



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS



JULIA MODESTO VICENTE

**MODULAÇÃO DA AGREGAÇÃO E ADESÃO PLAQUETÁRIA PELA  
AGOMELATINA: PAPEL DOS RECEPTORES DE MELATONINA MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub>**

CAMPINAS – SP

2022

JULIA MODESTO VICENTE

**MODULAÇÃO DA AGREGAÇÃO E ADESÃO PLAQUETÁRIA PELA  
AGOMELATINA: PAPEL DOS RECEPTORES DE MELATONINA MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub>**

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

ORIENTADOR: PROF. DR. GABRIEL FORATO ANHÊ

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA JULIA MODESTO VICENTE E ORIENTADA PELO  
PROF. DR. GABRIEL FORATO ANHÊ

CAMPINAS – SP

2022

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Patricia de Paula Ravaschio - CRB 8/6426

V662m Vicente, Julia Modesto, 1996-  
Modulação da agregação e adesão plaquetária pela agomelatina : papel dos receptores de melatonina MT1/MT2 / Julia Modesto Vicente. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Gabriel Forato Anhô.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Receptores de melatonina. 2. Agomelatina. 3. Agregação plaquetária. 4. Antidepressivos. I. Anhô, Gabriel Forato, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Modulation of platelet aggregation and adhesion by agomelatine : role of melatonin receptors MT1/MT2

**Palavras-chave em inglês:**

Receptors, Melatonin

Agomelatine

Platelet aggregation

Antidepressive agents

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Mestra em Farmacologia

**Banca examinadora:**

Gabriel Forato Anhô [Orientador]

Nicola Amanda Conran Zorzetto

Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader

**Data de defesa:** 09-11-2022

**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0087-5758>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2008613303864949>

---

# **COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**JULIA MODESTO VICENTE**

---

**ORIENTADOR: PROF. DR. GABRIEL FORATO ANHÊ**

---

## **MEMBROS TITULARES:**

**1. PROF. DR. GABRIEL FORATO ANHÊ**

**2. PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO**

**3. PROF. DR. FERNANDO RODRIGUES DE MORAES ABDULKADER**

---

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

**Data de Defesa: 09/11/2022**

---

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família – especialmente minha mãe – por todo o incentivo e investimento em mim. Obrigada por todo amor e compreensão: isto me fez correr atrás dos meus sonhos, mesmo quando eles não faziam o menor sentido.

Agradeço aos meus amigos do laboratório por todos os momentos que passamos juntos. Obrigada por caminharem ao meu lado durante este percurso.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Gabriel Forato Anhô, por ter me aceitado como aluna de iniciação científica logo que iniciei a graduação, em 2015. No decorrer destes anos, aprendi muito e ganhei oportunidades que nunca imaginaria ter. Obrigada por acreditar no meu potencial.

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Farmacologia. Sem seu trabalho, a realização de nenhum projeto de pesquisa seria possível.

Agradeço à agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2019/19488-0) pelo financiamento para execução deste estudo.

O presente trabalho foi realizado também com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Que a beleza do que você ama seja o que você faz.”*

**Rūmī**

## RESUMO

Diversos estudos têm apontado a depressão como fator de risco independente para o surgimento de doenças cardiovasculares. Uma das razões para essa correlação consiste na exacerbação da atividade plaquetária observada em pacientes diagnosticados com Distúrbio Depressivo Maior (DDM). Dentre as possibilidades terapêuticas, a agomelatina (Valdoxan®), uma droga com propriedades melatoninérgicas, é uma opção no tratamento do DDM. Seu diferencial consiste na propriedade agonista sobre receptores MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub> e, em paralelo, bloqueio de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2C</sub>. Apesar de existirem relatos de que a agregação plaquetária é inibida pela melatonina e potencializada pela serotonina, não foi estabelecido se a agomelatina é capaz de interferir em parâmetros funcionais de plaquetas. Assim, esse estudo tem como objetivo analisar se a agomelatina possui a capacidade de inibir a atividade plaquetária e se estes possíveis efeitos são decorrentes da ativação de receptores MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub>. Amostras de sangue venoso de voluntários sadios, de 18 a 60 anos, de ambos os sexos, foram processadas para obtenção plasma rico em plaquetas (PRP) e plaquetas lavadas (PL) para a execução de ensaios de viabilidade celular, agregação plaquetária induzida por diversos agonistas, quantificação da produção de tromboxano, mobilização de cálcio intracelular, quantificação de nucleotídeos cíclicos intracelulares, adesão plaquetária estática, mudança de conformação da integrina GPIIb/IIIa ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3) e expressão de p-selectina. Amostras de sangue de camundongos isogênicos C57BL6J foram utilizadas para ensaios de agregação plaquetária e adesão para fins comparativos. Os resultados obtidos indicaram que a agomelatina reduz a adesão ao fibrinogênio, bem como a agregação plaquetária, produção de tromboxano, mobilização de cálcio e expressão de p-selectina, todos estes induzidos por ácido araquidônico, ao passo que aumentou os níveis intracelulares de AMPc. Esta ação é possivelmente dependente de receptores melatoninérgicos, visto que a utilização de antagonistas MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> impediu este efeito. Conclui-se que utilização da agomelatina mostra-se promissora na prevenção de eventos cardiovasculares decorrentes da disfunção plaquetária.

**Palavras-chave:** receptores de melatonina; agomelatina; agregação plaquetária.

## ABSTRACT

Several studies have pointed to depression as an independent risk factor for the onset of cardiovascular diseases. One of the reasons for this correlation is the exacerbation of platelet activity observed in patients diagnosed with Major Depressive Disorder (MDD). Among the therapeutic possibilities, agomelatine (Valdoxan®), a drug with melatonergic properties, is an option in the treatment of DDM. Its differential consists of the agonist property on MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors and, in parallel, blockade of serotonergic 5-HT<sub>2C</sub> receptors. Although there are reports that platelet aggregation is inhibited by melatonin and potentiated by serotonin, it has not been established whether agomelatine is capable of interfering with platelet functional parameters. Thus, this study aims to analyze whether agomelatine could inhibit platelet activity and whether these possible effects are due to the activation of MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> receptors. Venous blood samples from healthy volunteers, aged 18 to 60 years, of both sexes, were processed to obtain platelet-rich plasma (PRP) and washed platelets (PL) for cell viability assays, platelet aggregation induced by several agonists, quantification of thromboxane production, intracellular calcium mobilization, quantification of intracellular cyclic nucleotides, static platelet adhesion, GPIIb/IIIa (αIIbβ3) integrin conformation change and p-selectin expression. Blood samples from C57BL6J isogenic mice were used for platelet aggregation and adhesion assays for comparative purposes. The results obtained indicated that agomelatine reduces fibrinogen adhesion, as well as platelet aggregation, thromboxane production, calcium mobilization and p-selectin expression, all of which are induced by arachidonic acid, while increasing intracellular levels of cAMP. This action is possibly dependent on melatonergic receptors, as the use of MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> antagonists prevented this effect. It is concluded that the use of agomelatine shows promise in the prevention of cardiovascular events resulting from platelet dysfunction.

**Keywords:** receptors, melatonin; agomelatine; platelet aggregation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Viabilidade celular -----	31
Figura 2: Agregação plaquetária estimulada por ácido araquidônico -----	32
Figura 3: Agregação plaquetária estimulada por adenosina difosfato (ADP) -----	34
Figura 4: Agregação plaquetária estimulada por colágeno -----	35
Figura 5: Agregação plaquetária estimulada por U-46619 -----	36
Figura 6: Agregação plaquetária estimulada por epinefrina -----	37
Figura 7: Agregação plaquetária estimulada por trombina -----	38
Figura 8: Agregação plaquetária estimulada por ácido araquidônico em amostras incubadas com luzindole -----	40
Figura 9: Agregação plaquetária estimulada por ácido araquidônico em amostras incubadas com 4-P-PDOT -----	41
Figura 10: Agregação plaquetária estimulada por colágeno em amostras incubadas com luzindole -----	42
Figura 11: Agregação plaquetária estimulada por colágeno em amostras incubadas com 4-P-PDOT -----	43
Figura 12: Produção de tromboxano B <sub>2</sub> estimulado por ácido araquidônico -----	44
Figura 13: Produção de tromboxano B <sub>2</sub> estimulado por colágeno -----	45
Figura 14: Mobilização intracelular de cálcio estimulada por ácido araquidônico em amostras incubadas com luzindole -----	46
Figura 15: Mobilização intracelular de cálcio estimulada por ácido araquidônico em amostras incubadas com 4-P-PDOT -----	47
Figura 16: Mobilização intracelular de cálcio estimulada por colágeno em amostras incubadas com luzindole -----	47
Figura 17: Mobilização intracelular de cálcio estimulada por colágeno em amostras incubadas com 4-P-PDOT -----	48
Figura 18: Quantificação de nucleotídeos cíclicos intracelulares em amostras estimuladas por ácido araquidônico -----	50
Figura 19: Quantificação de nucleotídeos cíclicos intracelulares em amostras estimuladas por colágeno -----	51

Figura 20: Adesão plaquetária estática ao fibrinogênio de amostras incubadas com agomelatina 2 $\mu$ M-----	52
Figura 21: Adesão plaquetária estática ao fibrinogênio de amostras incubadas com agomelatina 100 $\mu$ M-----	53
Figura 22: Adesão plaquetária estática ao colágeno de amostras incubadas com agomelatina 2 $\mu$ M-----	53
Figura 23: Adesão plaquetária estática ao colágeno de amostras incubadas com agomelatina 100 $\mu$ M-----	54
Figura 24: Integrina GPIIb/IIIa ( $\alpha$ IIb $\beta$ ) ativada -----	55
Figura 25: Expressão de P-Selectina -----	56
Figura 26: Agregação plaquetária em amostras de C57BL6J estimuladas por ácido araquidônico -----	58
Figura 27: Agregação plaquetária em amostras de C57BL6J estimuladas por colágeno	58
Figura 28: Agregação plaquetária em amostras de C57BL6J estimuladas com ácido araquidônico e incubadas com luzindole -----	59
Figura 29: Agregação plaquetária em amostras de C57BL6J estimuladas com ácido araquidônico e incubadas com 4-P-PDOT -----	60
Figura 30: Agregação plaquetária em amostras de C57BL6J estimuladas com colágeno e incubadas com luzindole-----	60
Figura 31: Agregação plaquetária em amostras de C57BL6J estimuladas com colágeno e incubadas com 4-P-PDOT -----	61
Figura 32: Adesão plaquetária estática ao fibrinogênio de amostras incubadas com agomelatina 2 $\mu$ M-----	62
Figura 33: Adesão plaquetária estática ao fibrinogênio de amostras incubadas com agomelatina 100 $\mu$ M-----	63
Figura 34: Adesão plaquetária estática ao colágeno de amostras incubadas com agomelatina 2 $\mu$ M-----	63
Figura 35: Adesão plaquetária estática ao colágeno de amostras incubadas com agomelatina 100 $\mu$ M-----	64

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

5-HT	- Serotonina
5-HTP	- 5-hidroxitriptofano
$\mu\text{g}$	- Micrograma
$\mu\text{L}$	- Microlitro
AMPc	- Adenosina monofosfato cíclica
ADP	- Adenosina difosfato
ATP	- Adenosina trifosfato
$\text{Ca}^{2+}$	- Cálcio
CEMIB	- Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEUA	- Comissão de tica no uso animal
COVID-19	- <i>Coronavirus Disease 2019</i>
COX-1	- Ciclooxygenase-1
CREB	- Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico ( <i>cAMP responsive element binding protein</i> )
DAC	- Doença arterial coronariana
DAG	- Diacilglicerol
DCV	- Doença cardiovascular
DDC	- L-aminoácido aromático descarboxlase
DDM	- Distúrbio depressivo maior
DTS	- Sistema tubular denso ( <i>Dense tubular system</i> )
FvW	- Fator de von Willebrand
GPCR	- Receptor acoplado  proteína G ( <i>protein G coupled receptor</i> )
IAM	- Infarto agudo do miocárdio
IP3	- Inositol-1,4,5-trisfosfato
ISRS	- Inibidor seletivo da recaptação de serotonina
Kg	- Quilograma
mg	- Miligrama
mL	- Mililitro

n	- Número amostral
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PC $\gamma$ 2	- Fosfoquinase C $\gamma$ 2
PgG2	- Prostaglandina G2
PgH2	- Prostaglandina H2
PIP2	- 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	- Proteína quinase A
PKC	- Proteína quinase C
PL	- Plaquetas lavadas
PLC	- Fosfolipase C ( <i>phospholipase C</i> )
PRP	- Plasma rico em plaquetas
PPP	- Plasma pobre em plaquetas
ROCE	- <i>Receptor-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry</i>
S1P	- Esfingosina-1-fosfato
SEM	- Erro Padrão da Média
SMOCE	- <i>Second Messenger-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry</i>
SOCE	- <i>Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry</i>
STIM1	- Molécula 1 de Interação Estromal ( <i>Stromal interaction molecule 1</i> )
Syk	- Tirosina quinase esplênica ( <i>spleen tyrosine kinase</i> )
THP	- Triptofano hidroxilase
TxA <sub>2</sub>	- Tromboxano A <sub>2</sub>
TxB <sub>2</sub>	- Tromboxano B <sub>2</sub>
UI	- Unidades Internacionais
Unicamp	- Universidade Estadual de Campinas
VPM	- Volume plaquetário médio
vs.	- Versus

## LISTA DE SIMBOLOS

°C	- Graus celsius
=	- Igual
+	- Mais
±	- Mais ou menos
<	- Menor
/	- Por
%	- Porcentagem
°, <sup>a</sup>	- Símbolo para numeração ordinal
α	- Alpha
δ	- Delta
®	- Referência

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>Distúrbio Depressivo Maior .....</b>	16
<b>Plaquetas.....</b>	17
<b>Alterações Plaquetárias em Pacientes com DDM .....</b>	18
<b>Tratamento Farmacológico.....</b>	19
<b>Melatonina .....</b>	20
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>Estudo clínico em humanos.....</b>	24
1. <i>Casística .....</i>	24
2. <i>Coleta e processamento do sangue .....</i>	24
3. <i>Medida de viabilidade celular.....</i>	25
4. <i>Medida de agregação plaquetária .....</i>	25
5. <i>Quantificação de produção de tromboxano B<sub>2</sub> .....</i>	26
6. <i>Mensuração de cálcio intracelular ([Ca<sup>2+</sup>] i).....</i>	26
7. <i>Quantificação de AMPc e GMPc intracelulares.....</i>	27
8. <i>Medida de adesão plaquetária estática.....</i>	27
9. <i>Determinação das mudanças de conformação de integrina GPIIb/IIIa (αIIbβ).....</i>	28
10. <i>Determinação da expressão de P-Selectina .....</i>	29
<b>Modelo animal.....</b>	29
11. <i>Coleta e processamento do sangue .....</i>	29
12. <i>Medida de agregação plaquetária .....</i>	30
13. <i>Medida de adesão plaquetária estática.....</i>	30
<b>Análise estatística.....</b>	30
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>Estudo clínico em humanos.....</b>	31
14. <i>Medida de viabilidade celular.....</i>	31
15. <i>Medida de agregação plaquetária .....</i>	31

16. <i>Quantificação de produção de tromboxano B2</i> .....	44
17. <i>Mensuração de cálcio intracelular (<math>[Ca^{2+}]_i</math>)</i> .....	45
18. <i>Quantificação de AMPc e GMPc intracelulares</i> .....	49
19. <i>Medida de adesão plaquetária estática</i> .....	52
20. <i>Determinação das mudanças de conformação de integrina GPIIb/IIIa (<math>\alpha IIb\beta</math>)</i> .....	54
21. <i>Determinação da expressão de P-Selectina</i> .....	56
<b>Modelo animal</b> .....	57
22. <i>Medida de agregação plaquetária</i> .....	57
23. <i>Medida de adesão plaquetária estática</i> .....	62
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>66</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>75</b>

# INTRODUÇÃO

## **Distúrbio Depressivo Maior**

Dados recentes apresentados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) salientam a preocupante prevalência – e aumento contínuo – de transtornos mentais na população mundial. Dentre os diagnósticos mais recorrentes, a depressão é o distúrbio mais notificado e incapacitante (1,2)

Caracterizada como uma doença crônica, o transtorno depressivo é marcado pelo rebaixamento do humor, redução da energia e diminuição das atividades diárias, perda de interesse ou prazer, diminuição da capacidade de concentração, surgimento de fadiga importante, perda da autoestima e da autoconfiança, sentimento recorrente de culpa e/ou de indignidade. Além disso, a depressão é comumente acompanhada de sintomas físicos, como, por exemplo, alterações no padrão de sono, lentidão psicomotora importante, perda de peso e perda da libido (2).

Em 2020, estimou-se que cerca de 193 milhões de pessoas ao redor do mundo haviam sido diagnosticadas com o distúrbio depressivo maior (DDM), modalidade mais estudada do transtorno depressivo, que é descrita como um ou mais episódios depressivos em menos de duas semanas. Entretanto, levantamentos mais recentes demonstraram que este número aumentou em até 25% por conta dos impactos causados pela pandemia de COVID-19, como isolamento social e estresse constante (3,4).

Estas estatísticas apresentam um alarmante problema de saúde pública, visto que o DDM está intimamente relacionado a redução da qualidade de vida, além de mostrar-se como um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças como osteoporose (5), agravamento da asma (6) e da dor crônica (7), diabetes (8), doença arterial coronariana (DAC) (9) e outras doenças cardiovasculares (DCV) (10,11).

De fato, a conexão entre a depressão e o aparecimento/exacerbação de condições que afetam negativamente os vasos sanguíneos e coração já é bem documentada na literatura. O DDM foi elencado como principal fator de risco para o primeiro infarto agudo do miocárdio (IAM) em indivíduos isentos de outras comorbidades (10,12,13). Também foi observado que a morte por isquemia cardíaca é quase 3 vezes mais frequente em indivíduos depressivos e que esta condição mental dobra as chances de eventos cardíacos isquêmicos quando comparada com fatores tradicionalmente relacionados a estes, como hipertensão, diabetes e dislipidemia (12–14).

Uma das explicações para a associação entre consiste na alteração da atividade plaquetária dos pacientes depressivos.

### **Plaquetas**

Plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados encontrados no sangue que são produzidas na medula óssea a partir de megacariócitos, com vida útil média de 10 dias. Em seu citoplasma, são encontradas moléculas de actina, miosina e trombostenina, que são proteínas com propriedades contráteis; retículo endoplasmático (sistema tubular denso – DTS) e complexo de Golgi, responsáveis pela síntese de enzimas e armazenamento de íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), respectivamente; mitocôndrias; grânulos  $\alpha$ , que contém fibrinogênio, fibronectina, fatores de coagulação V e VIII, fator 4 plaquetário (ligante de heparina) e fatores de crescimento; grânulos  $\delta$ , também conhecido como grânulos densos, que armazenam adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), histamina e serotonina (5-HT). A função principal das plaquetas é promover a hemostasia, função primordial para evitar a perda sanguínea após lesão vascular, através da ativação, adesão e agregação plaquetária (15–17).

Em condições fisiológicas, o endotélio vascular libera diversas substâncias capazes de inibir a adesão plaquetária. A principal é o óxido nítrico, que atua indiretamente no decaimento do influxo de cálcio e, conseqüentemente, mantém as plaquetas inativas. Em situações patológicas, como a deformação, oclusão parcial ou inflamação dos vasos, o endotélio torna-se deficiente e incapaz de produzir óxido nítrico na proporção adequada para impedir a ativação e adesão plaquetária (17–19).

Já são conhecidos importantes agonistas que estimulam a agregação plaquetária. Os fatores com a maior capacidade de promover uma resposta agregante estão envolvidos na própria cascata de coagulação, como o Fator IIa (Trombina) e o colágeno, vastamente encontrado na matriz extracelular. Outros componentes armazenados nos grânulos plaquetários, como o ADP e a serotonina, atuam como agentes secundário na agregação plaquetária: quando associados entre si ou com outro fator de coagulação, como o colágeno, mostram-se como potencializadores da agregação plaquetária (20,21). De maneira geral, os fenômenos que levam à atividade das plaquetas são regulados pelas concentrações de cálcio livre no citoplasma: o aumento do cálcio intracelular ocasionado pelos agonistas plaquetários promove a ativação, adesão e agregação de plaquetas (17,20,22).

