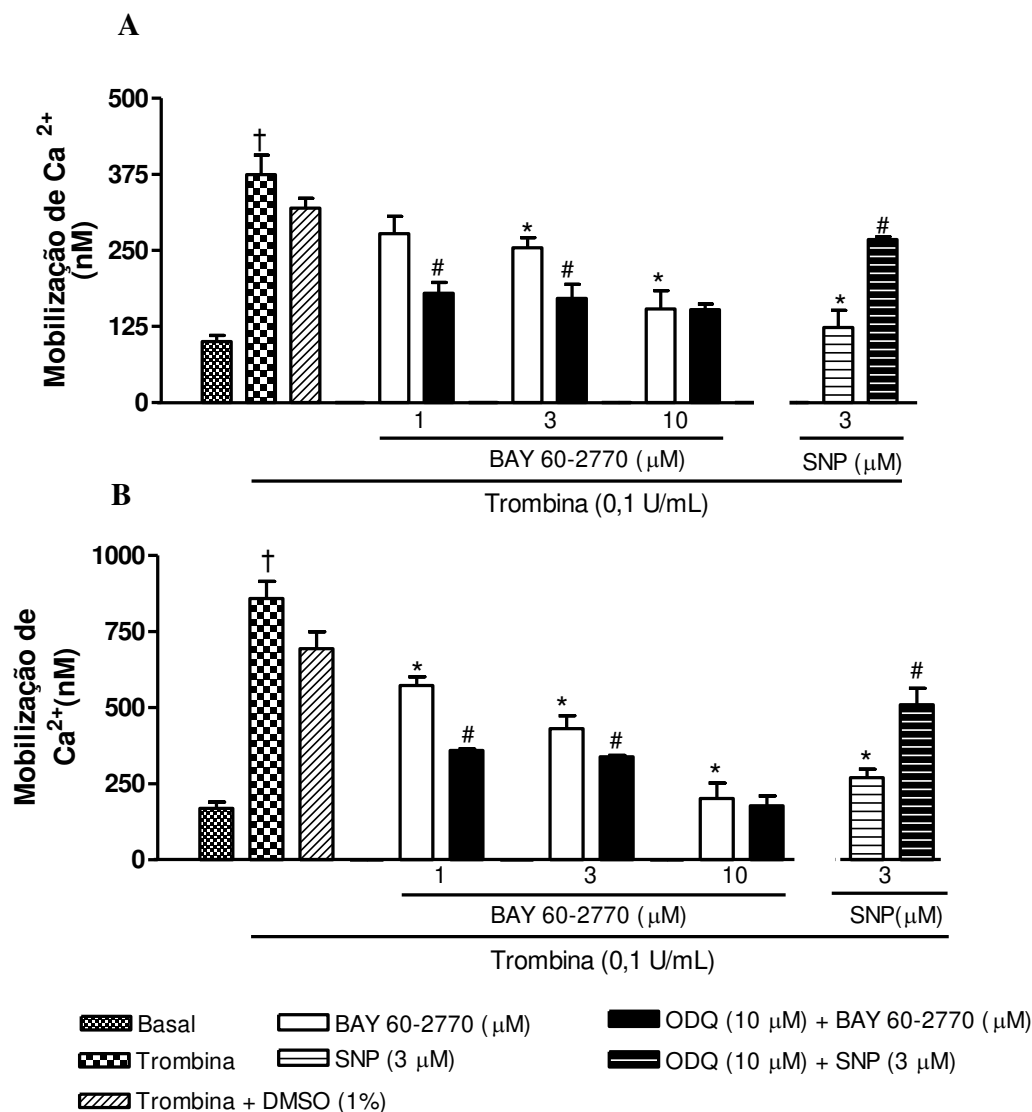


Figura 13. Efeito inibitório do BAY 60-2770 e nitroprussiato de sódio (SNP) sobre a mobilização de Ca^{2+} em plaquetas lavadas humanas estimuladas com trombina. As plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foram marcadas com o fluoróforo Fluofort (10 μM), incubados com ODQ (10 μM ; 3 min) seguida de incubação com BAY 60-2770 (1 – 10 μM) ou SNP (3 μM) por 3 min, após o qual as plaquetas foram estimuladas com trombina (0,1 U/mL). Avaliou-se tanto o influxo de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (na presença de EGTA 1 mM; A), quanto o influxo de Ca^{2+} total (na presença de Ca^{2+} ; B). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. (n = 4 - 7). * $p < 0,05$ comparado com colágeno, # $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo valor na ausência do ODQ; † $p < 0,05$ comparado com o basal.

4.4.3. Mobilização de cálcio em plaquetas incubadas com 8-Br-GMPc

Em experimentos separados, as plaquetas foram pré-incubadas com ODQ (10 μ M) ou DMSO por 3 min. Em seguida, adicionou-se o 8-Br-GMPc (100 μ M) por 20 min. Após as incubações, as plaquetas foram estimuladas com colágeno (2 μ g/mL) ou trombina (0,1 U/mL).

Na presença ou ausência do EGTA, em plaquetas estimuladas com colágeno, o 8-Br-GMPc inibiu a elevação do Ca^{2+} restaurando aos níveis basais ($p < 0,05$). Este efeito inibitório do 8-Br-GMPc não foi alterado pelo ODQ (Figura 14A, B).

Em plaquetas estimuladas com trombina, na presença ou ausência do EGTA, o 8-Br-GMPc também inibiu a mobilização intracelular de Ca^{2+} ; porém de maneira mais discreta que àquela observada com plaquetas estimuladas com colágeno ($p < 0,05$). Este efeito inibitório não foi alterado pelo ODQ (Figura 14C, D).