Outro notável componente estrutural de plaquetas são glicoproteínas, encontradas entre as membranas celulares, com propriedades adesivas. São encontrados diversos tipos destes receptores na superfície plaquetária, porém o complexo GPIIb/IIIa – também conhecido como integrina  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 – é o mais abundante. A ativação desta glicoproteína, seja pela sinalização *inside-out* ou *outside-in*, promove, em última análise, a reorganização do citoesqueleto da plaqueta, resultando em adesão e agregação plaquetária (23,24).

É interessante destacar que a via *inside-out* pode ser desencadeada pelo aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, causado por uma série de fatores solúveis como ADP, epinefrina ou tromboxano  $\text{A}_2$  ou fatores imobilizados como colágeno complexado com fator de von Willebrand (FvW). O aumento de cálcio intracelular desencadeado por estes estímulos ativa uma via dependente de proteína quinase C (PKC), que resulta na transição da  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 para o estado de alta afinidade (24,25). Por outro lado, a sinalização *outside-in* é disparada, especificamente, pela ligação dos domínios extracelulares da integrina ao fibrinogênio, o que leva a ativação da tirosina quinase esplênica (Syk) e fosfolipase  $\text{C}\gamma 2$  (PLC $\gamma 2$ ) (26,27).

#### **Alterações Plaquetárias em Pacientes com DDM**

Quando analisadas as descrições da função plaquetária de indivíduos depressivos na literatura, são encontrados estudos que detectaram exacerbações na ativação e agregação plaquetária, bem como um aumento no volume plaquetário médio (VPM) nesta população. Em comparação com amostras de voluntários saudáveis, as plaquetas de pessoas acometidas pela depressão apresentaram mudanças nas conformações da integrina  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 após desafio ortostático, isto é, passagem do decúbito dorsal horizontal para posição ortostática. Além disso, foram necessárias menores concentrações de colágeno para promover agregação plaquetária no grupo com o diagnóstico psiquiátrico (28).

Curiosamente, os mesmos padrões anormais foram constatados na população pediátrica com depressão: crianças, com idades entre 9 e 15 anos, que apresentavam diagnóstico atual de depressão obtiveram uma resposta agregatória exacerbada ao estímulo de ADP ou colágeno. Além disso, o VPM destes indivíduos era maior do que o do grupo controle, ou seja, crianças sem histórico de doença mental (29).

Dois outros estudos detectaram aumento na expressão de glicoproteínas (GPIb e GP IIb/IIIa – integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ <sub>3</sub>) em diagnosticados com depressão, mesmo sem a presença de estímulos agregantes. Além disso, também se constatou que as plaquetas de indivíduos depressivos excitavam fatores como  $\beta$ -tromboglobulina, fator plaquetário 4 (PF4) e P-selectina em maiores quantidades do que amostras de pessoas saudias (30–32).

Ainda que as alterações supracitadas sejam relevantes para a fisiopatologia de doenças cardiovasculares na população diagnosticada com DDM, uma certa ênfase é dada ao papel da 5-HT neste contexto.

Estudos apresentaram evidências de que plaquetas de pessoas depressivas apresentavam até 1,5 vezes mais serotonina, livre no plasma ou estocada nos grânulos  $\delta$ , do que indivíduos saudáveis. Além da maior densidade de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub> e maior reatividade frente a este estímulo, também foram destacadas alterações na mobilização intracelular de cálcio incitadas pela presença de serotonina. O conjunto destes achados foi elencado como relevantes para justificar as disfunções plaquetárias encontradas no transtorno depressivo, entretanto, o mecanismo que causa estas mudanças ainda não é claro (33–37) .

### **Tratamento Farmacológico**

Atualmente, na clínica psiquiátrica, a classe de medicamentos mais utilizada no tratamento do DDM são os antidepressivos inibidores seletivos da recaptção de 5-HT (ISRS).

Há certa unanimidade entre as pesquisas ao atribuem um efeito antiagregante ao consumo destes fármacos. De forma geral, este fenômeno foi relacionado com a depleção da serotonina estocada em plaquetas circulantes, o que ocasionou a diminuição da agregação plaquetária frente à agonistas como ADP e colágeno em pacientes cronicamente tratados com fármacos dessas classes (38–40). Apesar de incitar um bom prognóstico para o tratamento de depressão e, concomitantemente, exercer um efeito protetor em relação às complicações cardiovasculares, os ISRS apresentam diversos efeitos colaterais, como agitação, irritabilidade, náusea, vertigem, distúrbios sensoriais e problemas no sono, além de provocarem sangramentos anormais nos usuários crônicos (41,42).

Neste contexto, o fármaco antidepressivo agomelatina (Valdoxan ®), um antagonista serotoninérgico desenvolvido originalmente para o tratamento para distúrbios

do sono, foi descrito como alternativa à medicação clássica adotada em distúrbios de humor. Esse fármaco apresenta uma curta meia vida (1-2 horas) e baixa biodisponibilidade – cerca de 5%, porém, quando comparado com a paroxetina, um ISRS, a agomelatina foi capaz de melhorar o quadro de depressão de maneira mais efetiva e, concomitantemente, reduzir sintomas de ansiedade (43–45).

Apesar de ainda resultar de estudos com tamanho amostral pequeno, uma meta-análise recente aponta que a agomelatina tem um potencial para ser usada também em distúrbio de ansiedade generalizada. Neste caso, seu potencial foi similar ao da sertralina, fluoxetina e bupirona (46). Além disso, uma recente revisão publicada no *Lancet* mostra que, quando comparada a outros 20 antidepressivos, a agomelatina figura entre um dos que apresenta maior taxa de aceitabilidade pelo paciente (47).

Do ponto de vista de seu mecanismo de ação, um estudo conduzido em roedores demonstrou que a agomelatina é capaz de bloquear receptores de 5-TH<sub>2c</sub> no córtex pré-frontal e hipocampo, regiões conhecidas por controlar o comportamento social e reações emocionais (45,48). Como a atividade destes receptores mostrou-se aumentada em indivíduos depressivos, seu bloqueio desempenha um papel chave no mecanismo de ação desta droga no tratamento da depressão (49). A afinidade da agomelatina pelos receptores 5-TH<sub>2B</sub> também contribui no seu sucesso no tratamento de quadros depressivos (44,50).

Dado o exposto acima, poder-se-ia admitir, em princípio, que a agomelatina teria um potencial antiagregante baixo, uma vez que não foi descrita afinidade deste fármaco por receptores serotoninérgicos 5-TH<sub>2A</sub>, aqueles predominantes na resposta agregante plaquetária (51).

Por outro lado, o que torna a agomelatina singular frente a outros fármacos antidepressivos é justamente sua capacidade de ativar receptores de melatonina MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub> (48,52). Um estudo recente de cristalografia publicado na *Nature* mostra que os sítios de interação da agomelatina com o MT<sub>1</sub> são similares aos de outros agonistas do receptor como a iodomelatonina e a ramelteona (53).

## **Melatonina**

Caracterizada em 1958, a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um neuro-hormônio produzido majoritariamente pela glândula pineal e secretado de maneira rítmica, durante a noite – ou períodos de ausência de luz – em vertebrados. Sua biossíntese ocorre através da hidroxilação do aminoácido triptofano pela enzima triptofano

hidroxilase (THP), gerando 5-hidroxitriptofano (5-HTP) e, após ação da L-aminoácido aromático descarboxilase (DDC), resulta em serotonina (54,55).

A função principal deste hormônio é a regulação de ritmos circadianos, tais como o ciclo vigília/sono, entretanto já foram descritas atuações positivas deste hormônio em doenças hepáticas (56), obesidade (57,58), câncer (59) e doenças cardiovasculares (60,61).

Embora diversos trabalhos já tenham correlacionado a redução na melatonina sérica com a incidência de doença arterial coronariana (61), hipertensão (62) e infarto agudo do miocárdio (63), não é um consenso o papel deste hormônio na agregação plaquetária. São encontrados estudos que atribuem à melatonina capacidade direta de reduzir a agregação plaquetária induzida por colágeno e ácido araquidônico (64,65) e a contagem de plaquetas circulantes (66). *In vivo*, foi demonstrado que a melatonina reduz a ativação plaquetária estimulada pelo modelo de isquemia e reperfusão (67).

Estes efeitos atribuídos à melatonina possivelmente surgem em decorrência da ativação dos receptores de melatonina, visto que este hormônio não apresenta grande afinidade por outros sítios de ligação. Os principais – e farmacologicamente mais relevantes – receptores melatoninérgicos encontrados em mamíferos são MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>. Embora ambos sejam acoplados à proteína G (GPCR), a formação estrutural e mecanismo de ativação são ligeiramente diferentes (68).

O receptor MT<sub>1</sub> é composto por 350 aminoácidos e é vastamente encontrado no sistema nervoso central, em regiões do sistema límbico, retina, vasos sanguíneos e no sistema tegumentar humano. Quando ativado pela melatonina, este receptor pode acoplar-se tanto a G<sub>i</sub> (proteínas sensíveis à toxina *pertussis*) quanto G<sub>q/11</sub>, resultando na inibição de adenilato ciclase e, conseqüentemente, impedindo a formação de AMPc. A redução da atividade da proteína quinase A (PKA) também foi atribuída a ativação deste receptor, o que atenua a fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB)(68,69).

Composto por 362 aminoácidos, o receptor MT<sub>2</sub> é predominantemente encontrado na retina. Sua presença no núcleo supraquiasmático, osteoblastos e vasos sanguíneos também já foi descrita. Além de gerar redução dos níveis de AMPc intracelulares, a ativação deste receptor é igualmente capaz de reduzir os níveis de GMPc, através da

inibição da guanilato ciclase, bem como aumentar a ação da fosfoquinase C (PKC) (68,70,71).

Camundongos knockout para receptores MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub> apresentam uma supressão do ritmo circadiano das concentrações circulantes de esfingosina-1-fosfato (S1P) – metabólitos diretos resultantes da catabolização de esfingolipídio, cuja função descrita é mensageiro secundário na sinalização intracelular – e uma redução nas concentrações matinais deste metabólito (72,73). Como foi recentemente descrito que o S1P é capaz de reduzir a ativação plaquetária mediada por colágeno, é possível que os receptores de melatonina interfiram na agregação plaquetária de maneira indireta via controle das concentrações de S1P (74).

Embora parte das referências que estudem a ação da melatonina em plaquetas afirme que estas expressem receptores melatoninérgicos, evidências para tanto são indiretas, tais como o bloqueio da ação da melatonina por ensaios de *binding assay* usando iodomelatonina marcada com 2-[<sup>125</sup>I]-melatonina ou com a adição de antagonistas de receptores MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub> (75,76).

A partir deste compilado de informações, faz-se necessário investigar o potencial antiagregante da agomelatina via agonismo de receptores melatoninérgicos, uma vez que esta capacidade pode se mostrar benéfica na prevenção de eventos cardiovasculares em indivíduos depressivos.

## OBJETIVOS

Analisar a capacidade da agomelatina de alterar a atividade plaquetária frente à estímulos agregantes.

### Objetivos secundários

1. Determinar se a agomelatina modula a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico, ADP, colágeno, epinefrina, trombina ou U-46619 em plasma rico em plaquetas (PRP) e plaquetas lavadas (PL);
2. Avaliar se a modulação da agregação plaquetária causada pela agomelatina é impedida por antagonistas de receptores melatoninérgicos MT<sub>1</sub> (luzindole) e MT<sub>2</sub> (4-PPDOT);
3. Determinar se a agomelatina modula a adesão plaquetária estática em fibrinogênio ou colágeno;
4. Avaliar se a agomelatina promove modulação nas concentrações intracelulares de AMPc e GMPc em plaquetas;
5. Determinar se a agomelatina é capaz de modular a produção de tromboxano B<sub>2</sub> em plaquetas estimuladas por ácido araquidônico ou colágeno;
6. Avaliar se a modulação da agregação plaquetária causada pela agomelatina é acompanhada por mudanças de conformação em integrinas plaquetárias GIIb/IIIa ( $\alpha$ IIb $\beta$ );
7. Determinar se a agomelatina modula a expressão de p-selectina em plaquetas lavadas (PL) estimuladas por ácido araquidônico ou colágeno;
8. Determinar se a agomelatina promove alterações na concentração de cálcio ([Ca<sup>+2</sup>]) intracelular em plaquetas lavadas (PL);

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Estudo clínico em humanos**

#### *Casuística*

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP – Certificado de Apresentação de Apreciação Ética nº 20454419.0.0000.5404 (Anexo 1)

Foram incluídos voluntários adultos, entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos, que não apresentavam histórico de doença cardiovascular (aqui, definidos como episódio de infarte agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico isquêmico ou hemorrágico, síndrome coronariana e insuficiência cardíaca) e que não tivessem feito uso de medicamentos dentro de 10 dias antes da coleta de sangue.

Antes da coleta de sangue, o voluntário foi convidado a ler e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, documento que apresenta os objetivos do estudo, bem como os riscos e benefícios da participação neste.

#### *Coleta e processamento do sangue*

Através de uma venopunção periférica utilizando um SCALP calibre 21G, amostras de sangue foram coletadas.

Após a coleta, o sangue foi transferido para um tubo do tipo Falcon de 15 mL contendo solução ACD-C (contendo ácido cítrico 132 mM, citrato trissódico 126mM, glicose 111mM) ou citrato de trissódio 3,8%, na proporção de nove partes de sangue para uma parte de anticoagulante. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido após a centrifugação a 150 x g, em temperatura ambiente (25°C) durante 25 minutos. O sobrenadante correspondendo ao PRP foi transferido para outro tubo do tipo Falcon limpo e o sangue remanescente foi novamente centrifugado à 400 x g, temperatura ambiente durante 10 minutos, para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP).

As plaquetas lavadas (PL) foram obtidas a partir da centrifugação do PRP provindo da homogeneização com a solução ACD-C a 400 x g em temperatura ambiente por 10 minutos. O pellet plaquetário resultante foi cuidadosamente ressuspensionado em 2 mL de solução de Krebs-Ringer (cloreto de sódio 118 mM, carbonato de sódio 25 mM, glicose 5.6 mM, cloreto de potássio 2.8 mM, fosfato de potássio 1.2 mM, sulfato de magnésio 1.7 mM), a 37° C. O número de plaquetas foi ajustado de acordo com o exigido pelo protocolo de cada ensaio, através de contagem manual, utilizando-se câmara de Neubauer (77–79).

### *Medida de viabilidade celular*

Para o ensaio de viabilidade celular, 50  $\mu\text{L}$  de PL na concentração  $1,2 \times 10^8$  plaquetas/mL foram pipetados em uma placa de 96 poços (*no-binding*). Em seguida, estas amostras foram incubadas com agomelatina (Cayman Chemical; Ann Arbor, MI, EUA) nas concentrações 2, 20 e 100  $\mu\text{M}$  por 1, 3, 30 ou 60 minutos. Poços contendo PL sem tratamento foram utilizados como controle negativo e amostras acrescidas de 10  $\mu\text{L}$  de triton-x 100, controle positivo.

Na sequência, as amostras foram acrescidas de solução de Krebs-Ringer até completar o volume de 100  $\mu\text{L}$  por poço. Foram pipetados 10  $\mu\text{L}$  de solução MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA, EUA) a 5mg/mL em todos os poços do ensaio e foi feita uma incubação, a 37° C, por 3 horas.

A reação foi interrompida após este período com a adição de 100  $\mu\text{L}$  de solução de SDS a 10% em HCl 0,01M. A leitura foi feita após 1 hora de incubação, em temperatura ambiente, utilizando um espectrofotômetro de placa (Synergy™ H1 Hybrid Reader, Biotek, EUA), no comprimento de onda 490 nm (80,81).

### *Medida de agregação plaquetária*

200  $\mu\text{L}$  de solução de PRP ou PL ( $1,5 \times 10^8$  plaquetas/mL) foram pipetados em cubetas de vidro e incubados com agomelatina, nas concentrações 2, 20 ou 100  $\mu\text{M}$  por 3 minutos e/ou com antagonistas melatoninérgicos luzindole ou 4-P-PDOT (Cayman Chemical; Ann Arbor, MI, EUA), ambos a 10  $\mu\text{M}$ , por 10 minutos. A agregação plaquetária foi então realizada com um agregômetro óptico de oito canais (Platelet aggregation Profiler, 8 channel PAP-8 V2.0 optics - Bio-Data Corporation), com agitação constante e temperatura constante (37°C). O equipamento foi calibrado para 0% com PRP ou PL e 100% com PPP ou solução de Krebs-Ringer, respectivamente.

Para promover a agregação plaquetária, os estímulos utilizados foram adenosina difosfato (ADP) (Sigma Chemical; St. Louis, MO, EUA) em 10  $\mu\text{M}$ , ácido araquidônico (Sigma Chemical; St. Louis, MO, EUA) em 300  $\mu\text{M}$ , colágeno (Chrono-log Corporation; Havertown, PA, EUA) em 3  $\mu\text{g/mL}$ , epinefrina (Chrono-log Corporation; Havertown, PA, EUA) em 10  $\mu\text{M}$ , trombina (Sigma Chemical; St. Louis, MO, EUA) em 0,1 U/mL e

U46619 (Cayman Chemical; Ann Arbor, MI, EUA). em 3mg/mL. A curva de agregação foi monitorada por até 10 minutos (77–79).

#### *Quantificação de produção de tromboxano B<sub>2</sub>*

400 µL de PRP foram incubados com agomelatina e/ou antagonistas melatoninérgicos, da mesma forma descrita nos ensaios precedentes. Estas alíquotas foram transferidas para cubetas de vidro, estimuladas por ácido araquidônico ou colágeno e mantidas em agitação e temperatura constantes (37° C), por 10 minutos. Na sequência, as amostras foram centrifugadas por 400 x g, por 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi armazenado para quantificação do tromboxano B<sub>2</sub>, utilizando kit ELISA (501020, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA).

#### *Mensuração de cálcio intracelular ([Ca<sup>2+</sup>] i)*

Utilizando PRP obtido com solução de ACD-D, fluoróforo FURA2M (Sigma Chemical; St. Louis, MO, EUA). na concentração final de 1,5 µM foi incubado por 30 minutos, em temperatura ambiente. Este plasma foi centrifugado a 400 x g por 10 min, temperatura ambiente e o pellet resultante foi suavemente ressuspensão em solução de Krebs. A concentração de plaquetas foi ajustada para 1,2 x 10<sup>8</sup> plaquetas/mL e, por fim, agomelatina e/ou antagonistas melatoninérgicos foram adicionados e incubados de acordo com o que foi descrito previamente.

Da suspensão plaquetária tratada, foram pipetados 200 µL em uma placa de 96 poços (*no binding*) e, em seguida, a concentração externa de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) foi ajustada para 1 mM usando CaCl<sub>2</sub>, permitindo o repouso por 3 minutos para a estabilização dos níveis extracelulares de Ca<sup>2+</sup>. Essas amostras foram estimuladas por ácido araquidônico ou colágeno e EGTA 10 mM foi adicionado para quelar o cálcio extracelular.

A placa permaneceu sob agitação constante durante o ensaio e a fluorescência foi medida no comprimento de onda de 340 nm para excitação e detecção em 510 nm (faixa de emissão), utilizando fluorômetro (Synergy™ H1 Hybrid Reader, Biotek, EUA). Uma alíquota de PL não tratada foi acrescida de 2 µL triton-x 100 e solução de CaCl<sub>2</sub> a 1mM na concentração final e sua leitura foi considerada como fluorescência máxima (F<sub>max</sub>). Na sequência, 10µL de EGTA 10 mM e 10 µL de trisma 100 mM foram adicionados neste poço para obtenção da fluorescência mínima (F<sub>min</sub>).

A concentração de cálcio intracelular foi calculada usando a equação:

$$[Ca^{2+}]_i = kd \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

onde kd (224) é a constante de dissociação do marcador fluorescente FURA2M (77–79).

#### *Quantificação de AMPc e GMPc intracelulares*

Em cubetas de vidro, 400 µL de PRP foram incubados com 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX) a 1 mM por 20 minutos, temperatura ambiente. Em seguida, essas amostras foram acrescidas de agomelatina e/ou antagonistas melatonérgicos e, posteriormente, estimuladas por ácido araquidônico ou colágeno, da mesma maneira que foram conduzidos os ensaios anteriores. O conteúdo das cubetas foi centrifugado a 400 x g, por 15 minutos, a 4°C. O *pellet* plaquetário foi ressuspenso em 200 µL de solução gelada de HCl 0,1 M e homogeneizado por 20 minutos, em temperatura ambiente. Essas amostras foram novamente centrifugadas a 400 x g, por 30 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi armazenado para quantificação de cAMP e cGMP, utilizando kits de ELISA (581001 e 581021, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Nitroprussiato de sódio (30 µM) ou Forskolin (3 µM) foram usados como controle positivo para cGMP e cAMP, respectivamente.

#### *Medida de adesão plaquetária estática*

Uma microplaca de alta afinidade contendo 96 poços foi preparada com 50 µL de uma solução de fibrinogênio 50 µg/mL (Sigma Aldrich; St. Louis, MO, EUA) ou colágeno tipo I a 100 µg/mL (Merck; Darmstadt, Germany) e permaneceu *overnight* em geladeira. No dia seguinte, os poços foram lavados duas vezes com solução de Krebs e os sítios de ligação inespecíficos foram bloqueados por meio da adição de 100 µL por poço de uma solução de albumina sérica bovina (BSA) em 1%. Após incubação de 1h à 37 °C, a solução com BSA foi removida e a microplaca foi lavada duas vezes com 200 µL de Krebs-Ringer sem cálcio.

As plaquetas lavadas (PL) tiveram a concentração previamente ajustada para  $1,2 \times 10^8$  plaquetas/mL. Em cada poço, foram acrescentados 50 µL da suspensão de plaquetas que foram tratadas ou não com a agomelatina e/ou antagonistas melatoninérgicos. As plaquetas foram mantidas em estufa úmida à 37 °C por 30 min. Em seguida, as plaquetas não aderidas neste período foram removidas e os poços lavados duas vezes com solução de Krebs-Ringer sem cálcio. Após lavagem, nos poços contendo plaquetas aderidas,

foram mantidos 50  $\mu$ L de Krebs-Ringer sem cálcio. Os poços livres de fibrinogênio receberam 50  $\mu$ L de soluções com concentrações crescentes de plaquetas (obtidas a partir da amostra original de plaquetas lavadas não estimulada). Estes poços, em triplicata, deram origem à curva padrão, sendo a concentração mínima de  $0,3 \times 10^6$  e a máxima de  $10 \times 10^6$  plaquetas/ml. Em seguida, foram adicionados a todos os poços 150  $\mu$ L de substrato para a fosfatase ácida p-nitrofenil na concentração final de 5 mM (diluído em tampão citrato 0.1 M e triton X-100 0.1%). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora e, em seguida, 100  $\mu$ L de NaOH 2M foram adicionados em cada poço para interromper a reação. O p-nitrofenol produzido neste ensaio foi medido em um espectrofotômetro de placa (Synergy<sup>TM</sup> H1 Hybrid Reader, Biotek, EUA), a 405 nm. A adesão plaquetária, em porcentagem, foi calculada comparando os valores de absorbância das amostras com a curva padrão (78,82).

#### *Determinação das mudanças de conformação de integrina GPIIb/IIIa ( $\alpha$ IIb $\beta$ )*

200  $\mu$ L de suspensão de plaquetas em  $1,2 \times 10^8$  plaquetas/mL foram incubados com agomelatina e/ou antagonistas melatoninérgicos, de acordo com o estabelecido previamente. Depois disso, as plaquetas lavadas foram incubadas com 10  $\mu$ l de solução de PAC-1 (FITCPAC-1; 25 mg/ml - Cat. No. 340507; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) ou 10  $\mu$ l de solução de anticorpo controle (FITC mouse IgM, mesma diluição de solução de PAC-1 - Cat. No. 555782; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). Na sequência, foram pipetadas nas amostras araquidônico ácido ou colágeno e as alíquotas foram constantemente agitadas por 10 minutos, em temperatura ambiente.

A fluorescência média foi adquirida por citometria de fluxo (FACSCalibur, Cat. No. 340507; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) no canal FL1 (10.000 eventos por amostra). Os procedimentos de ajuste do citômetro incluíram a identificação de plaquetas pelos sinais de dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) em um gráfico de dispersão *dot plot*, delimitação dessa população em um *gate* específico (R1) e ajustando sua fluorescência em um histograma de escala logarítmica. Além disso, a fluorescência basal foi ajustada com uma amostra incubada com o isotipo negativo. A fluorescência média foi considerada como um parâmetro para descrever a intensidade de ligação de PAC-1 a  $\alpha$ IIb $\beta$  (77,79).

### *Determinação da expressão de P-Selectina*

Da mesma maneira que foi conduzido no ensaio de mudança de conformação de integrina, 200 µL de PL foram incubadas com 10 µl de solução de CD62P (FITC P-selectina; 0,5 mg/mL - Cat. No. 11-0628-42; Invitrogen, Waltham, MA, EUA) ou 10 µl de solução de anticorpo de controle (controle de isotipo IgG1 K de camundongo FITC, mesma diluição de solução de P-selectina - Cat. No. 555748; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). Estas amostras foram estimuladas como descrito anteriormente.

A fluorescência média também foi adquirida por citometria de fluxo. Os procedimentos de ajuste do citômetro foram os mesmos descritos no ensaio anterior. A fluorescência média foi considerada como um parâmetro para descrever a ligação do anti-CD62P à P-Selectina (77,79).

### **Modelo animal**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Protocolo nº 5533-1/2020 (**Anexo 2**).

Foram utilizados camundongos isogênicos (*mus musculus*, linhagem C57BL6J/UNIB), entre 15 e 20 semanas, de ambos os sexos. Estes animais foram mantidos em caixas individuais, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura ambiente de 22° C (com variação de  $\pm 2^\circ$  C). Todos receberam ração padronizada (Nuvilab – Nuvital Nutrientes, S.A) e água filtrada, ambos *ad libitum*. Desde que foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), estes camundongos permaneceram no Biotério do Departamento de Farmacologia da universidade supracitada até o dia da coleta de sangue.

### *Coleta e processamento do sangue*

Uma seringa de 1 mL contendo 80 µL de solução anticoagulante de citrato trissódico 10% foi acoplada a uma agulha 26G ½ (0,45 x 13 mm) e utilizada para puncionar a veia cava inferior de camundongos previamente anestesiados com isoflurano. Obtinha-se cerca de 800 µL de sangue total, que eram homogeneizados com 200 µL de solução de Krebs-Ringer a 37° C.

As amostras foram centrifugadas a 23° C, por 20 minutos, 100 x g e o sobrenadante obtido foi considerado o plasma rico em plaquetas (PRP). Em um novo tubo

plástico de 1,5 mL, foi feito um *pool* de PRP de dois animais. A contagem de plaquetas foi ajustada para  $1,5 \times 10^8$  plaquetas/mL. Às amostras sangue restante, foram adicionados 400  $\mu$ L da solução de Krebs 37° C e, posteriormente, foram centrifugadas a 23°C, por 10 minutos, 400 x g. O sobrenadante formado após a segunda centrifugação foi considerado como o plasma pobre em plaquetas (PPP)(83).

#### *Medida de agregação plaquetária*

Em uma microplaca de 96 poços (*no-binding*), 1 $\mu$ L de cálcio a 100 mM foi pipetado em determinados poços. Em seguida, 1 $\mu$ L de colágeno a 5 $\mu$ g/mL ou ácido araquidônico a 500 $\mu$ M foram pipetados nos poços que receberam cálcio. Uma parte do *pool* de PRP foi incubado agomelatina e/ou antagonistas melatoninérgicos, da mesma forma feita nos ensaios com plaquetas humanas. Após o período determinado de incubação, 100 $\mu$ L de PRP previamente tratados foram pipetados nos poços contendo colágeno ou ácido araquidônico. Poços vazios foram destinados a solução de Krebs, PRP e PPP, correspondendo ao branco, controle negativo e controle positivo, respectivamente.

A leitura foi feita a cada 30 segundos, em um espectofotômetro de placa no comprimento de onda 575nm, por 15 minutos, sob agitação orbital contínua (550 rpm – amplitude 2mm), a 37°C. Após tabulação, os valores de absorbância obtidos dos poços de controle positivo foram considerados como 100% de agregação plaquetária e os do controle negativo, 0% de agregação. A porcentagem de agregação relativa às amostras que receberam tratamento com antagonistas e/ou agomelatina foi calculada a partir da comparação com os controles (84).

#### *Medida de adesão plaquetária estática*

O ensaio de adesão plaquetária estática com amostras de camundongos foi realizado da mesma forma descrita anteriormente para plaquetas humanas.

#### **Análise estatística**

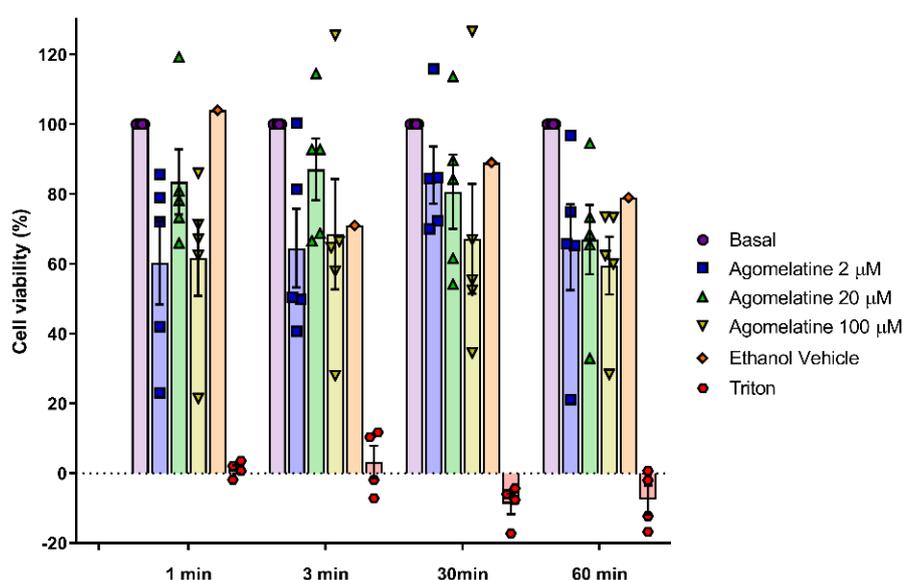
Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A distribuição paramétrica foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo *post hoc* de Tukey ou Kruskal-Wallis seguida pelo teste *post hoc* de Dunn foi aplicada para comparações de dados paramétricos e não-paramétricos, respectivamente (GraphPad Prism, version 6.01 - GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Em todos os resultados foi adotado 5% como limite de significância estatística ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Estudo clínico em humanos

#### Medida de viabilidade celular

A presença de agomelatina, em qualquer concentração, não afetou de forma significativa a viabilidade de plaquetas, independente do tempo de incubação da droga. A atividade metabólica das amostras tratadas foi semelhante à das em condição basal, ou seja, plaquetas lavadas que não sofreram intervenção alguma. Da mesma maneira, a utilização do etanol a 1% (concentração final), não promoveu expressiva morte celular, visto que a porcentagem deste grupo foi parecida com a das amostras incubadas com o antidepressivo e das controle (**Figura 1**).



**Figura 1:** Viabilidade celular (porcentagem) em amostras de PL (n=5). Valores expressos como média

A partir deste ensaio, foi possível constatar que as concentrações de agomelatina planejadas para os experimentos posteriores eram adequadas e não acarretariam prejuízo da viabilidade de plaquetas, comprometendo assim os possíveis resultados.

#### Medida de agregação plaquetária

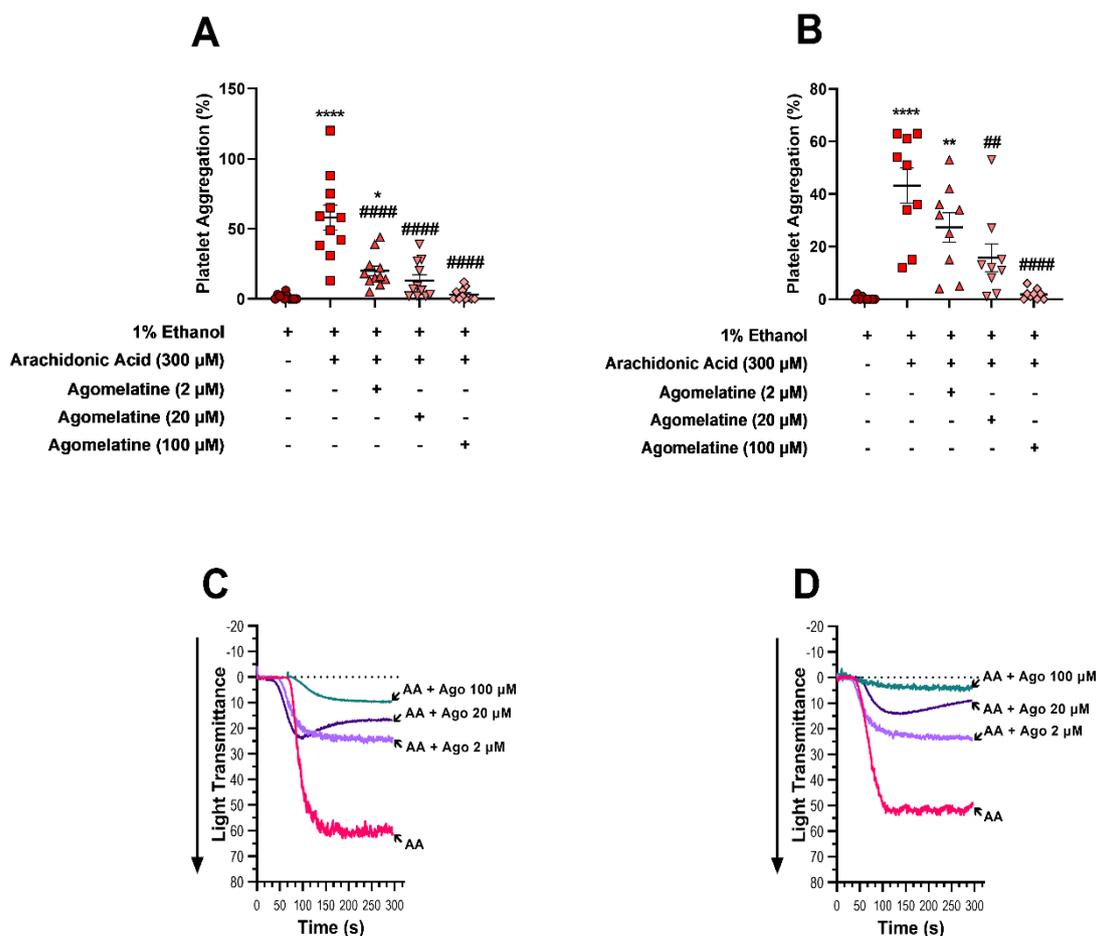
##### Estímulo: Ácido Araquidônico

A presença da agomelatina, logo na sua menor concentração, foi capaz de inibir a agregação plaquetária promovida pelo ácido araquidônico em cerca de 65%, em comparação às amostras que receberam apenas o estímulo. Da mesma forma, as concentrações de 20 e 100 μM inibiram em 75% e 95%, respectivamente, a agregação, quando comparadas ao grupo exclusivamente estimulado. Além disso, é interessante

destacar que as maiores doses do antidepressivo equipararam os valores máximos de agregação das amostras que as receberam com o grupo controle (**Figura 2 – A**).

Os ensaios com PL demonstraram que a inibição acontece, de maneira significativa, a partir da concentração 20  $\mu\text{M}$  de agomelatina, onde a redução da agregação máxima é de 65% em relação ao grupo de amostras estimuladas. Igualmente observado no experimento conduzido com PRP, as duas maiores doses do agonista melatoninérgico tornaram a agregação plaquetária nestes grupos semelhantes ao basal (**Figura 2 – B**).

Em relação ao perfil de agregação plaquetária (PAP), não foram detectadas discrepâncias entre as curvas de ambos os ensaios, indicando que a ação da agomelatina observada anteriormente não está unicamente atrelada à presença do plasma e seus componentes (**Figura 2 – C e D**).



**Figura 2:** Agregação plaquetária estimulada por ácido araquidônico apresentado em porcentagem em (A) PRP (n=11) e (B) PL (n=09) e perfil de agregação plaquetária (curvas representativas dos ensaios) em (C) PRP e (D) PL. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*  $p < 0,05$  vs. Ethanol; \*\*  $p < 0,01$  vs. Ethanol; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Ethanol; ##  $p < 0,01$  vs. Arachidonic Acid 300 $\mu\text{M}$ ; ####  $p < 0,0001$  vs. Arachidonic Acid 300 $\mu\text{M}$

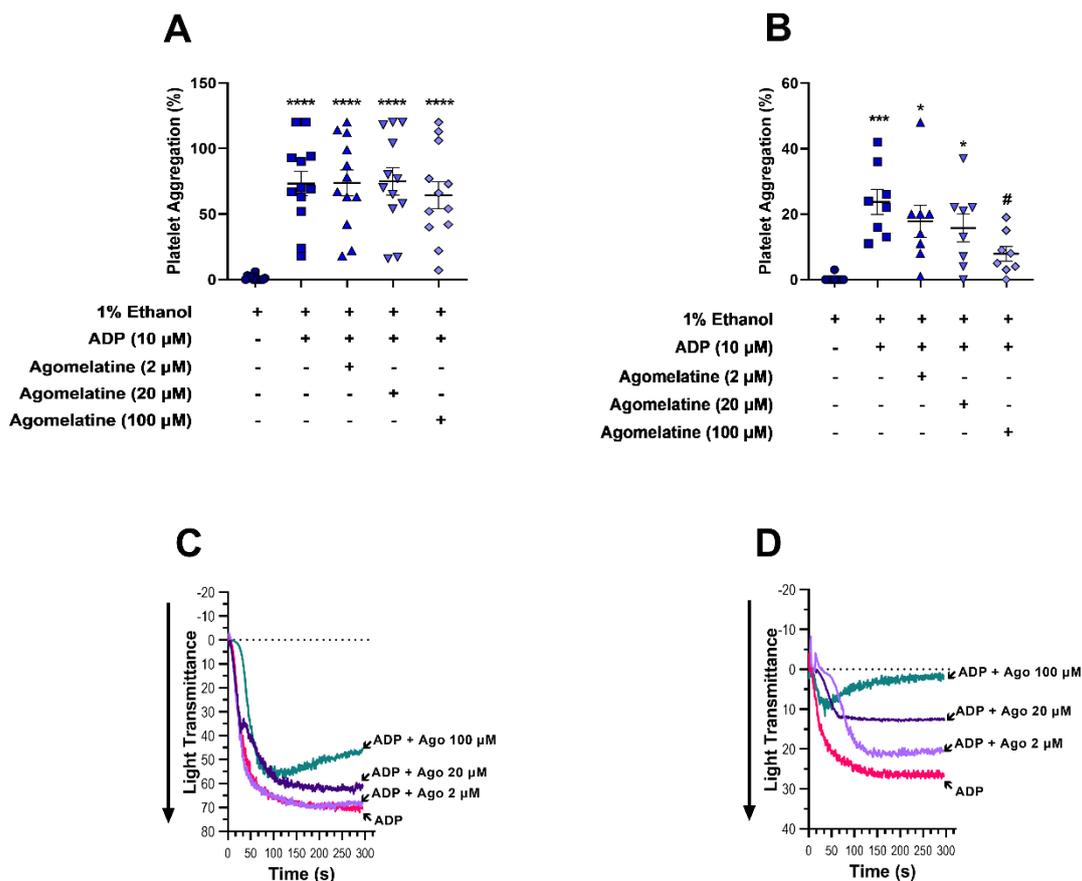
**Estímulo: ADP**

Nos ensaios com PRP, a porcentagem de agregação máxima nas amostras tratadas com agomelatina se assemelhou àquelas que foram somente estimuladas com ADP (**Figura 3 – A**).

Quando utilizado na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , o agonista melatoninérgico promoveu redução de, aproximadamente, 65% na agregação de PL estimuladas por ADP, ao passo que as duas outras concentrações usadas mantiveram a porcentagem de agregação máxima equiparada ao grupo que recebeu exclusivamente o estímulo (**Figura 3 – B**).

Seguindo o padrão descrito acima, o PAP dos experimentos que empregaram o PRP exibiu curvas de agregação semelhantes entre os grupos estimulados, independente da presença da agomelatina (**Figura 3 – C**).