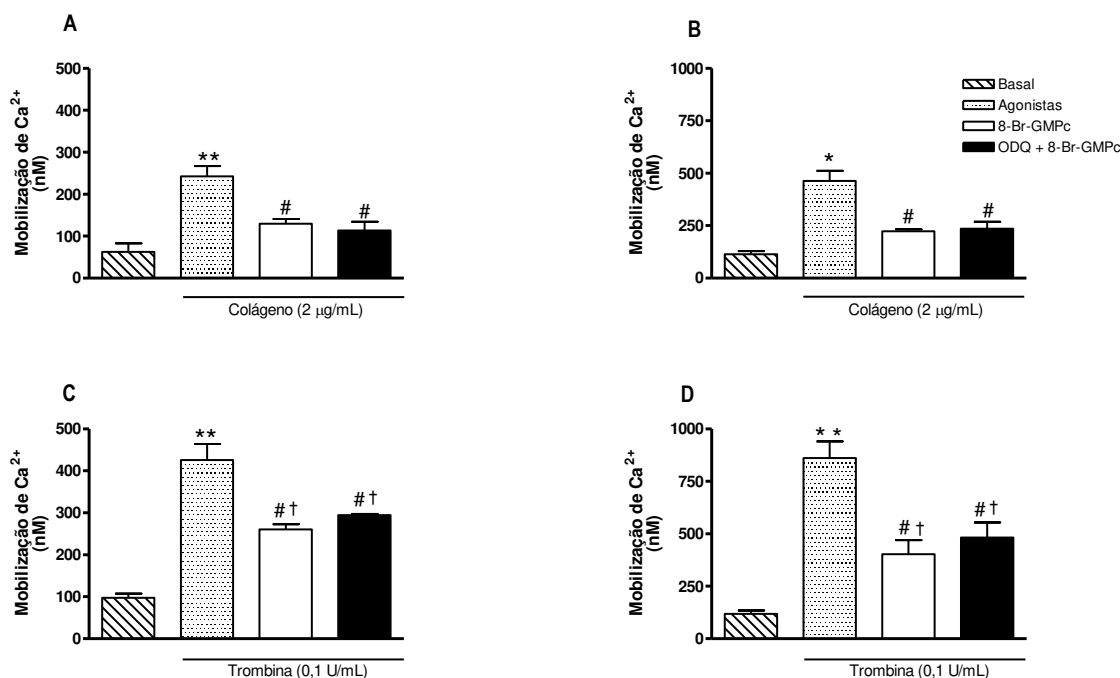


Figura 14. Efeito inibitório do 8-Br-GMPc sobre a mobilização de Ca^{2+} em plaquetas lavadas humanas estimuladas com colágeno ou trombina. As plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) foram marcadas com o fluoróforo Fluofort ($10 \mu\text{M}$). Após a incubação com ODQ ($10 \mu\text{M}$; 3 min), incubou-se com o 8-Br-GMPc ($100 \mu\text{M}$) por 20 min, quando então estimulou-se as plaquetas com colágeno ($2 \mu\text{g/mL}$; A e B) ou trombina ($0,1 \text{ U/mL}$; C e D). Avaliou-se tanto o influxo de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (na presença de EGTA 1 mM ; A e C), quanto o influxo de Ca^{2+} total (na presença de Ca^{2+} ; B e D). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. ($n = 3 - 5$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$ comparado com os valores estimulados com agonistas; # $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo valor na ausência do ODQ; † $p < 0,05$ comparado com os basais.

4.5. Análise da conformação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ através da ligação com PAC-1

A trombina ($0,1 \text{ U/mL}$) e colágeno ($2 \mu\text{g/mL}$) provocaram ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$; contudo, a trombina promoveu uma ativação mais efetiva quando comparado ao colágeno (Figuras 15 e 16).

Em plaquetas estimuladas por colágeno (2 $\mu\text{g/mL}$), a incubação com BAY 60-2770 (0,01 – 1 μM) reduziu significativamente ($p < 0,05$) a ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, sendo este efeito potencializado pelo ODQ (10 μM), como evidenciado em 0,01 μM de BAY 60-2770 (Figura 15).

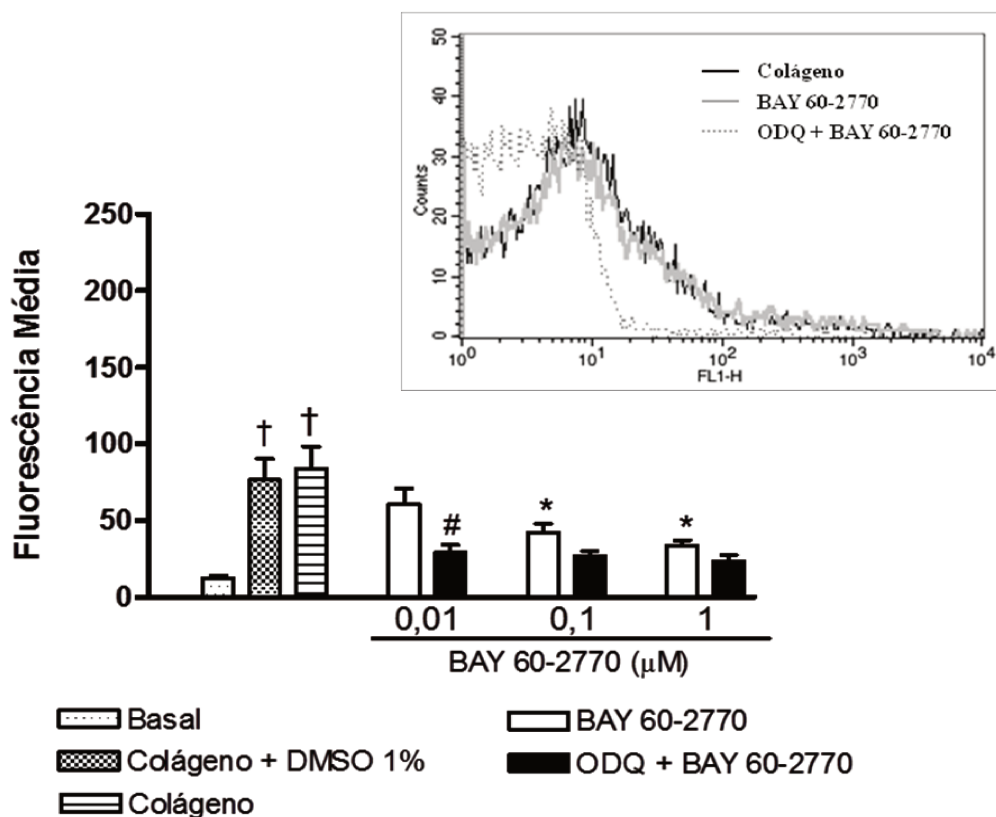


Figura 15. Efeito inibitório do BAY 60-2770 sobre a fluorescência média da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ de plaquetas lavadas estimuladas com colágeno. As plaquetas foram incubadas com ODQ (10 μM ; 3 min) seguida de incubação com o BAY 60-2770 (0,1 – 1 μM ; 3 min), e depois incubadas com o anticorpo PAC-1 (FITCPAC-1; 10 μL de 25 $\mu\text{g/mL}$) e então estimuladas com colágeno (2 $\mu\text{g/mL}$). O *inset* mostra a intensidade da fluorescência de plaquetas ativadas com colágeno na presença ou não de BAY 60-2770 (0,01 μM) e ODQ (10 μM). Os resultados estão expressos como média da fluorescência média $\pm$ E.P.M. ($n = 3 - 4$). * $p < 0,05$ comparado com os valores do colágeno; # $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo valor na ausência do ODQ; [†] $p < 0,05$ comparado com o basal.

O mesmo efeito inibitório do BAY 60-2770 (1- 10 μ M) sobre a ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ se observa em plaquetas estimuladas com trombina (0,1 U/mL). A pré-incubação das plaquetas com ODQ (10 μ M) potencializou o efeito inibitório do BAY 60-2770, como visualizado na concentração 1 μ M (Figura 16).