Já nos ensaios com PL, há uma redução progressiva dos valores máximos atingidos pelas curvas das amostras incubadas com agomelatina, correspondente ao aumento da concentração da droga. Apesar disso, a diferenciação entre as curvas de 2 e 20  $\mu\text{M}$  não foi suficientemente significativa para impactar as médias dos grupos e divergí-las das plaquetas apenas estimuladas (**Figura 3 – D**).



**Figura 3:** Agregação plaquetária estimulada por adenosina difosfato (ADP) apresentada em porcentagem em (A) PRP (n=12) e (B) PL (n=08) e perfil de agregação plaquetária (curvas representativas dos ensaios) em (C) PRP e (D) PL. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \* p<0,05 vs. Ethanol; \*\*\* p<0,001 vs. Ethanol; \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; # p<0,05 vs. ADP 10 $\mu$ M.

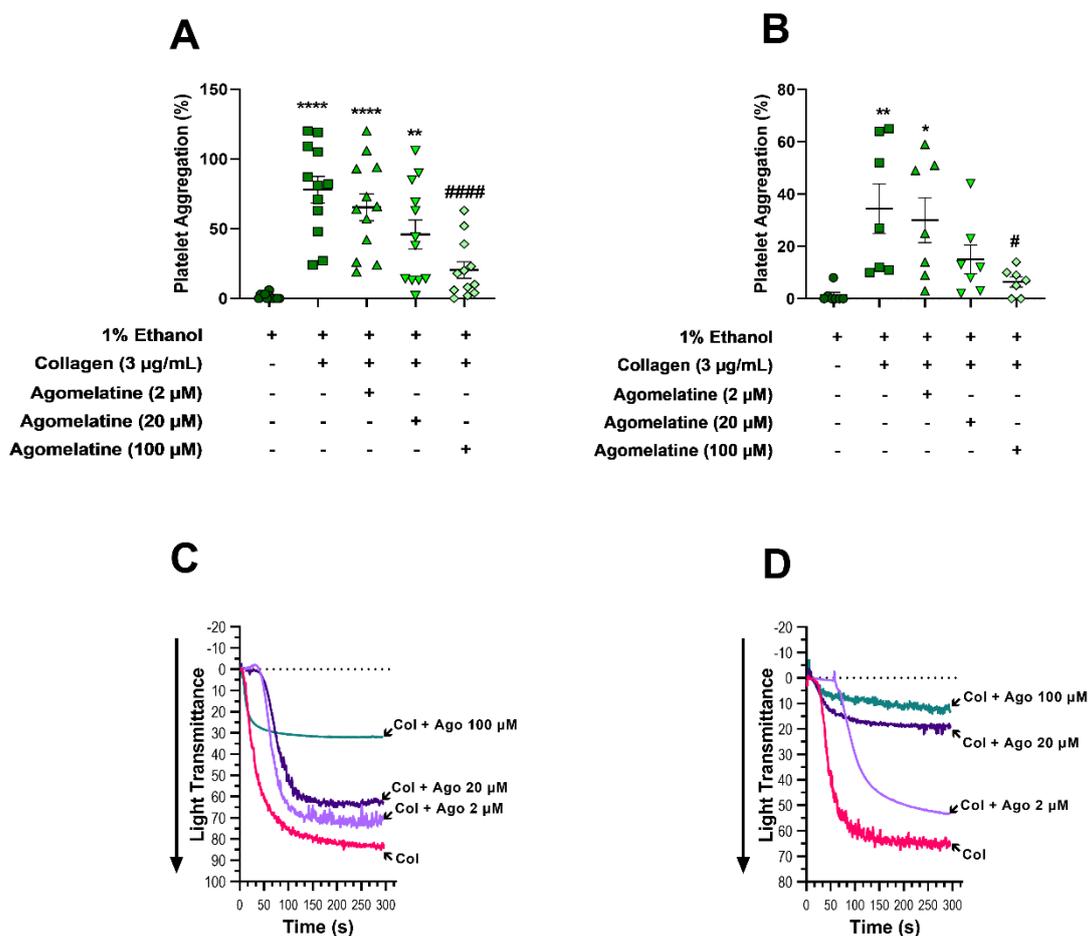
### Estímulo: Colágeno

Ao utilizar o colágeno como estímulo, a redução da agregação plaquetária em PRP foi expressiva nas amostras incubadas previamente com agomelatina a 100  $\mu$ M: foi detectada inibição de 75% neste grupo em comparação ao que recebeu exclusivamente o colágeno. As menores concentrações do antidepressivo não implicaram em redução na agregação máxima, em relação às amostras apenas estimuladas (**Figura 4 – A**).

De acordo com o observado no ensaio com o plasma rico em plaquetas, a maior concentração de agomelatina foi capaz de reduzir a agregação plaquetária máxima em 83%, quando comparada aos valores obtidos nas amostras que receberam apenas o estímulo. Pertinentemente, a concentração intermediária do agonista melatoninérgico reduziu em 66% a agregação plaquetária máxima das amostras, em comparação ao grupo exclusivamente estimulado. Tal fato extinguiu as diferenças entre os valores dos grupos 20 e 100  $\mu$ M (**Figura 4 – B**).

As curvas referentes ao perfil de agregação plaquetária salientam o que foi observado nos gráficos de porcentagem ao demonstrar a nítida diferenciação da curva das amostras tratadas com agomelatina 100  $\mu\text{M}$  em relação às outras, nos ensaios com PRP (**Figura 4 – C**).

No PAP dos experimentos com PL, é interessante observar que as curvas de agregação estão agrupadas em dois grupos distintos: amostras estimuladas estão mais próximas das que receberam agomelatina 2  $\mu\text{M}$ , enquanto as plaquetas que foram incubadas com as maiores concentrações da droga se equipararam (**Figura 4 – D**).



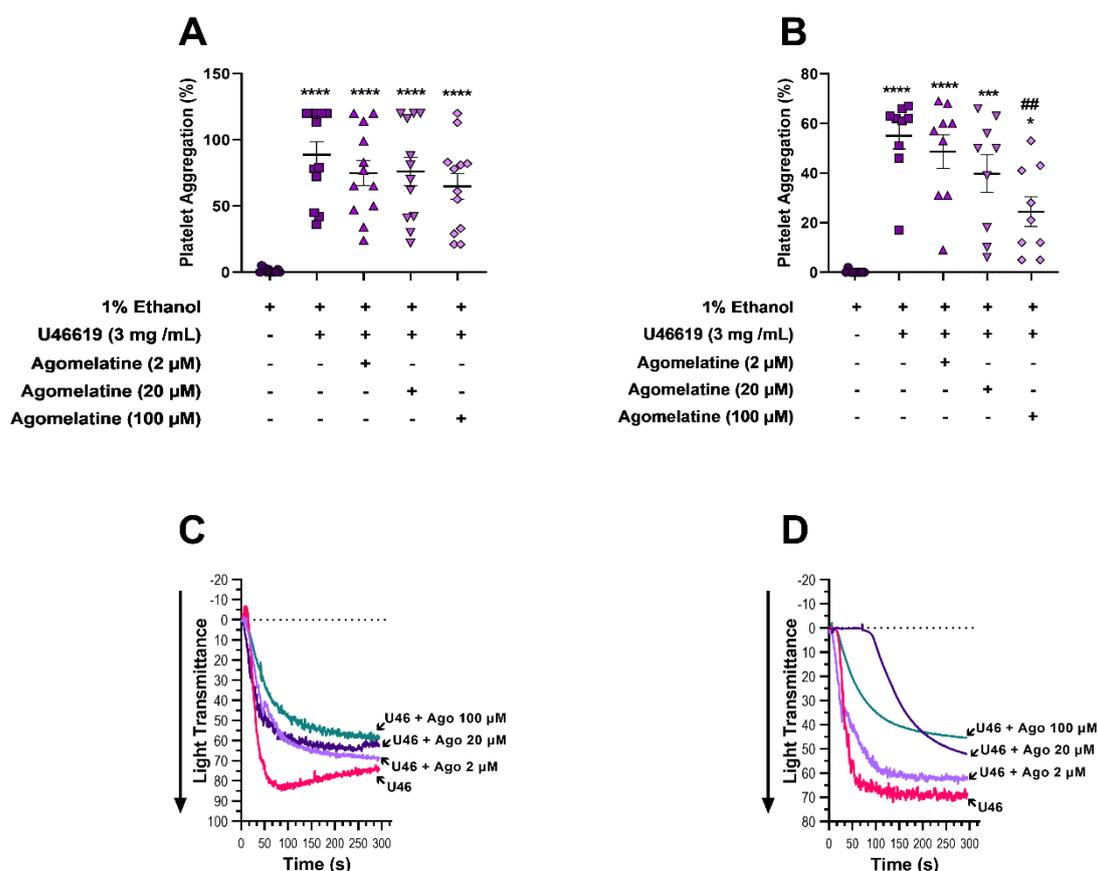
**Figura 4:** Agregação plaquetária estimulada por colágeno apresentada em porcentagem em (A) PRP (n=12) e (B) PL (n=07) e perfil de agregação plaquetária (curvas representativas dos ensaios) em (C) PRP e (D) PL. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \* p<0,05 vs. Ethanol; \*\* p<0,01 vs. Ethanol; \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; # p<0,05 vs. Collagen 3  $\mu\text{g/mL}$ ; ##### p<0,0001 vs. Collagen 3  $\mu\text{g/mL}$

**Estímulo: U46619**

A agregação plaquetária ocasionada pelo análogo estável do tromboxano A<sub>2</sub>, U46619, não foi alterada pela presença da agomelatina, visto que as amostras incubadas com a droga, em todas as concentrações, apresentaram agregação plaquetária idêntica às amostras apenas estimuladas (**Figura 5 – A**).

Ensaio conduzido com PL mostrou que a agomelatina em 100 µM possui a capacidade de reduzir a agregação plaquetária máxima em 57%, em comparação às amostras somente estimuladas. Entretanto, diferente do que foi observado nas condições dos experimentos anteriores, mesmo a ação da maior concentração do antidepressivo não foi capaz de igualar a porcentagem de agregação deste grupo ao que recebeu apenas o veículo etanol (**Figura 5 – B**).

Tanto o perfil de agregação plaquetária observado nos ensaios com PRP quanto PL constataram que as distribuições das curvas estão similares, com estas tendendo a ficar acima de 40% de agregação plaquetária (**Figura 5 – C e D**).

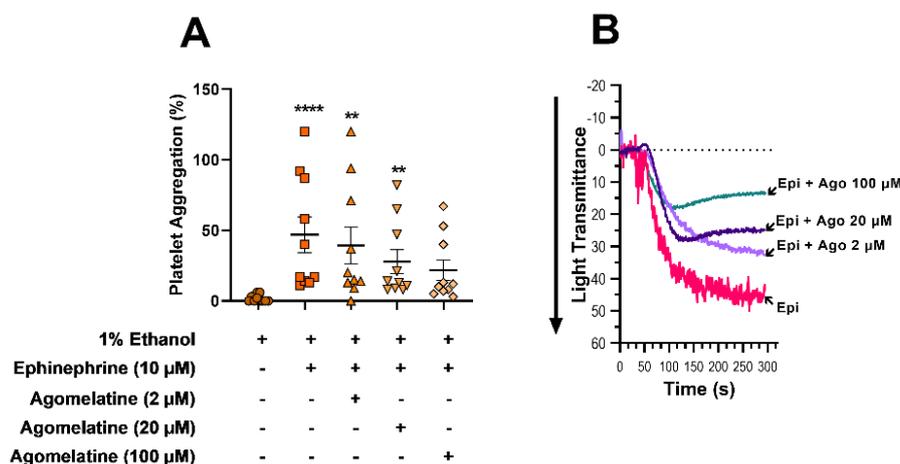


**Figura 5:** Agregação plaquetária estimulada por U-46619 apresentada em porcentagem em (A) PRP (n=12) e (B) PL (n=09) e perfil de agregação plaquetária (curvas representativas dos ensaios) em (C) PRP e (D) PL. Valores expressos em média ± SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \* p<0,05 vs. Ethanol; \*\*\* p<0,001 vs. Ethanol; \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; ## p<0,01 vs. U46619 3mg/mL

### Estímulo: Epinefrina

Quando o estímulo utilizado foi a epinefrina, a agregação plaquetária não foi afetada pela utilização de qualquer dose de agomelatina, visto que a porcentagem máxima de todos os grupos estimulados foi semelhante. Todavia, é importante pontuar que, na concentração 100  $\mu\text{M}$ , a droga foi capaz de igualar o valor de agregação máxima das amostras às que foram apenas incubadas com o veículo (**Figura 6 – A**).

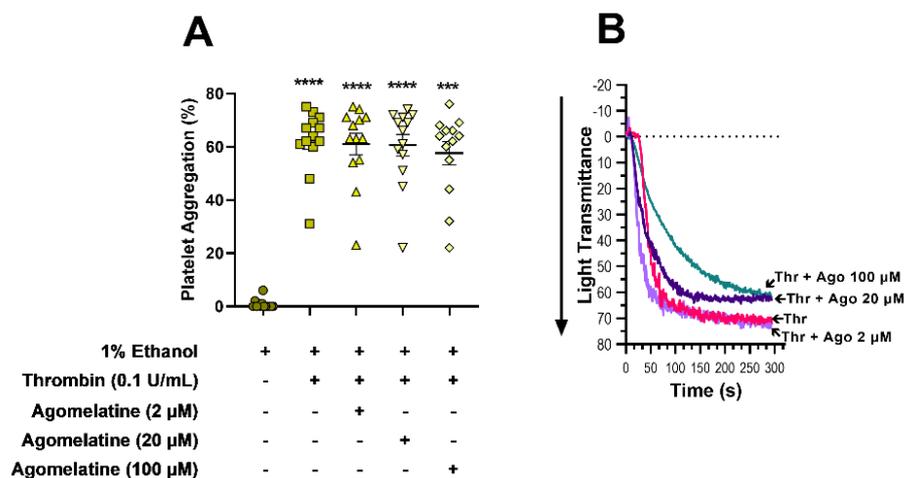
Curiosamente, o gráfico de perfil de agregação plaquetária apresenta curvas com valores máximos distintos, sendo a de amostras somente estimuladas oscilando por volta de 45%, de 2 e 20  $\mu\text{M}$  variando entre 25 e 30% e, por fim, a de 100  $\mu\text{M}$  atingindo 15% de agregação máxima. Estas diferenças não foram espelhadas pelo gráfico de porcentagem (**Figura 6 – B**).



**Figura 6:** Agregação plaquetária estimulada por epinefrina apresentada em porcentagem em (A) PRP (n=10) e (B) perfil de agregação plaquetária (curva representativa do ensaio). Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\* p<0,01 vs. Ethanol; \*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol.

### Estímulo: Trombina

Nos experimentos utilizando PL estimuladas por trombina, a presença de agomelatina se mostrou insignificante, uma vez que, tanto o gráfico contendo as porcentagens de agregação máxima quanto o com as curvas de perfil de agregação plaquetária, os valores máximos identificados foram idênticos em todos os grupos que receberam o estímulo (**Figura 7 – A e B**).



**Figura 7:** Agregação plaquetária estimulada por trombina apresentada em porcentagem em (A) PL (n=13) e (B) perfil de agregação plaquetária (curva representativa do ensaio). Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Ethanol; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Ethanol.

A partir destes resultados, algumas conclusões puderam ser obtidas: considerando que a agregação plaquetária ocorre a partir da ligação de agonistas, como fatores de coagulação, aos sítios específicos nos receptores plaquetários, evidenciou-se que o efeito inibitório apresentado pela agomelatina agia através de vias específicas (15).

Os receptores de ADP, trombina e  $\alpha$ -2 adrenérgicos não foram fortemente afetados pela utilização do antidepressivo, de acordo com a agregação máxima obtida após estimulação com ADP, trombina e epinefrina, respectivamente. De fato, as duas vias mais sensíveis a agomelatina parecem ser do ácido araquidônico e colágeno.

O ácido araquidônico é resultado da hidrólise do fosfatidilinositol, um fosfolípido presente na membrana plasmática de plaquetas, pela fosfolipase A<sub>2</sub>. Este processo infere uma mudança de conformação na estrutura plaquetária, substituindo sua forma discoide por uma irregular com pseudópodes, que facilitam a agregação em células adjacentes e adesão na parede vascular. Por conseguinte, o ácido araquidônico presente no citosol plaquetário é oxidado pela ciclooxigenase-1 (COX-1), resultando em prostaglandina G<sub>2</sub> (PgG<sub>2</sub>) e, conseqüentemente, prostaglandina H<sub>2</sub> (PgH<sub>2</sub>). Este último é então convertido em tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) através da ação da enzima tromboxano-A sintase. A liberação de TxA<sub>2</sub> é responsável por ativar plaquetas circulantes nas imediações e estimular a agregação plaquetária através da estimulação do receptor TxA<sub>2</sub>/ PGH<sub>2</sub> (15,85–87).

É possível inferir que, mesmo na sua menor concentração, este antidepressivo exerce poder inibitório sob a agregação plaquetária estimulada via COX-1. Como demonstrado por Kornblihtt, a melatonina, na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , promoveu redução na agregação estimulada por ácido araquidônico a 300  $\mu\text{M}$  em até 60% (64). Notavelmente, o resultado obtido nos ensaios de agregação estimulada por ácido araquidônico no presente estudo reproduziu este mesmo padrão, entretanto, as concentrações de agomelatina empregadas foram consideravelmente menores do que as de melatonina utilizadas na literatura.

As curvas obtidas em amostras estimuladas por colágeno demonstraram um interessante padrão de dose-resposta: quanto maior a concentração de agomelatina, menor a agregação máxima atingida. Este fenômeno replicou-se tanto em plasma rico em plaquetas quanto em plaquetas lavadas.

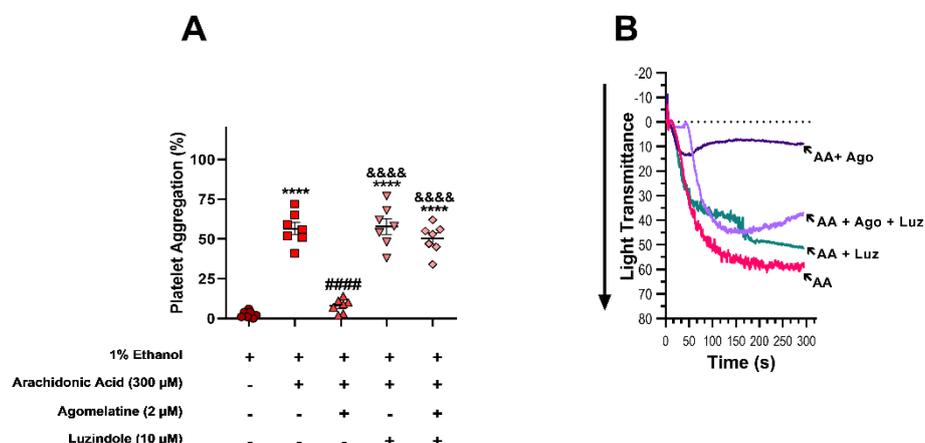
A agregação estimulada por colágeno se dá através da ligação desta proteína a glicoproteínas específicas, como GPVI. A partir disso, ocorre a ativação de Syk, o que leva à fosforilação de várias proteínas de sinalização, incluindo a fosfolipase C- $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2). Como resultado, ocorre a ativação plaquetária, caracterizada pelo aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, mudança de conformação plaquetária, exocitose do conteúdo dos grânulos e atividade pró-coagulante (88,89). Devido a este mecanismo de ação, especulou-se que agomelatina, na sua maior concentração, bloqueia a ativação desta glicoproteína ou interfere negativamente na cascata de sinalização intracelular.

Os próximos experimentos foram conduzidos utilizando apenas o ácido araquidônico e o colágeno como agonistas de agregação, visto que estas duas vias aparentam ser as mais suscetíveis aos efeitos da agomelatina. As concentrações da droga foram definidas como 2  $\mu\text{M}$  para o primeiro estímulo e 100  $\mu\text{M}$  para o segundo.

#### *Medida de agregação plaquetária – Antagonistas melatoninérgicos*

Reproduzindo o que foi observado anteriormente, a agregação plaquetária em PRP estimulado por ácido araquidônico foi consideravelmente inibida pela agomelatina, em relação ao grupo somente estimulado. Este efeito foi bloqueado pela incubação concomitante com o antagonista de receptores  $\text{MT}_1$  e  $\text{MT}_2$ , luzindole, que igualou a agregação máxima dos grupos que os receberam com as amostras exclusivamente estimuladas (**Figura 8 – A**).

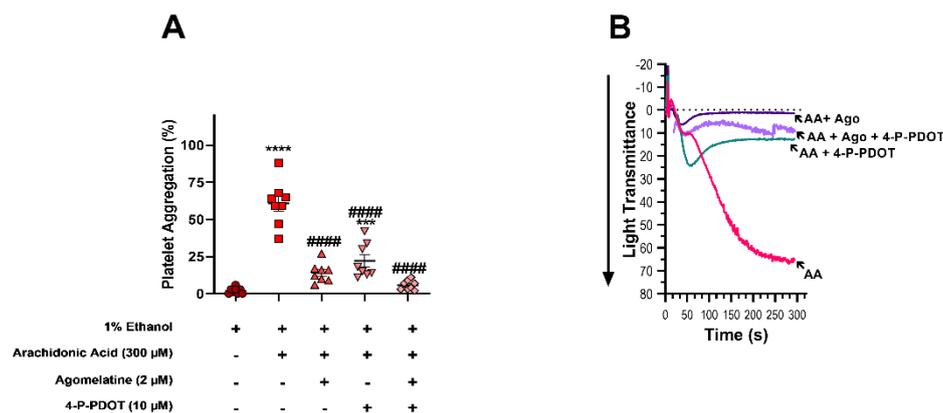
De modo correspondente, no gráfico de PAP, é possível notar três curvas com agregação máxima acima de 45%, ao passo que a curva de amostras incubadas apenas com agomelatina apresentou agregação máxima de 15% (**Figura 8 – B**).



**Figura 8:** Agregação plaquetária estimulada por ácido araquidônico em amostras incubadas com luzindole apresentada em porcentagem em (A) PRP (n=07) e (B) perfil de agregação plaquetária (curva representativa do ensaio). Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; #### p<0,0001 vs. Arachidonic Acid 300 $\mu$ M; &&&& p<0,0001 vs. Agomelatine 2 $\mu$ M

Os ensaios que utilizaram o antagonista de receptor MT<sub>2</sub>, 4-P-PDOT, demonstraram um alinhamento bastante peculiar: a redução da agregação plaquetária foi observada tanto nas amostras que receberam exclusivamente a agomelatina como naquelas que foram incubadas apenas com o antagonista melatoninérgico. Quando comparadas ao grupo estimulado, a inibição foi de 74% e 64%, respectivamente. Já a associação da agomelatina com o 4-P-PDOT reduziu em 91% a agregação em relação às amostras somente estimuladas (**Figura 9 – A**).

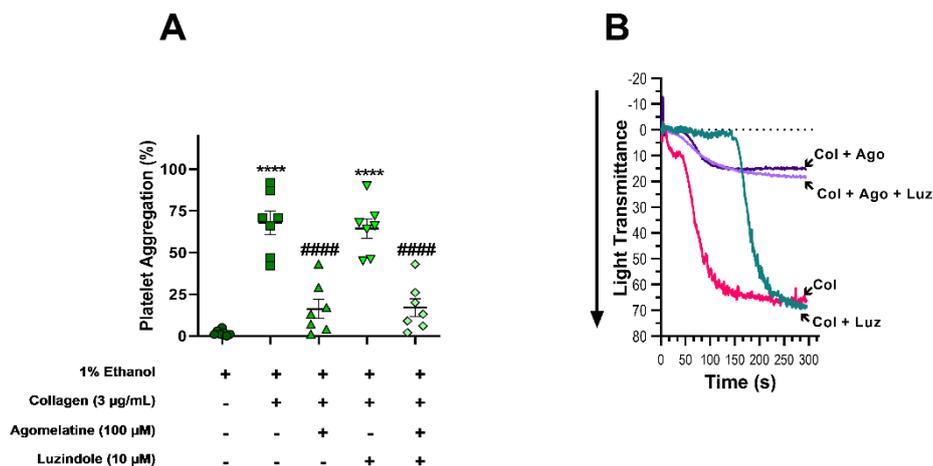
Condizentemente, é possível observar o padrão descrito acima no gráfico de perfil de agregação plaquetária deste ensaio. Há apenas uma curva que ultrapassa os 60% de agregação máxima, enquanto as outras três tem incidência menor do que 25% (**Figura 9 – B**).



**Figura 9:** Agregação plaquetária estimulada por ácido araquidônico em amostras incubadas com 4-P-PDOT apresentada porcentagem em (A) PRP (n=08) e (B) perfil de agregação plaquetária (curva representativa do ensaio). Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Ethanol; #####  $p < 0,0001$  vs. Arachidonic Acid 300 $\mu$ M

Diferentemente do que foi exibido no ensaio anterior, o luzindole foi incapaz de impedir o efeito antiagregante da maior concentração de agomelatina sob a agregação plaquetária em PRP estimulado com colágeno. Ambos os grupos incubados com o antidepressivo apresentaram inibição de 77% da agregação, quando comparados às amostras apenas estimuladas. Como previsto, os valores de agregação máxima das amostras que receberam apenas o luzindole não se diferenciaram do grupo estimulado (**Figura 10 – A**).

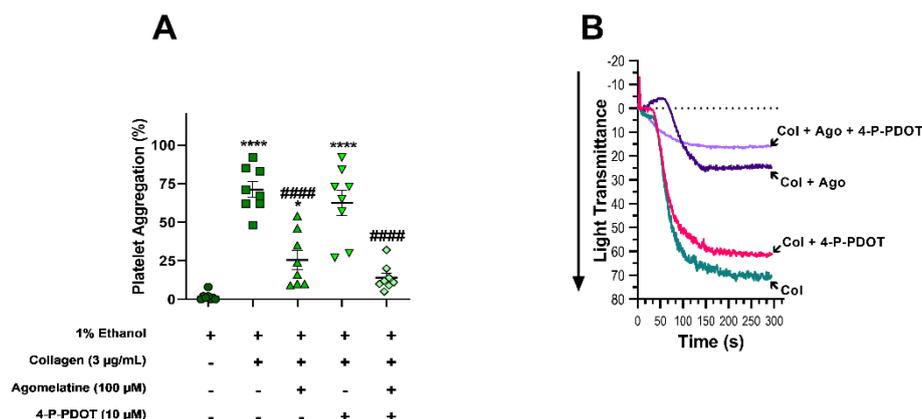
Novamente, as curvas no gráfico de PAP ilustraram o fenômeno caracterizado no gráfico de porcentagens. As duas populações distintas correspondem às curvas de amostras estimuladas e incubadas com luzindole – estes atingindo valores de agregação máxima de 70% – e dos grupos que foram incubados com agomelatina, com e sem luzindole – ambos mantendo agregação máxima menor que 20% (**Figura 10 – B**).



**Figura 10:** Agregação plaquetária estimulada por colágeno em amostras incubadas com luzindole apresentada em porcentagem em (A) PRP (n=07) e (B) perfil de agregação plaquetária (curva representativa do ensaio). Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; ##### p<0,0001 vs. Collagen 3 µg/mL

Frente ao estímulo do colágeno, a capacidade inibitória do 4-P-PDOT, evidenciada no ensaio com ácido araquidônico, não foi detectada. De fato, o padrão constatado nesse experimento foi idêntico ao descrito no com plasma rico em plaquetas tratado com agomelatina 100 µM e incubado também com luzindole: a presença do antagonista de receptor melatoninérgico foi incapaz de evitar a ação inibitória do antidepressivo. Dessa forma, a redução da agregação plaquetária nos dois grupos que receberam a agomelatina foi de, aproximadamente, 60% em comparação ao grupo que foi apenas estimulado (**Figura 11 – A**).

Sendo assim, o perfil de agregação plaquetária também foi muito semelhante ao obtido anteriormente. A presença da agomelatina foi capaz de manter a agregação plaquetária máxima inferior a 25% nas amostras que foram previamente tratadas com esta droga, ao passo que a incubação com o 4-P-PDOT não afetou a habilidade de agregação de plaquetas (**Figura 11 – B**).



**Figura 11:** Agregação plaquetária estimulada por colágeno em amostras incubadas com 4-P-PDOT apresentada em porcentagem em (A) PRP (n=08) e (B) perfil de agregação plaquetária (curva representativa do ensaio). Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; ##### p<0,0001 vs. Collagen 3 µg/mL

Nesta fase do estudo, foi empregado o luzindole como antagonista de ambos os receptores melatoninérgicos estudados, visto que não possui seletividade entre MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>, embora sua maior afinidade seja pelo segundo (razão afinidade MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> = 16–26) (68). Desta forma, foi possível detectar que, nos ensaios que utilizaram ácido araquidônico, a inibição ocasionada pela agomelatina foi mediada pelos receptores de melatonina, visto que a presença do antagonista bloqueou totalmente a ação antiagregante do fármaco.

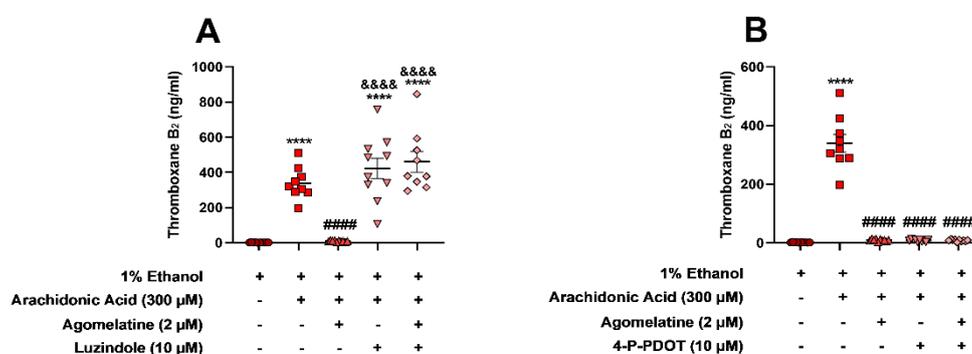
Inicialmente, o uso do 4-P-PDOT foi pensado como critério para distinção da ação de cada receptor, visto que este é um antagonista seletivo para MT<sub>2</sub>, entretanto, no decorrer dos ensaios de agregação, constatou-se que a presença deste, por si só, é capaz de promover grande redução na agregação plaquetária. Fora do tecido nervoso, o 4-P-PDOT pode comportar-se como agonista parcial do receptor MT<sub>2</sub>, fenômeno já descrito em leucócitos (70,90). Ponderando este fato, os resultados obtidos com o uso deste antagonista frente o estímulo do ácido araquidônico sugerem que a ativação do receptor melatoninérgico MT<sub>2</sub> tem um papel chave no processo de inibição observado.

Já os ensaios onde o estímulo empregado foi o colágeno, independente da presença dos antagonistas, a agomelatina manteve sua ação inibitória, o que indica que a ação da maior concentração desta droga não está necessariamente vinculada a ativação dos receptores melatoninérgicos.

### Quantificação de produção de tromboxano B<sub>2</sub>

A produção de tromboxano B<sub>2</sub> estimulada por ácido araquidônico, bem como a agregação plaquetária e a mobilização intracelular de cálcio, foi afetada pela utilização de agomelatina. No ensaio onde a incubação concomitante com luzindole foi feita, as amostras que receberam somente o antidepressivo se mostraram semelhantes às que continham somente o veículo, ao passo que a presença do antagonista melatoninérgico equiparou os grupos ao que foi somente estimulado (**Figura 12 – A**).

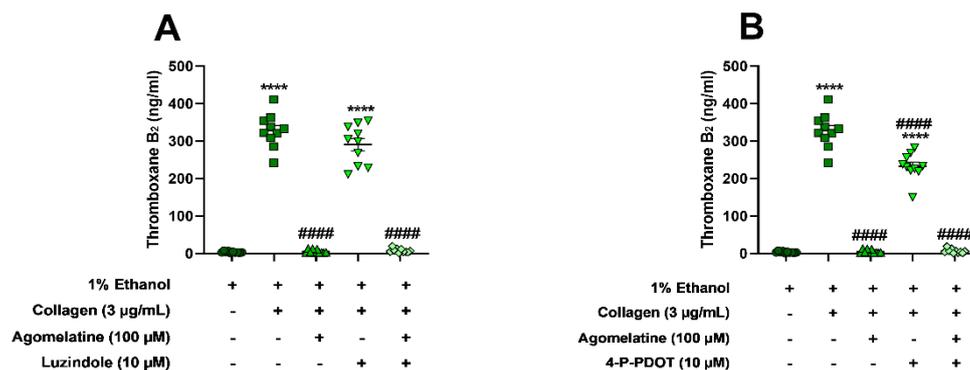
Em consonância com os experimentos anteriores, a incubação com o 4-P-PDOT já foi capaz de reduzir substancialmente a produção de tromboxano estimulado por ácido araquidônico. As amostras que receberam agomelatina e/ou antagonista de receptor MT<sub>2</sub> não se diferenciaram daquelas incubadas apenas com etanol (**Figura 12 – B**).



**Figura 12:** Produção de tromboxano B<sub>2</sub> estimulado por ácido araquidônico apresentado em PRP (n=10) (**A**) incubado com luzindole e (**B**) incubado com 4-P-PDOT. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; #### p<0,0001 vs. Arachidonic Acid 300  $\mu$ M; &&&& p<0,0001 vs. Agomelatine 2  $\mu$ M

Complementando os ensaios progressos que tiveram o colágeno como estímulo, a produção de tromboxano foi fortemente inibida pelo tratamento com agomelatina. Uma vez mais, a associação do luzindole com o antidepressivo apresentou valores semelhantes ao uso do agonista isoladamente e das amostras veículo, ao passo que o uso exclusivo do antagonista não diferenciou este grupo do apenas estimulado (**Figura 13 – A**).

Intrigantemente, a incubação com 4-P-PDOT reduziu a produção de tromboxano em 30% em relação às amostras somente estimuladas, porém a liberação de TBX<sub>2</sub> deste grupo foi 38 vezes maior do que dos dois outros que receberam agomelatina (**Figura 13 – B**).



**Figura 13:** Produção de tromboxano B<sub>2</sub> estimulado por colágeno apresentado em PRP (n=10) (A) incubado com luzindole e (B) incubado com 4-P-PDOT. Valores expressos em média ± SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; ##### p<0,0001 vs. Collagen 3 µg/mL

A formação do tromboxano acontece através da oxidação do ácido araquidônico presente no citosol plaquetário pela ciclooxigenase-1 (COX-1), resultando em prostaglandina G<sub>2</sub> (P<sub>g</sub>G<sub>2</sub>) e, conseqüentemente, prostaglandina H<sub>2</sub> (P<sub>g</sub>H<sub>2</sub>). Este último é então convertido em tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) através da ação da enzima tromboxano-A sintase. A liberação de TxA<sub>2</sub> é responsável por ativar plaquetas circulantes nas imediações e estimular a agregação plaquetária através da estimulação do receptor TxA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> (91–93).

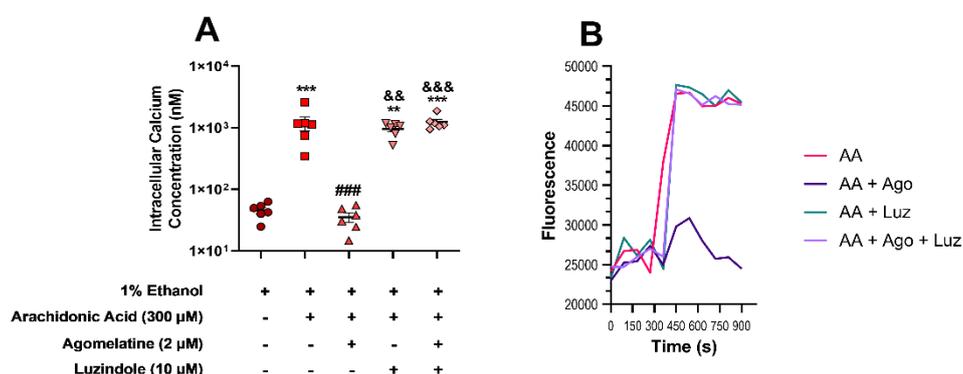
Consistente com os resultados obtidos no ensaio de agregação plaquetária, a inibição causada pela agomelatina também foi observada na produção de tromboxano, tanto estimulada por ácido araquidônico quanto por colágeno. Visto que a liberação deste composto por plaquetas ativas é decorrente da ação da enzima COX-1, como apontado anteriormente, a redução da produção de tromboxano nas amostras tratadas com agomelatina reforça a ideia de que, de alguma forma, os receptores melatoninérgicos plaquetários, através da sua ativação, interferem negativamente na ação enzimática da COX-1. Novamente, é importante ressaltar que a maior concentração de agomelatina provavelmente agiu independentemente dos receptores de melatonina, uma vez que seu efeito não foi revertido pela presença dos antagonistas, como observado nas amostras tratadas com o antidepressivo em 2 µM.

#### *Mensuração de cálcio intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)*

A concentração intracelular de cálcio foi significativamente impactada pela presença da agomelatina em amostras estimuladas com ácido araquidônico. As amostras incubadas com a droga mantiveram as concentrações de cálcio semelhantes às amostras

que receberam apenas o veículo etanol, ou seja, apresentaram nível intracelular 35 vezes menor do que o grupo estimulado. Em relação às amostras que receberam luzindole, associado ou não à agomelatina, a concentração intracelular de cálcio foi equivalente às amostras estimuladas somente (**Figura 14 – A**).

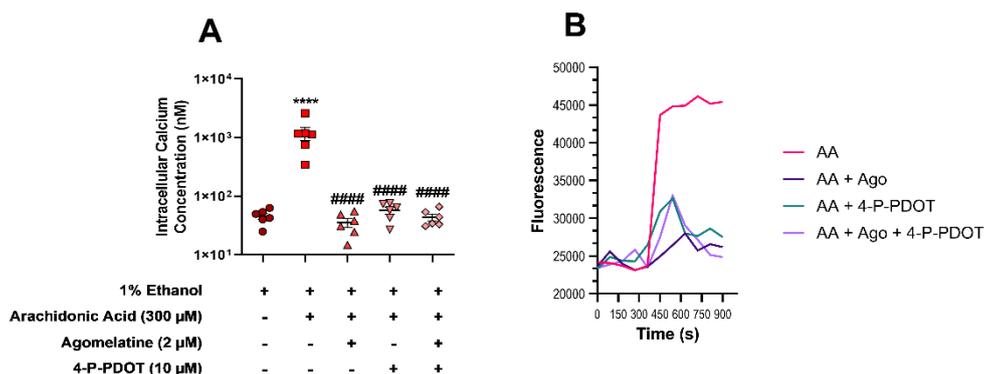
O gráfico de fluorescência vs. tempo elucidada como ocorreu a mobilização de cálcio nas amostras após a injeção do estímulo. Pode-se notar que as amostras tratadas exclusivamente com agomelatina tiveram um pico expressivamente menor, quando comparadas aos outros três grupos que receberam o estímulo (**Figura 14 – B**).



**Figura 14:** Mobilização intracelular de cálcio estimulada por ácido araquidônico em amostras incubadas com luzindole apresentado em (A) concentração intracelular final de cálcio em PL (n=06) e (B) curva representativa do ensaio. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\* p<0,01 vs. Ethanol; \*\*\* p<0,001 vs. Ethanol; ### p<0,001 vs. Arachidonic Acid 300 µM; && p<0,01 vs. Agomelatine 2 µM; &&& p<0,001 vs. Agomelatine 2µM

Reproduzindo o padrão observado nos ensaios de agregação plaquetária, o 4-P-PDOT, por si só, foi capaz de reduzir os níveis de cálcio intracelular de amostras que foram incubadas com este antagonista. A agomelatina também promoveu um efeito semelhante, logo, as amostras tratadas tanto com o agonista melatoninérgico quanto com o 4-P-PDOT – ou ambos – se mostraram equivalentes àquelas que receberam o veículo exclusivamente. Por tanto, o grupo que foi somente estimulado apresentou concentração intracelular de cálcio 25 vezes maior do que os outros presentes neste experimento (**Figura 15 – A**).