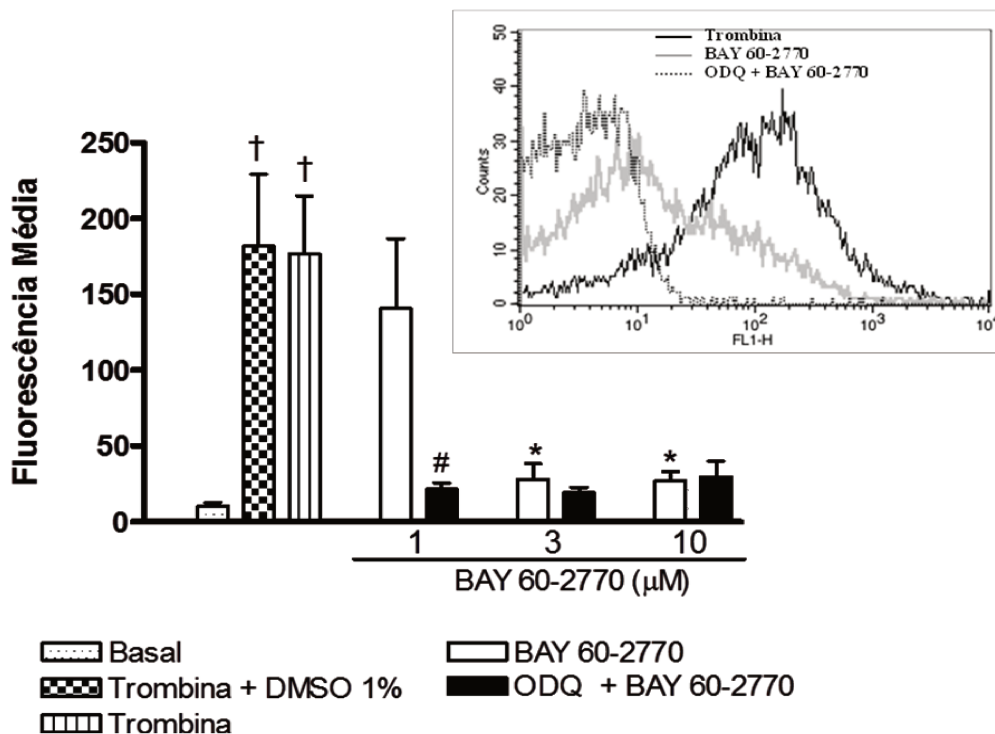


Figura 16. Efeito inibitório do BAY 60-2770 sobre a fluorescência média da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ de plaquetas lavadas estimuladas com trombina. As plaquetas foram incubadas com ODQ (10 μ M; 3 min) seguida de incubação com o BAY 60-2770 (1 – 10 μ M; 3 min), e depois incubadas com o anticorpo PAC-1 (FITCPAC-1; 10 μ L de 25 μ g/ml) e então estimulas com trombina (0,1 U/mL). O *inset* mostra a intensidade da fluorescência de plaquetas ativadas com trombina na presença ou não de BAY 60-2770 (10 μ M) e ODQ (10 μ M). Os resultados estão expressos como média da fluorescência média $\pm$ E.P.M. (n = 3 - 4). *p<0,05 comparado com os valores da trombina; #p<0,05 comparado ao seu respectivo valor na ausência do ODQ; † p<0,05 comparado com o basal.

A ligação das plaquetas ao anticorpo controle (FITC mouse IgM) não foi afetada pelo BAY 60-2770 ou ODQ (n = 3).

4.6. Expressão protéica das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs em plaquetas lavadas humanas

Estudos anteriores indicaram que a degradação da GCs induzida pela oxidação do grupamento é proeminente quando o tempo de incubação com o ODQ é superior à 120 min (Stasch e col., 2006; Hoffmann e col., 2009). Assim, em nossos ensaios, as plaquetas foram incubadas com ODQ (10 μ M) na ausência ou na presença de BAY 60-2770 (10 μ M) por 150 min. Em seguida, os níveis de proteína das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs foram determinadas por Western blotting. Amostras controle foram incubadas com 1% de DMSO (n = 4).

A incubação do BAY 60-2770 (10 μ M) não alterou significativamente os níveis protéicos das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs (Figura 17).

Na presença de ODQ, os níveis protéicos das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs foram reduzidos em 53% e 40% (p<0,05), respectivamente. A incubação com BAY 602770 preveniu a redução dos níveis protéicos para ambas as subunidades da GCs produzidos pelo ODQ (Figura 17).

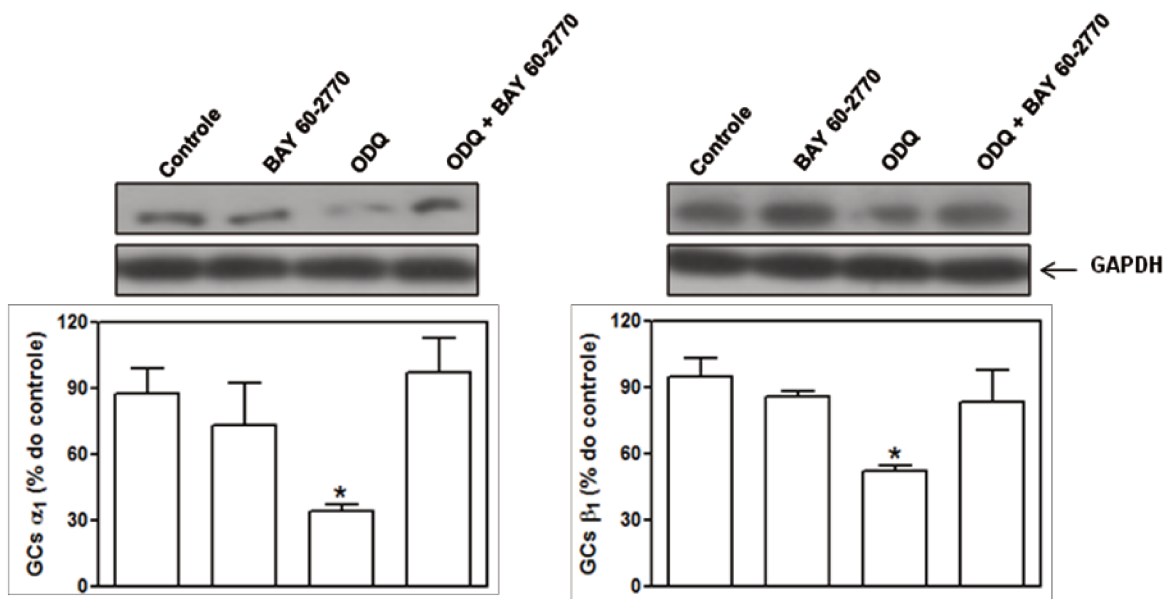


Figura 17. Efeito protetor do BAY 60-2770 sobre a degradação das subunidades da GCs pelo ODQ. As plaquetas isoladas foram incubadas com ODQ (10 μ M) na presença ou na ausência do BAY 60-2770 (10 μ M) por 150 min. A expressão protéica das subunidades α 1 e β 1 foi determinada por Western blotting. Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. (n = 4). *p<0,05 comparado com o controle.

5. *Discussão*

Alguns estudos mostram a capacidade dos ativadores da GCs ativarem esta enzima, mesmo em condições heme-oxidada ou até mesmo livre do grupamento heme. Entretanto, ainda não há nenhum estudo procurando avaliar os efeitos do ativador da GCs, BAY 60-2770, na atividade plaquetária humana. Assim, dado à ausência de estudos funcionais neste contexto, o presente trabalho propôs abordar o efeito antiplaquetário do BAY 60-2770 em plaquetas lavadas humanas em condições de heme-redução e heme-oxidação.

Em nosso estudo, o BAY 60-2770 foi aproximadamente 100 vezes mais potente em inibir a agregação plaquetária induzida pelo colágeno quando comparado com a trombina. A inibição máxima da agregação plaquetária induzida pelo colágeno foi alcançada com 0,1 μ M de BAY 60-2770, concentração 100 vezes menor que a necessária para produzir uma inibição significativa na agregação induzida por trombina (10 μ M). Este fenômeno já foi descrito para estimuladores da GCs, tais como o BAY 41-2272 e BAY 41-8543, os quais foram menos eficazes em inibir a agregação plaquetária induzida por trombina quando comparado com outros agonistas, como ADP e colágeno (Stasch e col., 2002; Roger, Badier-Commander e col., 2010).

Na ausência de oxidação do grupamento heme da GCs (plaquetas não tratadas com ODQ), observou-se aumentos similares dos níveis de GMPc, para ambos os agonistas testados, nas mesmas concentrações de BAY 60-2770. Assim, exclui-se a possibilidade de o BAY 60-2770 possuir diferentes mecanismos de inibição em resposta a diferentes agonistas. Muito provavelmente esta diferença é devido aos diferentes mecanismos de

ativação plaquetária desencadeados pela trombina e colágeno. Neste trabalho, também mostramos que o análogo de GMPc permeável à membrana, 8-Br-GMPc, produz inibição maior em plaquetas estimuladas com colágeno do que aquelas estimuladas com trombina, o que reforça a nossa sugestão.

A adesão plaquetária é considerada uma das etapas mais importantes para o processo hemostático. Defeitos genéticos (ou adquiridos) da adesão plaquetária podem comprometer seriamente o processo hemostático levando ao aumento no risco de desordens vasculares. Em nossos achados, o BAY 60-2770 foi capaz de inibir, de maneira concentração-dependente, a adesão plaquetária, sendo este efeito amplificado pelo ODQ.

De maneira geral, o colágeno ativa a glicoproteína Ia/IIa (GPIa/IIa ou integrina $\alpha_2\beta_1$) e a glicoproteína VI (GPVI) (Alberio e col., 1999; Surin e col., 2008). Por outro lado a trombina interage com os receptores acoplados à proteína G, PAR-1, PAR-2 e PAR-4, todos localizados na superfície da membrana plaquetária (Molino e col., 1997; Brass e col., 2003). Após ativação dos receptores, a PLC (ativa) cliva o PIP_2 liberando IP_3 , segundo mensageiro responsável por aumentar a concentração de Ca^{2+} citosólico a partir dos estoques intracelulares (sistema tubular denso) (Schwarz e col., 2001; Varga-Szabo e col., 2008; Varga-Szabo e col., 2009). O aumento de Ca^{2+} citosólico é o principal responsável pela a ativação plaquetária (Jardin e col., 2008; Jardin e col., 2009), contribuindo para várias etapas na ativação celular, como a reorganização do citoesqueleto de actina, necessário para o fenômeno de *shape change*, agregação, adesão e conversão da integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ de seu estado de baixa a alta afinidade (Payrastre e col., 2000; Li e col., 2010).

Para avaliar a inibição da mobilização intracelular de Ca^{2+} em plaqueta pelo BAY 60-2770, na presença ou não de ODQ, utilizamos o Fluofort, fluoróforo capaz de

permear membranas celulares e ligar-se ao Ca^{2+} , emitindo fluorescência. Ambos os agonistas testados aumentaram os níveis de Ca^{2+} , porém a trombina promoveu uma maior mobilização de Ca^{2+} , mesmo na ausência de Ca^{2+} extracelular (Krebs sem a adição de Ca^{2+} na presença de EGTA). O tratamento das plaquetas com BAY 60-2770 foi mais eficaz em inibir a mobilização intracelular de Ca^{2+} induzida por colágeno quando comparado a trombina. Portanto, em plaquetas estimuladas com colágeno, concentrações de BAY 60-2770 entre 0,01 – 1 μM foram suficientes para inibir o aumento dos níveis de Ca^{2+} , enquanto que para plaquetas estimuladas com trombina foram necessárias concentrações entre 1 – 10 μM . Vale ressaltar que somente em plaquetas estimuladas com colágeno o ativador da GCs restaurou os níveis de Ca^{2+} à sua condição basal.

O 8-Br-GMPc foi também eficaz em reduzir a mobilização intracelular de Ca^{2+} em plaquetas estimuladas com colágeno.

Como esperado, ambos os agonistas, colágeno e trombina, provocaram ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (visualizados pelo aumento da ligação de plaquetas ao anticorpo PAC-1). Esta ativação foi mais proeminente em plaquetas estimuladas por trombina. Em acordo com os outros ensaios, o BAY 60-2770 foi mais efetivo em inibir a ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ em plaquetas estimuladas com colágeno em relação às estimuladas com trombina, podendo a isto ser atribuído a maior inibição da mobilização de Ca^{2+} em plaquetas estimuladas com colágeno.

O principal pré-requisito para que a GCs seja sensível à ativação pelo NO é a presença do grupamento férrico na sua forma reduzida (Derbyshire e col., 2007; Gkaliagkousi e col., 2007; Derbyshire e col., 2012). Assim, a oxidação do grupamento heme pelo ODQ torna a GCs insensível à ativação pelo NO, prevenindo, por exemplo, o

relaxamento de diversos tipos de musculatura lisa (Baracat e col., 2003; Priviero e col., 2009; Báu e col., 2010), bem como a inibição de plaquetas pelo NO ou ao estimulador da GCs, BAY 41-2272 (Trepakova e col., 1999; Stasch e col., 2001; Roger, Badier-Commander e col., 2010).

Diferentemente do NO e dos estimuladores da GCs (BAY 41-2770 e YC-1), os ativadores da GCs, BAY 58-2667 ou BAY 60-2770, são capazes de ativar a GCs, tanto na presença do ferro oxidado ou na forma livre do grupamento heme (Stasch e col., 2006; Martin e col., 2010; Surmeli e col., 2012). Dessa forma, este trabalho, utilizou como controle positivo de ativação da GCs o doador de NO, SNP. A incubação prévia das plaquetas com o ODQ não afetou o efeito inibitório da ativação plaquetária do 8-Br-GMPc, ao passo que reverteu a ação inibitória do SNP sobre a ativação plaquetária em todos ensaios realizados (agregação, adesão, mobilização intracelular de Ca^{2+} e produção de GMPc), mostrando que tanto o tempo de incubação quanto a concentração utilizada de ODQ foi suficiente para produzir oxidação do grupamento heme da GCs plaquetária.

Ao contrário do SNP, o ODQ potencializou os efeitos inibitórios do BAY 60-2770 tanto nos ensaios funcionais (agregação e adesão) quanto nos ensaios de bioquímica molecular (produção de GMPc, mobilização intracelular de Ca^{2+} e ativação da integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$). Em concordância com estes dados, há um relato recente na literatura em plaquetas de ratos estimuladas com ADP mostrando que os efeitos antiagregantes e o aumento dos níveis de GMPc do BAY 58-2667 são aumentados pelo ODQ (Roger, Paysant e col., 2010). Outro estudo realizado em 2011 por Ahrens e colaboradores, utilizando plaquetas de pacientes com disfunção da artéria coronária, mostrou que os efeitos inibitórios sobre a

expressão da P-selectina e o aumento da fosforilação da VASP pelo BAY 58-2667 foram intensificados pelo ODQ, tanto em pacientes como no grupo controle (Ahrens e col., 2011).