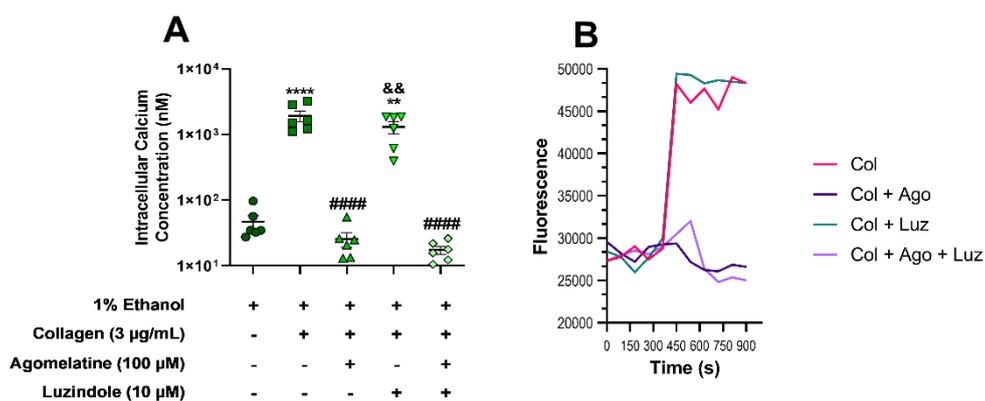
Como era de se esperar, a mobilização de cálcio intracelular após estímulo agregante foi acentuada somente no grupo que não recebeu o tratamento prévio com o agonista e/ou antagonista melatoninérgico (**Figura 15 – B**).



**Figura 15:** Mobilização intracelular de cálcio estimulada por ácido araquidônico em amostras incubadas com 4-P-PDOT apresentado em (A) concentração intracelular final de cálcio em PL (n=06) e (B) curva representativa do ensaio. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; ##### p<0,0001 vs. Arachidonic Acid 300  $\mu$ M

Repercutindo o mesmo princípio identificado nos ensaios de agregação estimulada por colágeno, a utilização de luzindole não impediu a ação da agomelatina. É notável a redução das concentrações de cálcio intracelular dos grupos incubados com o antidepressivo em comparação aos apenas estimulados ou tratados com luzindole (**Figura 16 – A**).

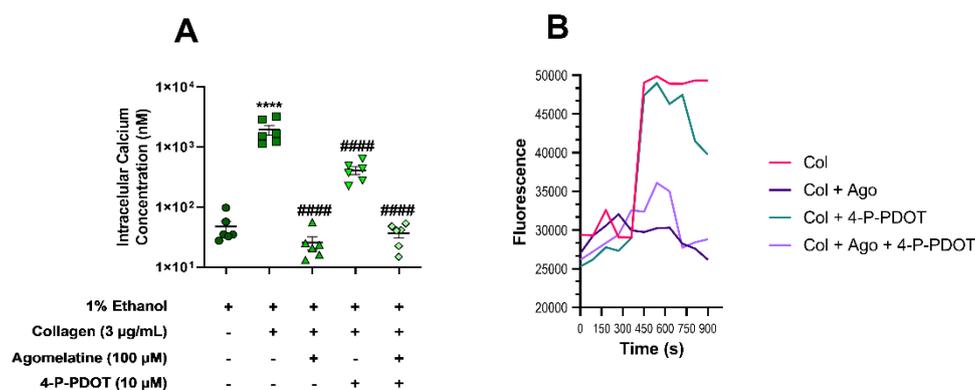
Da mesma forma, o gráfico que mostra a mobilização de cálcio intracelular após estímulo corrobora com o que foi descrito anteriormente: as amostras que receberam agomelatina, independente da utilização concomitante de luzindole, apresentaram picos menores no influxo de cálcio quando comparadas às apenas estimuladas ou incubadas com o antagonista (**Figura 16 – B**).



**Figura 16:** Mobilização intracelular de cálcio estimulada por colágeno em amostras incubadas com luzindole apresentado em (A) concentração intracelular final de cálcio em PL (n=06) e (B) curva representativa do ensaio. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\* p<0,01 vs. Ethanol; \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; ##### p<0,0001 vs. Collagen 3  $\mu$ g/mL; && p<0,01 vs. Agomelatine 100  $\mu$ M

Inusitadamente, o 4-P-PDOT foi capaz de reduzir a concentração de cálcio intracelular. Ao comparar os valores do grupo apenas estimulado com os demais, isto é, amostras que receberam somente o veículo e aquelas que foram tratadas com agomelatina e/ou 4-P-PDOT, é perceptível que os níveis do primeiro são mais altos que os do restante. Em compensação, os grupos tratados e o que recebeu apenas o veículo etanol apresentaram valores semelhantes (**Figura 17 – A**).

De maneira igualmente curiosa, o gráfico de mobilização de cálcio após estímulo demonstra que as amostras com 4-P-PDOT atingem um pico máximo maior do que as que receberam agomelatina, entretanto, há um decréscimo progressivo da concentração no decorrer do ensaio (**Figura 17 – B**).



**Figura 17:** Mobilização intracelular de cálcio estimulada por colágeno em amostras incubadas com 4-P-PDOT apresentado em (A) concentração intracelular final de cálcio em PL (n=06) e (B) curva representativa do ensaio. Valores expressos em média ± SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\* p<0,01 vs. Ethanol; \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; #### p<0,0001 vs. Collagen 3 µg/mL

Considerado o fator determinante para a ativação plaquetária, a mobilização de cálcio em plaquetas tem início a partir da ativação da fosfolipase C (PLC), hidrolisando o 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP<sub>2</sub>) para inositol-1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). A liberação do cálcio estocado é mediada pelo IP<sub>3</sub>, bem como a proteína STIM1, encontrada no sistema tubular denso (DTS) de plaquetas, sendo esta considerada como um “sensor” dos níveis de Ca<sup>2+</sup> intraplaquetários. Após o esgotamento dos estoques de cálcio intracelular, ocorre a interação da STIM1 com o canal Orai 1, resultando na sua abertura e, conseqüentemente, no influxo denominado *store-operated Ca<sup>2+</sup> entry* (SOCE). Outros fenômenos responsáveis pelo influxo de cálcio intracelular já identificados ocorrem ou a partir da ativação dos receptores PX21, que dependem de ADP ou ATP – *receptor-operated Ca<sup>2+</sup> entry* (ROCE) – ou de *second messenger-operated*

$Ca^{2+}$  entry (SMOCE) ativados pela fosfoquinase C (PKC) e tirosina quinase src. Estes são chamados de entrada de cálcio não-SOCE (22,25,94).

De maneira contrária aos dados supracitados, Kumari (2011) demonstrou que a melatonina, em concentrações maiores que 100  $\mu$ M, foi responsável pelo aumento da concentração intracelular de cálcio em plaquetas inativas, bem como a potencialização do influxo de cálcio estimulado por trombina 1 U/mL. Neste estudo, notou-se, também, que o efeito da melatonina sobre plaquetas foi abolido na presença do luzindole, indicando que a ação sobre o influxo de cálcio era dependente dos receptores melatoninérgicos (75).

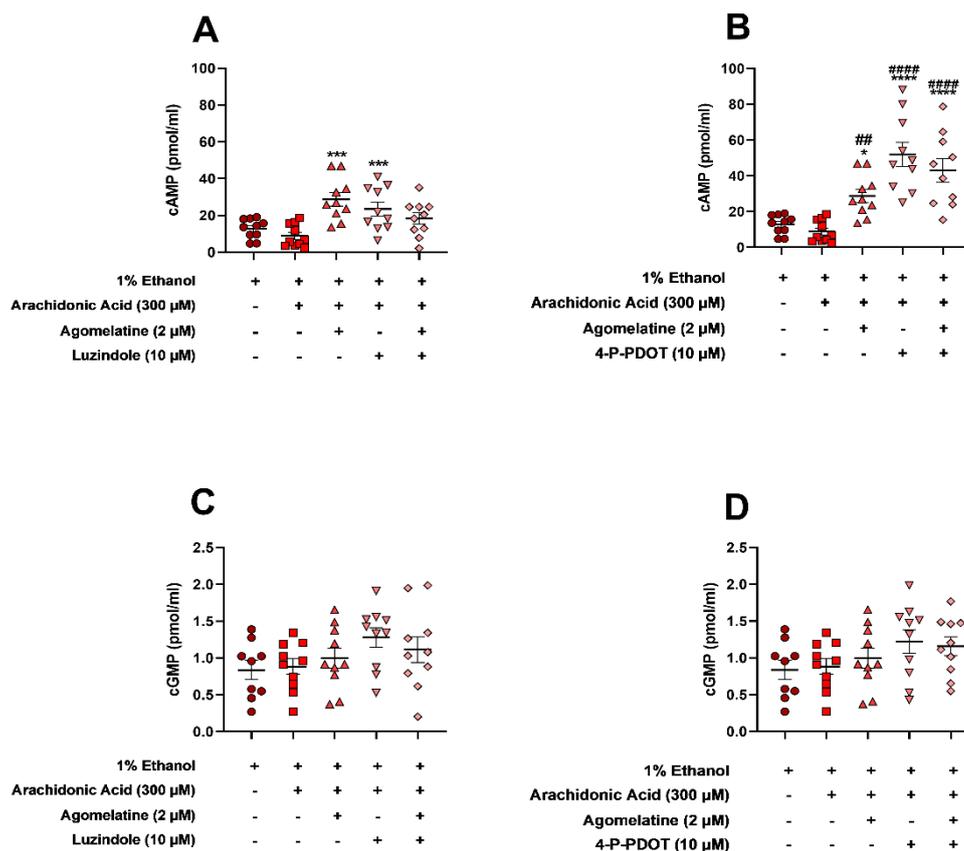
Apesar de controverso, a ação inibitória observada com a utilização de agomelatina é condizente com o que foi obtido nos ensaios de agregação plaquetária, uma vez que o influxo e mobilização de cálcio intraplaquetários são tidos como principais responsáveis pela ativação e passagem do estado inativo das plaquetas para um de pró-coagulação (17).

#### *Quantificação de AMPc e GMPc intracelulares*

Quando comparadas às amostras que receberam somente o veículo, o grupo tratado com agomelatina apresentou aumento dos níveis de AMPc. Curiosamente, as amostras incubadas com luzindole também apresentaram este mesmo padrão de diferenciação, enquanto a associação do agonista e antagonista em uma mesma amostra extinguiu esta disparidade (**Figura 18 – A**).

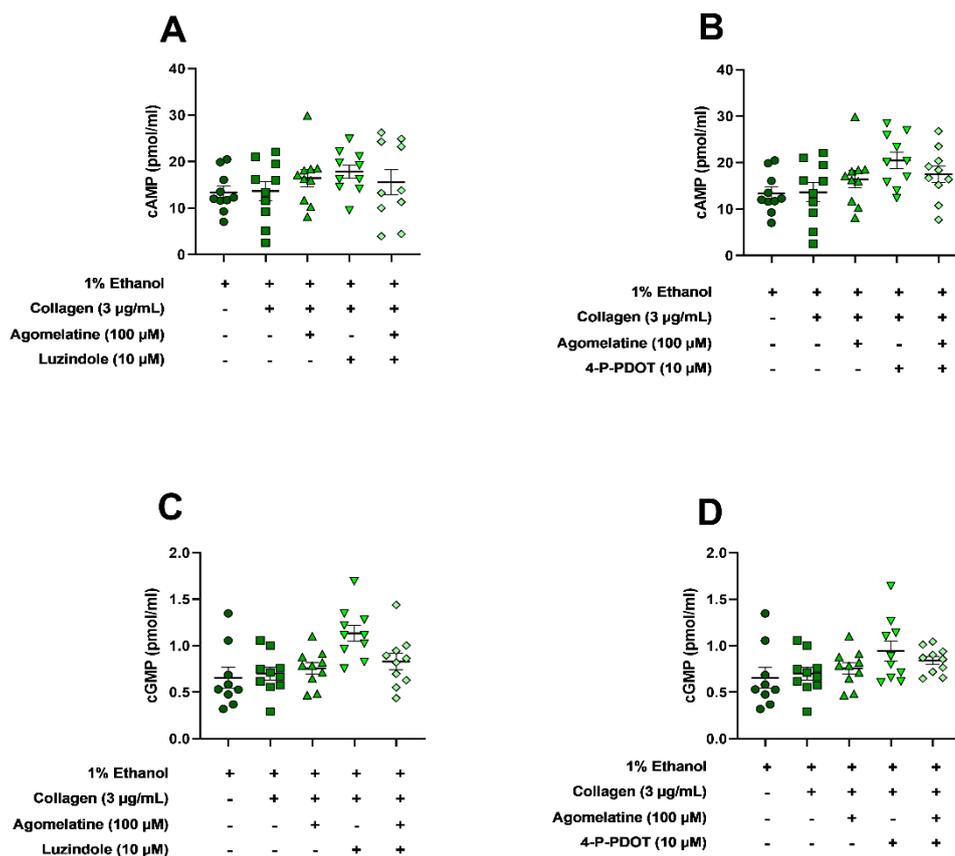
Reiterando os interessantes resultados que vinha apresentando, a presença de 4-P-PDOT, por si só, foi capaz de induzir o aumento expressivo das concentrações de AMPc em comparação com as amostras que continham apenas o veículo ou as que foram exclusivamente estimuladas por ácido araquidônico. Da mesma forma, a combinação deste antagonista com a agomelatina manteve os elevados valores, ao passo que a incubação somente com o antidepressivo exibiu o mesmo perfil, porém em escala reduzida (**Figura 18 - B**).

Em relação a quantificação de GMPc intracelular em plaquetas estimuladas com ácido araquidônico, não foram detectadas diferenças relevantes entre os valores expressos pelos grupos (**Figura 18 – C e D**).



**Figura 18:** Quantificação de nucleotídeos cíclicos intracelulares em amostras estimuladas por ácido araquidônico em PRP (n=10). Os gráficos estão organizados como: **(A)** AMPc em amostras incubadas com luzindole, **(B)** AMPc em amostras incubadas com 4-P-PDOT, **(C)** GMPc em amostras incubadas com luzindole, **(D)** GMPc em amostras incubadas com 4-P-PDOT. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \* p<0,05 vs. Ethanol; \*\*\* p<0,001 vs. Ethanol; \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; ## p<0,01 vs. Arachidonic Acid 300  $\mu$ M; #### p<0,0001 vs. Arachidonic Acid 300  $\mu$ M

Diferentemente do que foi observado nos ensaios onde o estímulo utilizado foi o ácido araquidônico, amostras estimuladas com colágeno e incubadas previamente com agomelatina e/ou antagonistas de receptores melatoninérgicos não apresentaram diferenças significantes nas concentrações de nucleotídeos intracelulares (**Figura 19 – A, B, C e D**).



**Figura 19:** Quantificação de nucleotídeos cíclicos intracelulares em amostras estimuladas por colágeno em PRP (n=10). Os gráficos estão organizados como: (A) AMPc em amostras incubadas com luzindole, (B) AMPc em amostras incubadas com 4-P-PDOT, (C) GMPc em amostras incubadas com luzindole, (D) GMPc em amostras incubadas com 4-P-PDOT. Valores expressos em média  $\pm$  SEM.

Há décadas, os nucleotídeos cíclicos – AMPc e GMPc – são conhecidos mecanismos de inativação plaquetária, estando intimamente relacionados a compostos liberados pelo endotélio íntegro, como prostaglandina I<sub>2</sub> (prostaciclina) e óxido nítrico.

A partir da ativação de receptores acoplados à proteína G presentes na superfície plaquetária, como, por exemplo o PAR-1, P2Y<sub>12</sub> e  $\alpha$ 2-adrenérgicos, ocorre a supressão da atividade da adenilato ciclase, resultando na diminuição dos níveis de AMPc presentes no citosol da plaqueta e, após a inibição da fosfoquinase (PKA) dependente de AMPc, há bloqueio da fosforilação de fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP) e, consequentemente, ativação da integrina  $\alpha$ Ib $\beta$ , responsável pela ligação plaqueta-plaqueta pelo intermédio do fibrinogênio. O mesmo mecanismo de sinalização é observado na via do GMPc, cuja enzima envolvida é a guanilato ciclase (91,95).

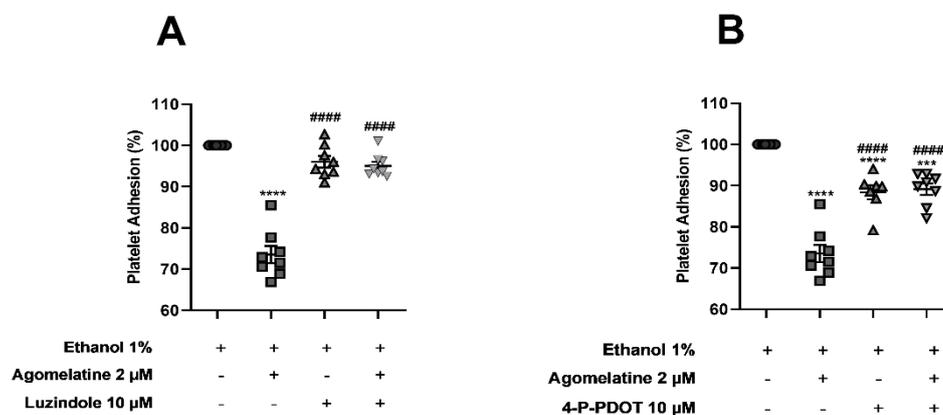
É interessante ressaltar que a ativação dos receptores melatoninérgicos, tanto MT<sub>1</sub> quanto MT<sub>2</sub>, canonicamente promove a redução do AMPc, uma vez que estes receptores são do tipo GPCR. Fundamentado neste conceito, os resultados encontrados no presente

estudo parecem incongruentes, entretanto há um diálogo com os fenômenos detectados nos experimentos de mobilização de cálcio: há relatos na literatura de que a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  é inibida pela presença de proteínas fosforiladas por quinases dependentes de AMPc (96,97). Corroborando com a associação acima, um estudo conduzido com voluntários que receberam melatonina via oral demonstrou que houve aumento nos níveis plasmáticos de GMPc e AMPc após o tratamento. Entretanto, o mecanismo que desencadeou tal fato não foi elucidado (98).

#### *Medida de adesão plaquetária estática*

Os resultados obtidos nos ensaios de agregação estática ao fibrinogênio confluem, de certa forma, com o compilado de dados dos ensaios anteriores: a utilização de agomelatina, logo na concentração  $2\mu\text{M}$ , foi capaz de promover redução na adesão em, aproximadamente, 30% quando comparada com as amostras que receberam somente o etanol.

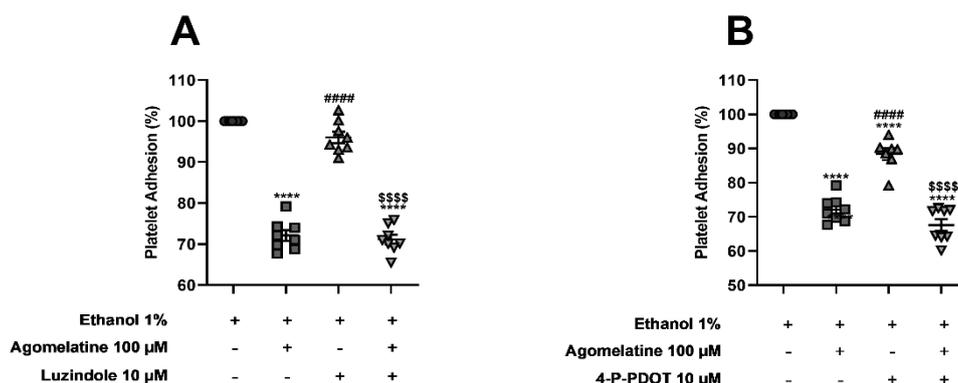
Foi observado que a utilização do luzindole bloqueia o efeito inibitório do antidepressivo, tornando a adesão semelhante ao grupo veículo (**Figura 20 – A**), ao passo que a incubação, exclusiva ou não, com 4-P-PDOT reduz em cerca de 22% a adesão (**Figura 20 – B**).



**Figura 20:** Adesão plaquetária estática ao fibrinogênio de amostras incubadas com agomelatina  $2\mu\text{M}$  PL (n=08) (**A**) concomitantemente incubadas com luzindole e (**B**) concomitantemente incubadas com 4-P-PDOT. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Ethanol; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Ethanol; #####  $p < 0,0001$  vs. Agomelatine  $2\mu\text{M}$

Apesar de ter demonstrado potente ação inibitória que nos ensaios progressivos, a agomelatina, na concentração  $100\mu\text{M}$ , reduziu a adesão plaquetária ao fibrinogênio em 30% em comparação às amostras incubadas somente com etanol, ou seja, o mesmo efeito observado com a menor concentração do antidepressivo.