Assim, a maior produção de GMPc em resposta à estimulação do BAY 60-2770 na presença do ODQ parece antagonizar mais eficientemente o aumento de Ca^{2+} nas plaquetas ativadas, causando inibição mais potente da função plaquetária. Portanto, como doenças cardiovasculares têm sido relacionadas à ativação inapropriada da GCs pelo NO endógeno devido à oxidação do grupamento heme (Stasch e col., 2006; Ahrens e col., 2011), o ativador BAY 60-2770 pode ser uma droga de grande potencial para o tratamento de doenças cardiovasculares.

A ativação plaquetária também pode ser inibida por agentes capazes de aumentar os níveis de AMPc, tais como a prostaciclina, e seu análogo estável o iloprost (Feijge e col., 2004; Smolenski e col., 2012). Um trabalho recente mostrou que o estimulador da GCs, YC-1, é capaz de ativar a via PKA, dependente de AMPc, e inibir a atividade de neutrófilos por acelerar o sequestro de Ca^{2+} intracelular (Smolenski e col., 2012). Também já foi descrito os efeitos antiproliferativos do BAY 41-2272 em células da musculatura lisa, que se faz por meio de processos dependentes de AMPc-PKA (Mendelev e col., 2009; Joshi e col., 2011). Além disso, o BAY 41-2272 foi capaz de aumentar significativamente os níveis de AMPc em neutrófilos humanos e em células humanas de linhagem mieloide, THP-1 (Thomazzi e col., 2005; Borges De Oliveira-Junior e col., 2007). No entanto, em nosso estudo, o BAY 60-2770 não alterou os níveis basais de AMPc em plaquetas lavadas humanas, excluindo quaisquer efeitos deste nucleotídeo cíclico nas respostas induzidas pelo BAY 60-2770. Nas mesmas condições experimentais, o iloprost

aumentou os níveis de AMPc, os quais foram significativamente diminuídos pelo tratamento prévio com o inibidor da adenilil ciclase, SQ-22536.

Há relatos que o aumento do estresse oxidativo associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares contribui para a oxidação e eventual perda do grupamento heme da GCs, o que torna a enzima insensível ao NO (Stasch e col., 2006; Marro e col., 2008; Meurer e col., 2009). Como exemplos, temos descrito na literatura a redução dos níveis protéicos da GCs em aorta de ratos espontaneamente hipertensos (Ruetten e col., 1999) e em coelhos hipercolesterolêmicos (Melichar e col., 2004).

Hoffmann e colaboradores (2009) mostraram que o ODQ foi capaz de reduzir os níveis protéicos das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs em linhagens de células endoteliais, sendo este efeito prevenido pelo ativador da GCs, BAY 58-2667. Neste mesmo trabalho, o BAY 58-2667 também aumentou os níveis protéicos da subunidade $\beta 1$ (mas não da $\alpha 1$) da GCs nestas células, na ausência ou na presença do ODQ (Hoffmann e col., 2009).

À semelhança do BAY 58-2667, o BAY 60-2770 parece ativar preferencialmente a GCs na forma livre de grupamento heme, protegendo contra a degradação dos níveis protéicos da enzima induzidos pela oxidação (Roy e col., 2008; Martin e col., 2010).

No presente estudo, foram avaliados os efeitos do BAY 60-2770 sobre os níveis protéicos das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs em plaquetas lavadas humanas submetidas ou não a condições heme-oxidativas. Em similaridade com os estudos apresentados, o ODQ reduziu significativamente os níveis protéicos de ambas às subunidades da GCs em plaquetas lavadas humanas, os quais foram restaurados às condições basais pela presença do BAY 60-2770.

Em resumo, este estudo mostrou que o ativador da GCs, BAY 60-2770, inibe a agregação, adesão, mobilização intracelular de Ca^{2+} e a ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ em plaquetas lavadas humanas ativadas com colágeno e trombina, através do aumento da produção de GMPc. A oxidação do grupamento heme da GCs pelo ODQ levou à superestimulação da via GCs-GMPc pelo BAY 60-2770, causando uma maior inibição da mobilização intracelular de Ca^{2+} e ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, sem o envolvimento do AMPc. O BAY 60-2770 também preveniu a diminuição dos níveis protéicos das subunidades α_1 e β_1 da GCs de plaquetas humanas provocadas pelo oxidação do grupamento heme. Assim, o BAY 60-2770 pode ser uma droga em potencial na terapêutica de doenças cardiovasculares associadas com ateromas, devido à sua relevante atividade antiplaquetária em condições de GCs heme oxidada.

6. Conclusão

1. O BAY 60-2770 diminuiu a atividade plaquetária (agregação e adesão), a mobilização intracelular de Ca^{2+} e a atividade da integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ para colágeno e trombina, devido ao aumento dos níveis de GMPc ;
2. Os efeitos antiplaquetários do BAY 60-2770 foram potencializados pelo ODQ;
3. O BAY 60-2770 não alterou a produção de AMPc ;
4. O ODQ reduziu a expressão protéica das subunidades da GCs, sendo este efeito revertido pelo BAY 60-2770.

7. Referências Bibliográficas

Abdulla, A., Awla, D., Hartman, H., Rahman, M., Jeppsson, B., Regner, S., et al. Role of platelets in experimental acute pancreatitis. *Br J Surg*. 2011;98(1):93-103.

Abrams, C. S., Ellison, N., Budzynski, A. Z., Shattil, S. J. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood*. 1990;75(1):128-38.

Acikel, S., Akdemir, R. The relationship between inflammation, platelet activation and antiplatelet resistance. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2010;9(5):364-81.

Adam, F., Guillin, M. C., Jandrot-Perrus, M. Glycoprotein Ib-mediated platelet activation. A signalling pathway triggered by thrombin. *Eur J Biochem*. 2003;270(14):2959-70.

Adam, F., Verbeuren, T. J., Fauchere, J. L., Guillin, M. C., Jandrot-Perrus, M. Thrombin-induced platelet PAR4 activation: role of glycoprotein Ib and ADP. *J Thromb Haemost*. 2003;1(4):798-804.

Agren, P., Van Der Sterren, S., Cogolludo, A. L., Frazziano, G., De Mey, J. G., Blanco, C. E., et al. Developmental changes in endothelium-dependent relaxation of the chicken ductus arteriosus. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59(1):55-76.

Ahrens, I., Habersberger, J., Baumlin, N., Qian, H., Smith, B. K., Stasch, J. P., et al. Measuring oxidative burden and predicting pharmacological response in coronary artery disease patients with a novel direct activator of haem-free/oxidised sGC. *Atherosclerosis*. 2011;208(2):412-4.

Alberio, L., Dale, G. L. Review article: platelet-collagen interactions: membrane receptors and intracellular signalling pathways. *European Journal of Clinical Investigation*. 1999;29(12):1066-76.

Ashavaid, T. F., Todur, S. P., Kondkar, A. A., Nair, K. G., Shalia, K. K., Dalal, J. J., et al. Platelet polymorphisms: frequency distribution and association with coronary artery disease in an Indian population. *Platelets*. 2011;22(2):85-91.

Bakry, R., Sayed, D., Galal, H., Shaker, S. Platelet function, activation and apoptosis during and after apheresis. *Ther Apher Dial*. 2010;14(5):457-64.

Baracat, J. S., Teixeira, C. E., Okuyama, C. E., Priviero, F. B., Faro, R., Antunes, E., et al. Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol*. 2003;477(2):163-9.

Báu, F. R., Monica, F. Z., Priviero, F. B., Baldissera, L., Jr., De Nucci, G., Antunes, E. Evaluation of the relaxant effect of the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in isolated detrusor smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 2010;637(1-3):171-7.

Bellavite, P., Andrioli, G., Guzzo, P., Arigliano, P., Chirumbolo, S., Manzato, F., et al. A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates. *Anal Biochem*. 1994;216(2):444-50.

Bergmeier, W., Stefanini, L. Novel molecules in calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2009;7 (Suppl 1):187-90.

Berridge, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol*. 2008;586(Pt 21):5047-61.

Berridge, M. J., Bootman, M. D., Roderick, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(7):517-29.

Blockmans, D., Deckmyn, H., Vermyn, J. Platelet activation. *Blood Rev.* 1995;9(3):143-56.

Bodie, S. L., Ford, I., Greaves, M., Nixon, G. F. Thrombin-induced activation of RhoA in platelet shape change. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;287(1):71-6.

Borges De Oliveira-Junior, E., Thomazzi, S. M., Rehder, J., Antunes, E., Condino-Neto, A. Effects of BAY 41-2272, an activator of nitric oxide-independent site of soluble guanylate cyclase, on human NADPH oxidase system from THP-1 cells. *Eur J Pharmacol.* 2007;567(1-2):43-9.

Bouchard, B. A., Catcher, C. S., Thrash, B. R., Adida, C., Tracy, P. B. Effector cell protease receptor-1, a platelet activation-dependent membrane protein, regulates prothrombinase-catalyzed thrombin generation. *J Biol Chem.* 1997;272(14):9244-51.

Brass, L. F. Thrombin and platelet activation. *Chest.* 2003;124(3 Suppl):18S-25S.

Calvete, J. J. Platelet integrin GPIIb/IIIa: structure-function correlations. An update and lessons from other integrins. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999;222(1):29-38.

Chen, L. Y., Mehta, J. L. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996;27(1):154-8.

Chernovets, T. S., Mazhul, V. N. [Mechanisms of the protease-induced aggregation of human platelets]. *Biofizika.* 2007;52(4):674-80.

Clark, E. A., Brugge, J. S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science.* 1995;268(5208):233-9.

Cohen, S., Braiman, A., Shubinsky, G., Isakov, N. Protein kinase C- θ in platelet activation. *FEBS Lett.* 2011;585(20):3208-15.

Danielewski, O., Schultess, J., Smolenski, A. The NO/cGMP pathway inhibits Rap 1 activation in human platelets via cGMP-dependent protein kinase I. *Thromb Haemost.* 2005;93(2):319-25.

Derbyshire, E. R., Marletta, M. A. Butyl isocyanide as a probe of the activation mechanism of soluble guanylate cyclase. Investigating the role of non-heme nitric oxide. *J Biol Chem.* 2007;282(49):35741-8.

Derbyshire, E. R., Marletta, M. A. Structure and Regulation of Soluble Guanylate Cyclase. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:533-59.

Dickinson, N. T., Jang, E. K., Haslam, R. J. Activation of cGMP-stimulated phosphodiesterase by nitroprusside limits cAMP accumulation in human platelets: effects on platelet aggregation. *Biochem J.* 1997;323 (Pt 2):371-7.

Do Ceu Monteiro, M., Sansonetty, F., Goncalves, M. J., O'connor, J. E. Flow cytometric kinetic assay of calcium mobilization in whole blood platelets using Fluo-3 and CD41. *Cytometry.* 1999;35(4):302-10.

Evgenov, O. V., Pacher, P., Schmidt, P. M., Hasko, G., Schmidt, H. H., Stasch, J. P. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(9):755-68.

Fälker K, H. L., Gunnarsson P, Nylander M, Lindahl Tl, Grenegård M. Protease-activated receptor 1 (PAR1) signalling desensitization is counteracted via PAR4 signalling in human platelets. *Biochem J.* . 2011;436:469–80.

Feijge, M. A., Ansink, K., Vanschoonbeek, K., Heemskerk, J. W. Control of platelet activation by cyclic AMP turnover and cyclic nucleotide phosphodiesterase type-3. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(8):1559-67.

Gandhi, P. S., Chen, Z., Appelbaum, E., Zapata, F., Di Cera, E. Structural basis of thrombin-protease-activated receptor interactions. *IUBMB Life*. 2011;63(6):375-82.

Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C. L., Nielsen, E. B., Schmidt, K., Mayer, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol*. 1995;48(2):184-8.

Gkaliagkousi, E., Ritter, J., Ferro, A. Platelet-derived nitric oxide signaling and regulation. *Circ Res*. 2007;101(7):654-62.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985;260(6):3440-50.

Harper, M. T., Molkentin, J. D., Poole, A. W. Protein kinase C α enhances sodium-calcium exchange during store-operated calcium entry in mouse platelets. *Cell Calcium*. 2010;48(6):333-40.

Hartwig, J. H., Barkalow, K., Azim, A., Italiano, J. The elegant platelet: signals controlling actin assembly. *Thromb Haemost*. 1999;82(2):392-8.

Hoffmann, L. S., Schmidt, P. M., Keim, Y., Schaefer, S., Schmidt, H. H., Stasch, J. P. Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation. *Br J Pharmacol*. 2009;157(5):781-95.

Holmsen, H., Weiss, H. J. Secretable storage pools in platelets. *Annu Rev Med*. 1979;30:119-34.

Horstrup, K., Jablonka, B., Honig-Liedl, P., Just, M., Kochsiek, K., Walter, U. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem*. 1994;225(1):21-7.

Jantzen, H. M., Gousset, L., Bhaskar, V., Vincent, D., Tai, A., Reynolds, E. E., et al. Evidence for two distinct G-protein-coupled ADP receptors mediating platelet activation. *Thromb Haemost.* 1999;81(1):111-7.

Jardin, I., Lopez, J. J., Pariente, J. A., Salido, G. M., Rosado, J. A. Intracellular calcium release from human platelets: different messengers for multiple stores. *Trends Cardiovasc Med.* 2008;18(2):57-61.

Jardin, I., Lopez, J. J., Redondo, P. C., Salido, G. M., Rosado, J. A. Store-operated Ca^{2+} entry is sensitive to the extracellular Ca^{2+} concentration through plasma membrane STIM1. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793(10):1614-22.

Jones, A. W., Durante, W., Korthuis, R. J. Heme oxygenase-1 deficiency leads to alteration of soluble guanylate cyclase redox regulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;335(1):85-91.