A utilização dos antagonistas melatoninérgicos concomitantemente a droga investigada não impediram sua ação inibitória (**Figura 21 – A e B**).

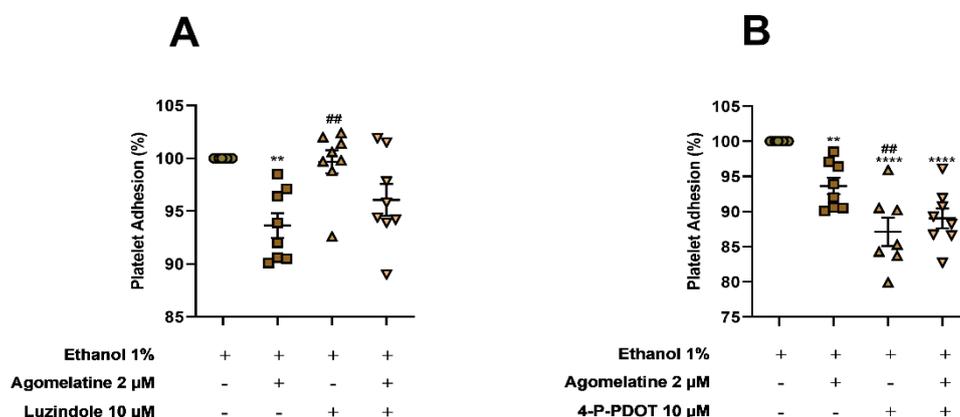


**Figura 21:** Adesão plaquetária estática ao fibrinogênio de amostras incubadas com agomelatina 100  $\mu$ M PL (n=08) (**A**) concomitantemente incubadas com luzindole e (**B**) concomitantemente incubadas com 4-P-PDOT. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; ##### p<0,0001 vs. Agomelatine 100  $\mu$ M; \$\$\$\$ p<0,0001 vs. Luzindole 10  $\mu$ M / 4-P-PDOT 10  $\mu$ M

No que se refere ao ensaio de adesão ao colágeno, a agomelatina 2 $\mu$ M apresentou ação mais discreta, sendo capaz de inibir somente 5% deste fenômeno em relação às amostras veículo.

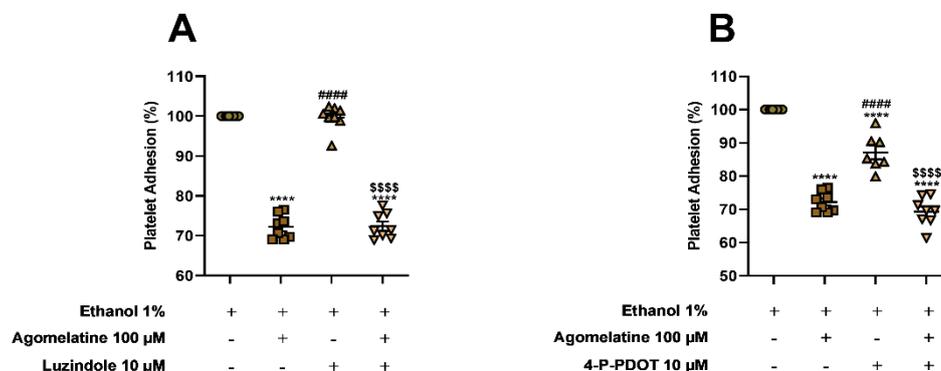
Em compensação, o luzindole conseguiu reverter esta inibição, tornando este grupo semelhante ao que recebeu somente o etanol (**Figura 22 – A**).

O 4-P-PDOT reduziu a adesão ao colágeno, inibindo este acontecimento em 15% quando comparado ao grupo veículo. Essas amostras também se diferenciaram do grupo tratado exclusivamente com agomelatina (**Figura 22 – B**).



**Figura 22:** Adesão plaquetária estática ao colágeno de amostras incubadas com agomelatina 2  $\mu$ M PL (n=08) (**A**) concomitantemente incubadas com luzindole e (**B**) concomitantemente incubadas com 4-P-PDOT. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\* p<0,01 vs. Ethanol; \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; ## p<0,01 vs. Agomelatine 2  $\mu$ M

A utilização da maior concentração de agomelatina promoveu redução de 30% da adesão estática ao colágeno, independente da presença de luzindole ou 4-P-PDOT (**Figura 23 – A e B**).

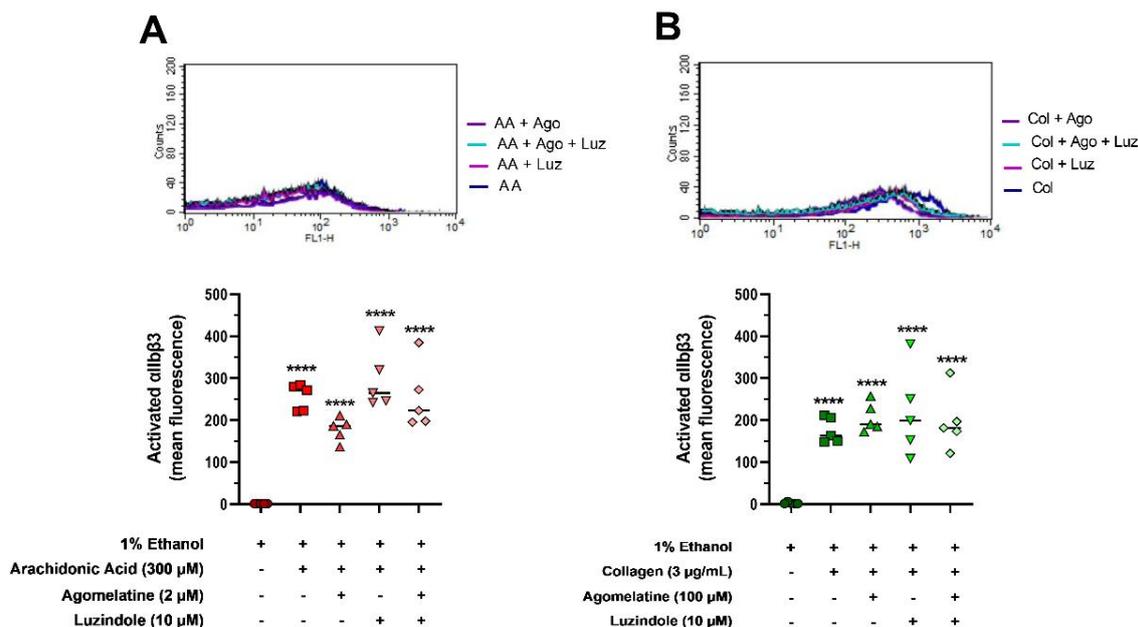


**Figura 23:** Adesão plaquetária estática ao colágeno de amostras incubadas com agomelatina 100 µM PL (n=08) (**A**) concomitantemente incubadas com luzindole e (**B**) concomitantemente incubadas com 4-P-PDOT. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; ##### p<0,0001 vs. Agomelatine 100 µM; \$\$\$\$ p<0,0001 vs. Luzindole 10 µM / 4-P-PDOT 10 µM

O ensaio de adesão estática baseia-se no princípio de que a enzima fosfatase ácida é liberada dos lisossomos e entra em atividade a partir das oscilações de cálcio intracelular, servindo como medida indireta para a ativação plaquetária (99,100). Os resultados encontrados no presente estudo, condizente com o que foi descrito nos experimentos de mobilização de  $Ca^{2+}$ , sugerem que a ativação dos receptores melatoninérgicos, especialmente do  $MT_2$ , modulam negativamente a ativação de plaquetas.

#### *Determinação das mudanças de conformação de integrina GPIIb/IIIa ( $\alpha$ IIB $\beta$ )*

A ativação da integrina  $\alpha$ IIB $\beta$ , tanto em ensaios utilizando o ácido araquidônico quanto o colágeno como estímulo, não foi consideravelmente impactada pela presença de agomelatina, independente da concentração. De forma geral, todas as amostras deste experimento que receberam o estímulo agregante emitiram fluorescências semelhantes entre si, entretanto diferentes do grupo que continha apenas o etanol (**Figura 24 – A e B**).



**Figura 24:** Integrina GPIIb/IIIa ( $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ) ativada, representada pela fluorescência média de PAC-1 em PL (n=06) (A) estimuladas com ácido araquidônico e (B) estimuladas com colágeno. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Ethanol

As GPs são encontradas em dois estados de afinidade: baixa e alta afinidade, as quais são definidas pelas alterações de fosforilação dos seus domínios citoplasmáticos. Dentre as GPs mais notáveis, a  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (GP IIB-IIIa), cujo mecanismo de funcionamento é amplamente explorado na literatura, age através da ligação majoritária com o fibrinogênio ou, em menor grau, fator de von Willebrand (VWF), promovendo a ponte entre plaquetas já ativadas, culminando na agregação plaquetária e, conseqüentemente, na formação do agregado plaquetário.

A mudança de conformação das integrinas é um fenômeno complexo, intimamente relacionada a outros eventos, como adesão e agregação plaquetária. Este evento surge a partir da sinalização bidirecional, processo vital para a hemostasia e estabilização do agregado plaquetário (91,101).

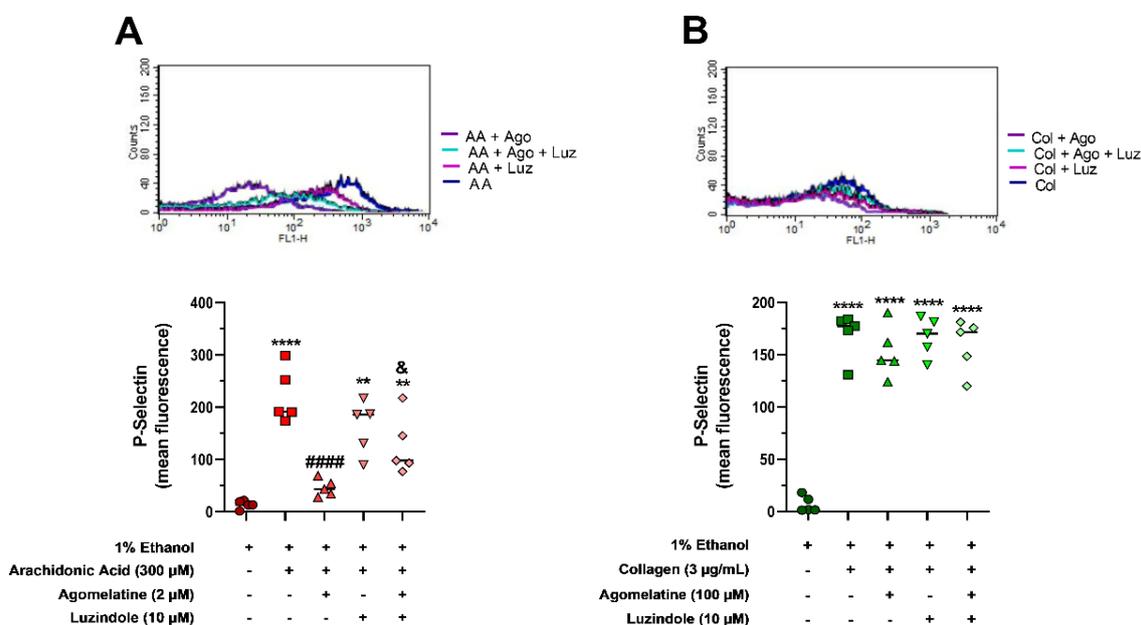
A sinalização *inside-out* desta glicoproteína acontece a partir da ligação de um composto estimulante à um receptor plaquetário, gerando alterações estruturais na cadeia da integrina, especialmente através das proteínas talin e/ou kindlin. Já a forma *outside-in* de sinalização acontece é pela ligação da parte externa desta integrina ao fibrinogênio, levando a uma cascata de sinalização celular que resultarão em adesão e agregação plaquetária (23,102).

Apesar dos impactos observados nos outros ensaios, não foram detectadas alterações significativas na mudança de conformação desta integrina em decorrência do tratamento com agomelatina.

#### Determinação da expressão de P-Selectina

Retomando o padrão apresentado em outros ensaios que utilizaram o ácido araquidônico como estímulo, a exteriorização de p-selectina foi impactada negativamente pela presença da agomelatina. O grupo tratado com o antidepressivo apresentou fluorescência equivalente ao não estimulado, ou seja, amostras que receberam apenas o veículo, ao mesmo tempo que se diferenciou dos outros três grupos estimulados. É interessante ressaltar que as populações que receberam ácido araquidônico, independente da presença de luzindole, deslocaram-se para a esquerda no histograma, ao passo que as amostras que receberam apenas o agonista melatoninérgico como tratamento mantiveram-se à direita (**Figura 25 – A**).

Em relação às amostras estimuladas por colágeno, todos os grupos que receberam esta proteína apresentaram médias de fluorescência máxima semelhantes entre si e expressivamente aumentada em comparação às amostras que foram incubadas apenas com etanol (**Figura 25 – B**).



**Figura 25:** Expressão de P-Selectina, representada pela fluorescência média de CD62P em PL (n=06) (A) estimuladas com ácido araquidônico e (B) estimuladas com colágeno. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\* p<0,01 vs. Ethanol; \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; ##### p<0,0001 vs. Arachidonic Acid 300  $\mu$ M; & p<0,05 vs. Luzindole 10  $\mu$ M

A p-selectina é uma molécula com propriedades adesivas encontrada nos grânulos  $\alpha$  de plaquetas. Após ativação plaquetária, o conteúdo dos grânulos é exteriorizado a partir dos canalículos encontrados no citosol, logo, esta proteína adesiva liga-se a polissacarídeos específicos do endotélio ou de células sanguíneas adjacentes, como monócitos, neutrófilos e dendrócitos (103).

A função da p-selectina é, majoritariamente, promover a aglutinação celular no sítio de lesão, sendo também fator determinante para o tamanho e estabilidade do agregado (104).

A redução da expressão da p-selectina, somente na condição do estímulo do ácido araquidônico, causada pela agomelatina não foi acompanhada pela mudança de conformação da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , o que sugere que a droga não impede totalmente a formação de agregados plaquetários, mas enfraquece a ligação e reduz a estabilidade deste.

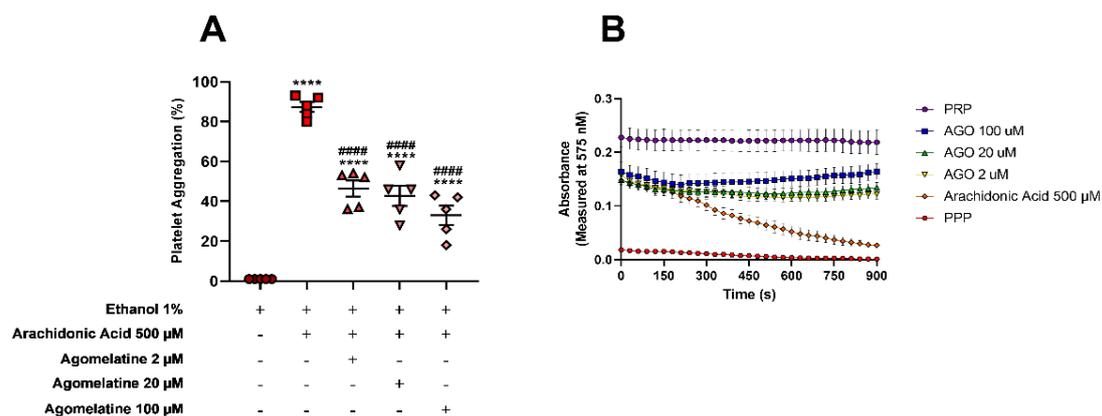
## **Modelo animal**

### *Medida de agregação plaquetária*

Da mesma forma observada nos ensaios com plaquetas humanas, amostras de plasma rico em plaquetas de camundongos isogênicos também foram suscetíveis à ação inibitória da agomelatina.

Quando o estímulo utilizado foi o ácido araquidônico, a concentração de agomelatina se mostrou pouco importante, uma vez que a agregação plaquetária máxima dos grupos tratados se equiparou. Estas amostras apresentaram redução aproximada de 50% em relação ao grupo exclusivamente estimulado. Diferentemente das plaquetas humanas, os grupos incubados com o antidepressivo apresentaram agregação 50 vezes maior do que as amostras que continham apenas o veículo (**Figura 26 – A**).

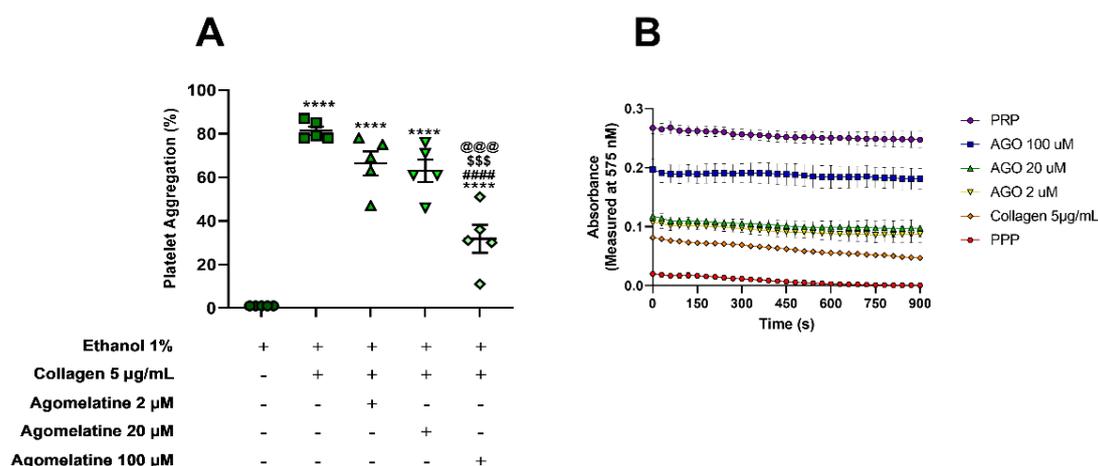
A curva de agregação deste ensaio ilustrou a proximidade entre os grupos tratados com agomelatina, da mesma forma que confirmou que estas amostras apresentaram perfil de agregação intermediário, mantendo-se entre as curvas do grupo exclusivamente estimulado e aquele que recebeu apenas o estímulo (**Figura 26 – B**).



**Figura 26:** Agregação plaquetária em amostras de C57BL6J estimuladas por ácido araquidônico, PRP (n=05) apresentada como (A) porcentagem de agregação máxima e (B) curva de agregação. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; ##### p<0,0001 vs. Arachidonic Acid 500  $\mu$ M;

Diferentemente da condição anterior, ao utilizar colágeno como estímulo, a concentração de agomelatina foi relevante para o desfecho inibitório: as duas menores concentrações apresentaram valores de agregação máxima idênticos ao grupo somente estimulado, enquanto, ao ser comparado com este último, o plasma tratado com 100  $\mu$ M do antidepressivo teve agregação reduzida em aproximadamente 65% (**Figura 27 – A**).

A curva de agregação deste experimento evidenciou o destacamento das amostras que receberam a maior concentração do agonista melatoninérgico em relação aos outros três grupos estimulados, embora ainda mantivessem agregação super ao plasma não estimulado (**Figura 27**).

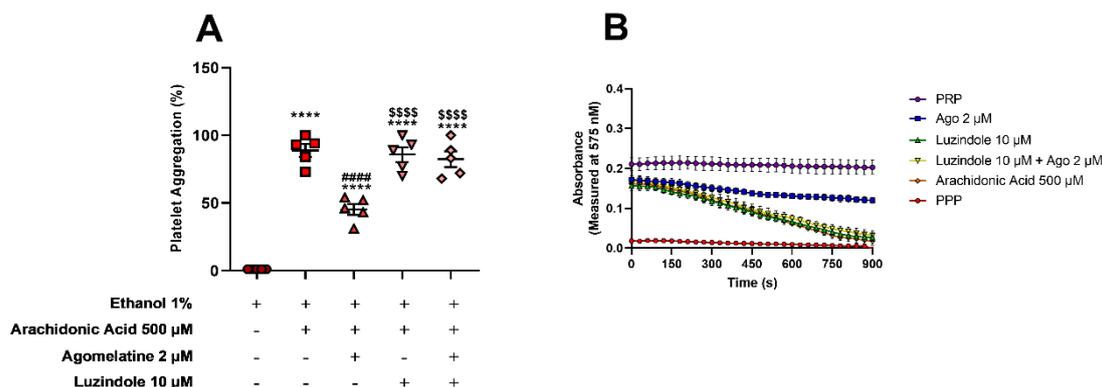


**Figura 27:** Agregação plaquetária em amostras de C57BL6J estimuladas por colágeno, PRP (n=05) apresentada como (A) porcentagem de agregação máxima e (B) curva de agregação. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; ##### p<0,0001 vs. Arachidonic Acid 500  $\mu$ M; \$\$\$ p<0,001 vs. Agomelatine 2  $\mu$ M; @@@ p<0,001 vs. Agomelatine 20  $\mu$ M

Em consonância com os procedimentos feitos em plaquetas humanas, o ensaio de agregação com plasma tratado com antagonista de receptores melatoninêrgicos, em associação ou não com a agomelatina, foi conduzido com amostras de camundongos.