Joshi, C. N., Martin, D. N., Fox, J. C., Mendelev, N. N., Brown, T. A., Tulis, D. A. The soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 inhibits vascular smooth muscle growth through the cAMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent protein kinase pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;339(2):394-402.

Kim, S., Foster, C., Lecchi, A., Quinton, T. M., Prosser, D. M., Jin, J., et al. Protease-activated receptors 1 and 4 do not stimulate G(i) signaling pathways in the absence of secreted ADP and cause human platelet aggregation independently of G(i) signaling. *Blood.* 2002;99(10):3629-36.

Knorr, A., Hirth-Dietrich, C., Alonso-Alija, C., Harter, M., Hahn, M., Keim, Y., et al. Nitric oxide-independent activation of soluble guanylate cyclase by BAY 60-2770 in experimental liver fibrosis. *Arzneimittelforschung.* 2008;58(2):71-80.

Lessiani, G., Vazzana, N., Cuccurullo, C., Di Michele, D., Laurora, G., Sgro, G., et al. Inflammation, oxidative stress and platelet activation in aspirin-treated critical limb ischaemia: beneficial effects of iloprost. *Thromb Haemost.* 2011;105(2):321-8.

Levy-Toledano, S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a 'hierarchy'? *Haemostasis.* 1999;29(1):4-15.

Li, L., Hsu, A., Moore, P. K. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation--a tale of three gases! *Pharmacol Ther.* 2009;123(3):386-400.

Li, Z., Delaney, M. K., O'brien, K. A., Du, X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2341-9.

Lopez, J. J., Camello-Almaraz, C., Pariente, J. A., Salido, G. M., Rosado, J. A. Ca²⁺ accumulation into acidic organelles mediated by Ca²⁺- and vacuolar H⁺-ATPases in human platelets. *Biochem J.* 2005;390(Pt 1):243-52.

Marro, M. L., Peiro, C., Panayiotou, C. M., Baliga, R. S., Meurer, S., Schmidt, H. H., et al. Characterization of the human alpha1 beta1 soluble guanylyl cyclase promoter: key role for NF-kappaB(p50) and CCAAT-binding factors in regulating expression of the nitric oxide receptor. *J Biol Chem.* 2008;283(29):20027-36.

Martin, F., Baskaran, P., Ma, X., Dunten, P. W., Schaefer, M., Stasch, J. P., et al. Structure of cinaciguat (BAY 58-2667) bound to Nostoc H-NOX domain reveals insights into heme-mimetic activation of the soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem.* 2010;285(29):22651-7.

Massberg, S., Gruner, S., Konrad, I., Garcia Arguinzonis, M. I., Eigenthaler, M., Hemler, K., et al. Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood.* 2004;103(1):136-42.

Mehta, J. L., Chen, L. Y., Kone, B. C., Mehta, P., Turner, P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med.* 1995;125(3):370-7.

Melichar, V. O., Behr-Roussel, D., Zabel, U., Uttenthal, L. O., Rodrigo, J., Rupin, A., et al. Reduced cGMP signaling associated with neointimal proliferation and vascular dysfunction in late-stage atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(47):16671-6.

Mendelev, N. N., Williams, V. S., Tulis, D. A. Antigrowth properties of BAY 41-2272 in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009;53(2):121-31.

Meurer, S., Pioch, S., Pabst, T., Opitz, N., Schmidt, P. M., Beckhaus, T., et al. Nitric oxide-independent vasodilator rescues heme-oxidized soluble guanylate cyclase from proteasomal degradation. *Circ Res.* 2009;105(1):33-41.

Molino, M., Bainton, D. F., Hoxie, J. A., Coughlin, S. R., Brass, L. F. Thrombin receptors on human platelets. Initial localization and subsequent redistribution during platelet activation. *J Biol Chem.* 1997;272(9):6011-7.

Moncada, S., Palmer, R. M., Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):109-42.

O'brien, K. A., Stojanovic-Terpo, A., Hay, N., Du, X. An important role for Akt3 in platelet activation and thrombosis. *Blood.* 2011;118(15):4215-23.

Obergfell, A., Eto, K., Mocsai, A., Buensuceso, C., Moores, S. L., Brugge, J. S., et al. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with α IIb β 3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 2002;157(2):265-75.

Pankey, E. A., Bhartiya, M., Badejo, A. M., Jr., Haider, U., Stasch, J. P., Murthy, S. N., et al. Pulmonary and systemic vasodilator responses to the soluble guanylyl cyclase activator,

BAY 60-2770, are not dependent on endogenous nitric oxide or reduced heme. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(3):H792-802.

Payrastre, B., Missy, K., Trumel, C., Bodin, S., Plantavid, M., Chap, H. The integrin alpha IIb/beta 3 in human platelet signal transduction. *Biochem Pharmacol.* 2000;60(8):1069-74.

Peerschke, E. I. Maintenance of GPIIb-IIIa avidity supporting "irreversible" fibrinogen binding is energy-dependent. *J Lab Clin Med.* 1999;134(4):398-404.

Priora, R., Margaritis, A., Frosali, S., Coppo, L., Summa, D., Di Giuseppe, D., et al. In vitro inhibition of human and rat platelets by NO donors, nitrosoglutathione, sodium nitroprusside and SIN-1, through activation of cGMP-independent pathways. *Pharmacol Res.* 2011;64(3):289-97.

Priviero, F. B., Zemse, S. M., Teixeira, C. E., Webb, R. C. Oxidative stress impairs vasorelaxation induced by the soluble guanylyl cyclase activator BAY 41-2272 in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2009;22(5):493-9.

Pyriochou, A., Beis, D., Koika, V., Potytarchou, C., Papadimitriou, E., Zhou, Z., et al. Soluble guanylyl cyclase activation promotes angiogenesis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319(2):663-71.

Rendu, F., Brohard-Bohn, B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* 2001;12(5):261-73.

Ribeiro, M., Straub, V. A., Schofield, M., Picot, J., Benjamin, P. R., O'shea, M., et al. Characterization of NO-sensitive guanylyl cyclase: expression in an identified interneuron involved in NO-cGMP-dependent memory formation. *Eur J Neurosci.* 2008;28(6):1157-65.

Rink, T. J., Sage, S. O. Calcium signaling in human platelets. *Annu Rev Physiol.* 1990;52(431-49).

Roger, S., Badier-Commander, C., Paysant, J., Cordi, A., Verbeuren, T. J., Feletou, M. The anti-aggregating effect of BAY 41-2272, a stimulator of soluble guanylyl cyclase, requires the presence of nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 2010;161(5):1044-58.

Roger, S., Paysant, J., Badier-Commander, C., Cordi, A., Verbeuren, T. J., Feletou, M. Anti-aggregating effect of BAY 58-2667, an activator of soluble guanylyl cyclase. *Vascul Pharmacol.* 2010;53(5-6):281-7.

Roy, B., Halvey, E. J., Garthwaite, J. An enzyme-linked receptor mechanism for nitric oxide-activated guanylyl cyclase. *J Biol Chem.* 2008;283(27):18841-51.

Ruetten, H., Zabel, U., Linz, W., Schmidt, H. H. Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.* 1999;85(6):534-41.

Savage, B., Shattil, S. J., Ruggeri, Z. M. Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 1992;267(16):11300-6.

Schafer, A. I., Alexander, R. W., Handin, R. I. Inhibition of platelet function by organic nitrate vasodilators. *Blood.* 1980;55(4):649-54.

Schmidt, H. H., Schmidt, P. M., Stasch, J. P. NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(191):309-39.

Schmidt, K., Schrammel, A., Koesling, D., Mayer, B. Molecular mechanisms involved in the synergistic activation of soluble guanylyl cyclase by YC-1 and nitric oxide in endothelial cells. *Mol Pharmacol.* 2001;59(2):220-4.

Schmidt, P. M., Schramm, M., Schroder, H., Wunder, F., Stasch, J. P. Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem.* 2004;279(4):3025-32.

Schrammel, A., Behrends, S., Schmidt, K., Koesling, D., Mayer, B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol.* 1996;50(1):1-5.

Schwarz, U. R., Walter, U., Eigenthaler, M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol.* 2001;62(9):1153-61.

Shattil, S. J. Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb Haemost.* 1999;82(2):318-25.

Shattil, S. J., Ginsberg, M. H., Brugge, J. S. Adhesive signaling in platelets. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6(5):695-704.

Shattil, S. J., Kashiwagi, H., Pampori, N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood.* 1998;91(8):2645-57.

Smolenski, A. Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2012;10(2):167-76.

Smolenski, A., Bachmann, C., Reinhard, K., Honig-Liedl, P., Jarchau, T., Hoschuetzky, H., et al. Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem.* 1998;273(32):20029-35.

Stasch, J. P., Alonso-Alija, C., Apeler, H., Dembowsky, K., Feurer, A., Minuth, T., et al. Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. *Br J Pharmacol.* 2002;135(2):333-43.

Stasch, J. P., Becker, E. M., Alonso-Alija, C., Apeler, H., Dembowsky, K., Feurer, A., et al. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature.* 2001;410(6825):212-5.

Stasch, J. P., Hobbs, A. J. NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(191):277-308.

Stasch, J. P., Schmidt, P. M., Nedvetsky, P. I., Nedvetskaya, T. Y., H, S. A., Meurer, S., et al. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest*. 2006;116(9):2552-61.

Surin, W. R., Barthwal, M. K., Dikshit, M. Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. *Thromb Res*. 2008;122(6):786-803.

Surmeli, N. B., Marletta, M. A. Insight into the rescue of oxidized soluble guanylate cyclase by the activator cinaciguat. *Chembiochem*. 2012;13(7):977-81.

Thomazzi, S. M., Moreira, J., De Nucci, G., Antunes, E. Inhibitory effects on human eosinophil chemotaxis in vitro by BAY 41-2272, an activator of nitric oxide-independent site of soluble guanylate cyclase. *Biochem Pharmacol*. 2005;69(6):875-82.

Trepakova, E. S., Cohen, R. A., Bolotina, V. M. Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase-dependent refilling of Ca^{2+} stores. *Circ Res*. 1999;84(2):201-9.

Unsworth, A. J., Smith, H., Gissen, P., Watson, S. P., Pears, C. J. Submaximal inhibition of protein kinase C restores ADP-induced dense granule secretion in platelets in the presence of Ca^{2+} . *J Biol Chem*. 2011;284(24): 21073-82.

Varga-Szabo, D., Authi, K. S., Braun, A., Bender, M., Ambily, A., Hassock, S. R., et al. Store-operated Ca^{2+} entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1. *Pflugers Arch*. 2008;457(2):377-87.

Varga-Szabo, D., Braun, A., Nieswandt, B. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2009;7(7):1057-66.

Wilhelm, B., Siess, W. Activation of the cloned platelet thrombin receptor decreases the pertussis-toxin-dependent ADP-ribosylation of the membrane and soluble inhibitory guanine-nucleotide-binding-alpha proteins. Inhibition by the prostacyclin analog, iloprost. *Eur J Biochem.* 1993;216(1):81-8.

8. Anexos

8.1. Protocolo (n.º 487/2011) – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Humana.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 28/06/11
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 487/2011 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0418.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "EFEITO DO BAY 41-2272 E BAY 60-2770 NA FUNÇÃO PLAQUETÁRIA HUMANA, ESTIMULADORES DIRETO DA GUANILIL CICLASE SOLÚVEL INDEPENDENTE DE ÓXIDO NÍTRICO".
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Camila Bitencourt Mendes
INSTITUIÇÃO: Departamento de Farmacologia/FCM/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 06/06/2011
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 28/06/12 (O formulário encontra-se no site acima).

II – OBJETIVOS.

Identificar os mecanismos inibitórios do BAY 42-2272 na adesão e agregação de plaquetas humanas e verificar se o BAY 60-2770 possui ou não atividade anti-agregante.

III – SUMÁRIO.

Será coletado sangue venoso de 30 voluntários sadios e será estudada a ação antiplaquetária do BAY 60-2770, além de testes com o mesmo material para explorar o mecanismo de ação do BAY 41-2272.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após análise crítica do protocolo não encontramos riscos ou prejuízos para os sujeitos da pesquisa (possibilidade e gravidade). Os autores do projeto se mostram com o compromisso de cumprir as exigências da Resolução 196/96 e suas complementares. O trabalho está elaborado dentro das normas éticas e científicas. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é adequado.

V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

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 (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

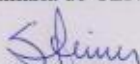
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e 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. Em caso de projeto 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 (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de junho de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

8.2. Termo de consentimento livre e esclarecido (modelo)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

EFEITO DO BAY 60-2770, ATIVADOR DA GUANILIL CICLASE SOLÚVEL INDEPENDENTE DE ÓXIDO NÍTRICO, NA FUNÇÃO PLAQUETÁRIA HUMANA

Identificação do voluntário:

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

O abaixo assinado,

_____, RG _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do coordenador deste, Dr. Edson Antunes, do departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. O abaixo assinado está ciente que

1. O objetivo do estudo é investigar os efeitos induzidos pelo BAY 60-2770 na agregação e na adesão plaquetária, bem como o mecanismo de ação envolvido nestas respostas.

2. A participação neste estudo é voluntária e a recusa não terá qualquer prejuízo.

3. A participação neste estudo não tem nenhum benefício terapêutico ao participante.

4. Será coletado da veia do braço 60 mL de sangue. A coleta será feita por profissional treinado e todo material utilizado será estéril e descartável. Os riscos são mínimos, mas caso haja algum problema, será atendido pelo médico responsável e encaminhado ao serviço de Pronto Socorro da Unidade Hospitalar da Unicamp, se necessário.

5. As informações e os resultados obtidos no decorrer do estudo serão secretos, zelando-se pela privacidade do voluntário. Seu nome, ou do seu protocolo de pesquisa, ou qualquer identificação pessoal, não serão utilizados nesse estudo e, portanto não será incluído em qualquer resultado ou publicação resultante deste.

6. Será garantida a cada participante uma cópia do TCLE.

Nome e Assinatura do Participante

Nome e Assinatura do Responsável

Maiores esclarecimentos sobre este estudo poderão ser obtidos com:

Camila B. M. Silvério ou Dr. Edson Antunes

Departamento de Farmacologia, FCM; UNICAMP CP6111

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