O resultado obtido com a utilização do luzindole nos experimentos que utilizaram o ácido araquidônico como estímulo foram idênticos aos observados com amostras humanas: a inibição incitada pela agomelatina foi revertida pela utilização concomitante do antagonista, entretanto, a inibição não foi potente o suficiente para igualar o grupo tratada exclusivamente com o antidepressivo às amostras não estimuladas (**Figura 28 – A**).

Complementando o que foi escrito acima, a curva de agregação deste ensaio demonstrou que a população que recebeu apenas o agonista melatoninêrgico apresentou agregação intermediária, com valores entre aquelas que não foram estimuladas e os outros três grupos que receberam colágeno (**Figura 28 – B**).

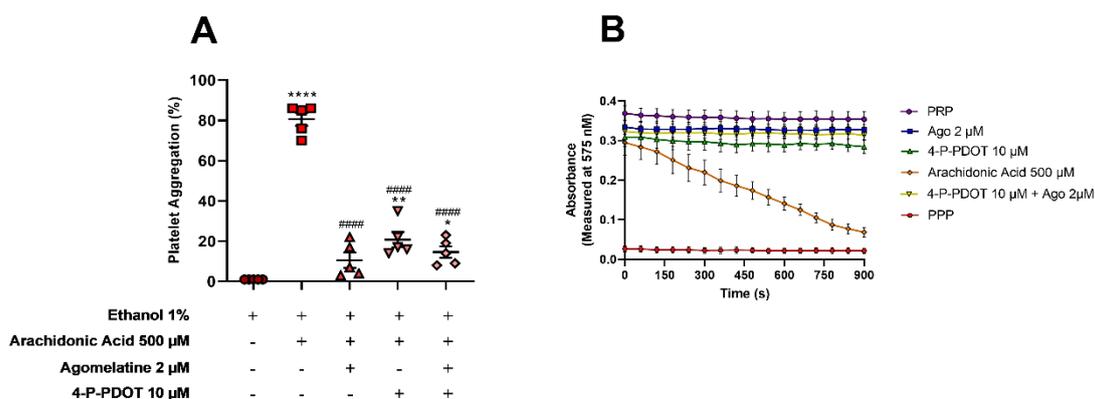


**Figura 28:** Agregação plaquetária em amostras de C57BL/6J estimuladas com ácido araquidônico e incubadas com luzindole apresentada como (A) porcentagem de agregação máxima e (B) curva de agregação. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Ethanol; #####  $p < 0,0001$  vs. Arachidonic Acid 500  $\mu$ M; \$\$\$\$  $p < 0,001$  vs. Agomelatine 2  $\mu$ M

Pautado no histórico de ação do 4-P-PDOT em plaquetas humanas, o experimento com este antagonista frente amostras estimuladas com ácido araquidônico apresentou o mesmo padrão: todas as amostras que foram previamente tratadas, seja com o 4-P-PDOT e/ou agomelatina, agregaram cerca de quatro vezes menos do que aquelas exclusivamente estimuladas (**Figura 29 – A**).

As curvas de agregação reproduziram de maneira consistente o que foi constatado pelo gráfico de porcentagem máxima de agregação. Sendo assim, é possível observar que a agregação expressiva ocorre apenas nas amostras que receberam apenas o estímulo, ao

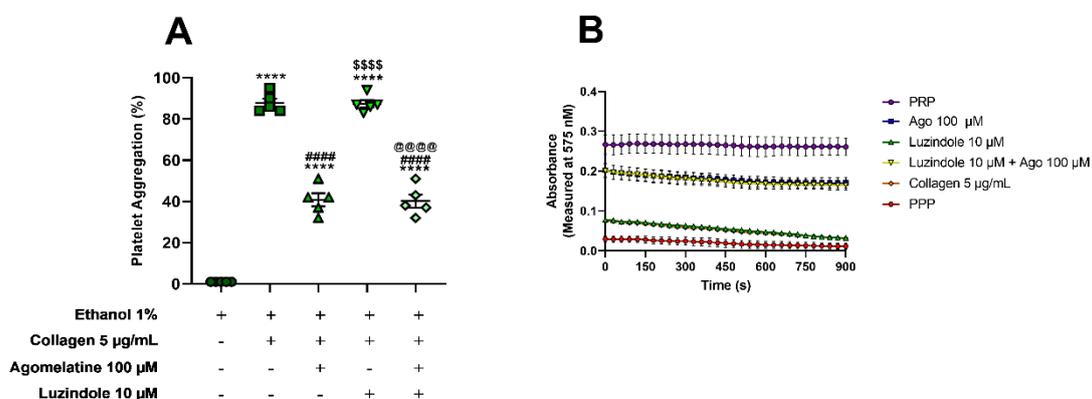
passo que os outros grupos mantiveram agregações plaquetárias consideravelmente baixas (**Figura 29 – B**).



**Figura 29:** Agregação plaquetária em amostras de C57BL/6J estimuladas com ácido araquidônico e incubadas com 4-P-PDOT apresentada como (A) porcentagem de agregação máxima e (B) curva de agregação. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*  $p < 0,05$  vs. Ethanol; \*\*  $p < 0,01$  vs. Ethanol; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Ethanol; #####  $p < 0,0001$  vs. Arachidonic Acid 500  $\mu$ M

Uma vez mais, o plasma de camundongos isogênicos apresentou comportamento semelhante ao observado em humanos: a capacidade inibitória da agomelatina manteve-se intacta, independente da presença de luzindole. Ambos os grupos tratados com o antidepressivo tiveram redução de, aproximadamente, 55% em relação tanto ao que foi somente estimulado quanto o que também recebeu somente o antagonista (**Figura 30 – A**).

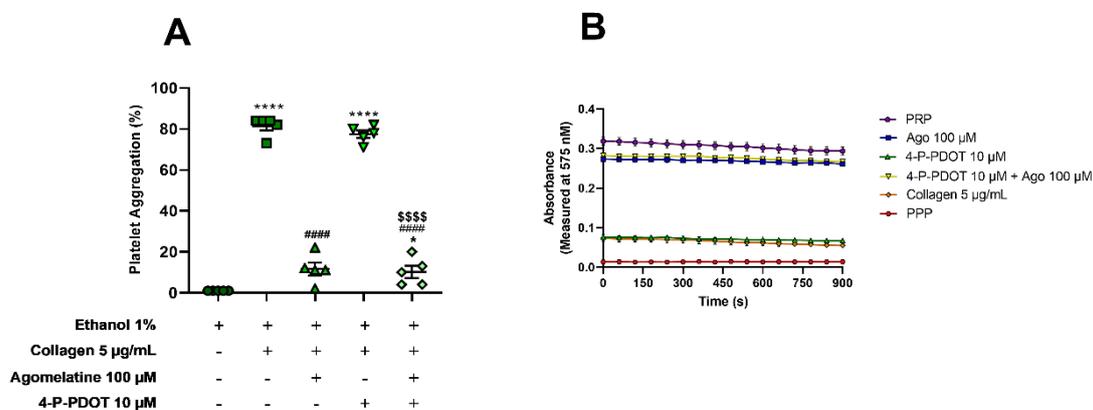
No gráfico contendo as curvas de agregação, fica nítido a distinção entre as duas populações compostas pelos grupos luzindole e colágeno versus agomelatina e luzindole + agomelatina. Os dois primeiros apresentam perfil de agregação tão semelhantes que suas curvas são praticamente indistinguíveis. O mesmo ocorre com os dois grupos que contém o antidepressivo (**Figura 30 – B**).



**Figura 30:** Agregação plaquetária em amostras de C57BL/6J estimuladas com colágeno e incubadas com luzindole apresentada como (A) porcentagem de agregação máxima e (B) curva de agregação. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Ethanol; #####  $p < 0,0001$  vs. Arachidonic Acid 500  $\mu$ M; \$\$\$\$  $p < 0,0001$  vs. Agomelatine 100  $\mu$ M; @@@@  $p < 0,0001$  vs. Luzindole 10  $\mu$ M

Tal qual o experimento supracitado, os efeitos inibitórios da agomelatina sobrepujaram o possível bloqueio da utilização do antagonista de receptor  $MT_2$ . O antidepressivo causou redução de 75% da agregação nas amostras que o receberam, em comparação ao grupo somente estimulado. Da mesma forma observada em humanos, o 4-P-PDOT não propiciou redução na agregação plaquetária (**Figura 31 – A**).

Interessantemente, as curvas de agregação neste ensaio foram muito parecidas com as obtidas anteriormente, com luzindole. Os dois grupos tratados com agomelatina aparecem agrupados próximo a curva das amostras não estimuladas, ao passo que as duas populações estimuladas restantes acumularam-se próximo ao controle positivo (**Figura 31 – B**).



**Figura 31:** Agregação plaquetária em amostras de C57BL/6J estimuladas com colágeno e incubadas com 4-P-PDOT apresentada como (A) porcentagem de agregação máxima e (B) curva de agregação. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Ethanol; ####  $p < 0,0001$  vs. Arachidonic Acid 500  $\mu\text{M}$ ; \$\$\$\$  $p < 0,0001$  vs. 4-P-PDOT 10  $\mu\text{M}$

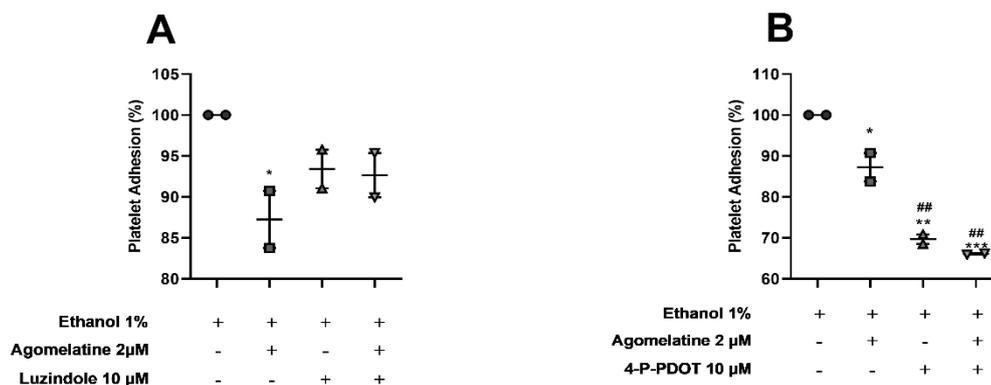
Já foi descrito na literatura que as plaquetas de camundongos se assemelham estruturalmente a de humanos, exceto pelo tamanho, volume circulante e possuir maior densidade de grânulos. A presença de enzimas como ciclooxygenase, lipoxigenase e diversos receptores plaquetários também já foi descrita nestes fragmentos celulares de roedores (83,105).

Por apresentar um padrão equivalente ao observado nos ensaios com amostras de plasma humano, é possível inferir que, assim como abordado nos experimentos anteriores, a agomelatina afeta a atividade plaquetária, causando redução na agregação plaquetária. Este fenômeno parece ser dependente da ativação dos receptores melatoninérgicos quando o estímulo empregado era o ácido araquidônico, o que sugere bloqueio da ação da COX-1, ao passo que a inibição da agregação estimulada por colágeno parece ser independente de  $MT_1/MT_2$ .

### Medida de adesão plaquetária estática

Seguindo o padrão verificado em amostras humanas, a agomelatina, na concentração 2  $\mu$ M, foi capaz de promover redução na adesão de plaquetas ao fibrinogênio. Entretanto, é importante destacar que o efeito observado no ensaio com amostras de C57 foi menor, promovendo redução de apenas 10% em relação ao grupo incubado apenas com o veículo. Os outros dois grupos tratados não se mostraram diferentes do restante (**Figura 32 – A**).

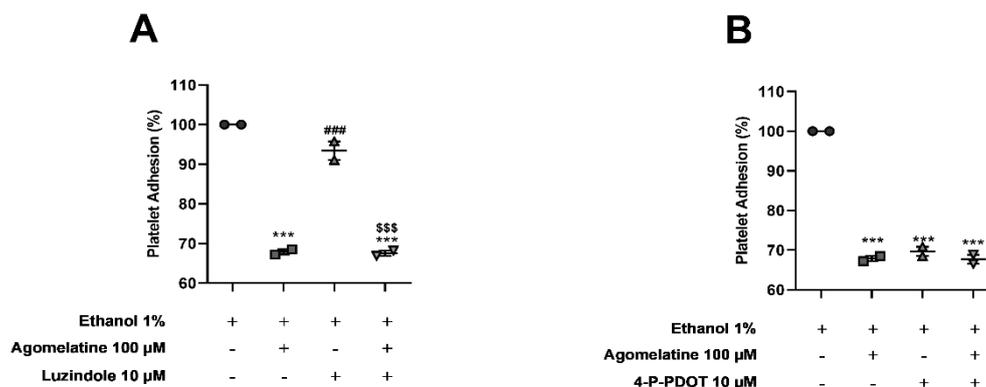
Inusitadamente, o 4-P-PDOT foi capaz de reduzir a adesão plaquetária em 30%, independentemente da utilização concomitante de agomelatina. Nos ensaios em humanos, o agonista melatoninérgico se mostrou um agente inibitório mais potente do que o antagonista, entretanto este padrão foi oposto em plaquetas de camundongos (**Figura 32 – B**).



**Figura 32:** Adesão plaquetária estática ao fibrinogênio de amostras incubadas com agomelatina 2  $\mu$ M PL (n=02) (**A**) concomitaneamente incubadas com luzindole e (**B**) concomitaneamente incubadas com 4-P-PDOT. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \* p<0,05 vs. Ethanol; \*\* p<0,01 vs. Ethanol; \*\*\* p<0,001 vs. Ethanol; ## p<0,01 vs. Agomelatine 2  $\mu$ M

A maior concentração de agomelatina usada foi capaz de promover notável inibição da adesão ao fibrinogênio, obtendo valores semelhantes aos observados nos experimentos com plaquetas humanas. A utilização concomitante com luzindole não foi capaz de impedir a ação da agomelatina, visto que o grupo que recebeu simultaneamente o antagonista e o antidepressivo apresentou redução de 30% em relação às amostras que receberam somente o veículo etanol – mesma porcentagem atingida pelo grupo tratado exclusivamente com agomelatina (**Figura 33 – A**).

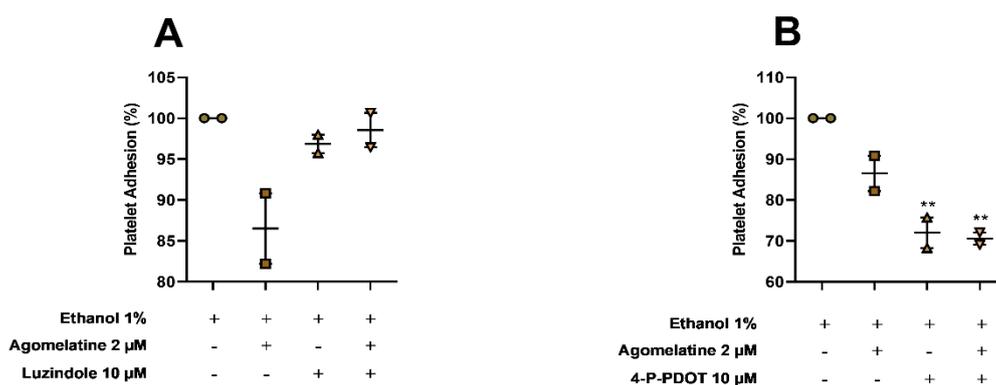
Ao utilizar o 4-P-PDOT como antagonista, é possível identificar que as três populações tratadas apresentaram o mesmo decaimento de adesão em comparação ao grupo tratado apenas com veículo (**Figura 33 – B**).



**Figura 33:** Adesão plaquetária estática ao fibrinogênio de amostras incubadas com agomelatina 100 µM PL (n=02) (**A**) concomitantemente incubadas com luzindole e (**B**) concomitantemente incubadas com 4-P-PDOT. Valores expressos em média ± SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\*\* p<0,001 vs. Ethanol; ### p<0,001 vs. Agomelatine 100 µM; \$\$\$ p<0,001 vs. Luzindole 10 µM

A adesão ao colágeno não foi especialmente afetada pela agomelatina a 2 µM. Os ensaios utilizando luzindole não apresentaram grupos diferentes entre si (**Figura 34 – A**).

A presença do 4-P-PDOT nos ensaios com amostras de camundongo atuou de maneira mais intensa do que a detectada nos experimentos com humanos. A inibição promovida nos grupos incubados com o antagonista de MT<sub>2</sub> foi de quase 30% em comparação ao grupo que continha apenas etanol (**Figura 34 – B**).

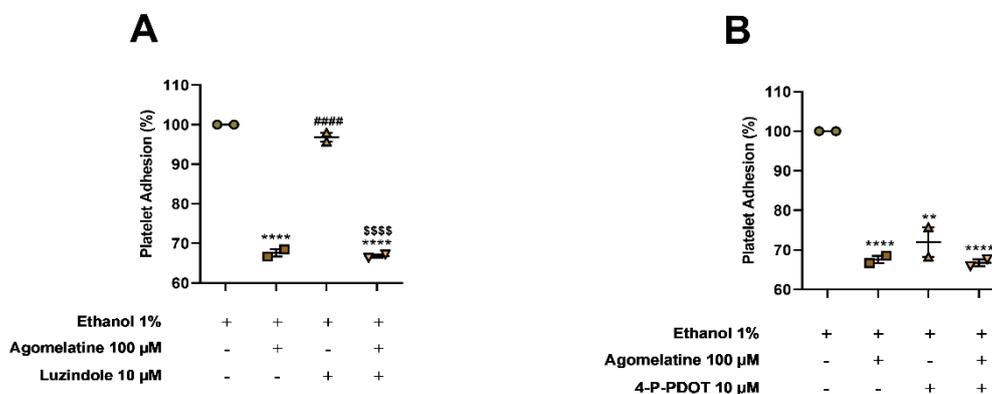


**Figura 34:** Adesão plaquetária estática ao colágeno de amostras incubadas com agomelatina 2 µM PL (n=02) (**A**) concomitantemente incubadas com luzindole e (**B**) concomitantemente incubadas com 4-P-PDOT. Valores expressos em média ± SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\* p<0,01 vs. Ethanol

O padrão de adesão ao colágeno nos ensaios que utilizaram a maior concentração de agomelatina foi semelhante ao observado em amostras humanas.

O antidepressivo, em 100  $\mu\text{M}$ , foi capaz de reduzir a adesão em cerca de 30% em comparação às amostras tratadas apenas com o veículo. O grupo que recebeu concomitantemente luzindole e agomelatina apresentou inibição idêntica ao que foi tratado exclusivamente com o agonista melatoninérgico (**Figura 35 – A**).

Da mesma maneira observada nos ensaios com plaquetas humanas, tanto a maior concentração de agomelatina quanto o 4-P-PDOT foram capazes de inibir a adesão ao colágeno. A associação destas duas drogas, entretanto, não potencializou o resultado obtido individualmente (**Figura 35 – B**).



**Figura 35:** Adesão plaquetária estática ao colágeno de amostras incubadas com agomelatina 100  $\mu\text{M}$  PL (n=02) (**A**) concomitantemente incubadas com luzindole e (**B**) concomitantemente incubadas com 4-P-PDOT. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: \*\* p<0,01 vs. Ethanol; \*\*\*\* p<0,0001 vs. Ethanol; ##### p<0,0001 vs. Agomelatina 100  $\mu\text{M}$ ; \$\$\$\$ p<0,0001 vs. Luzindole 10  $\mu\text{M}$

Tal qual o ensaio de adesão com plaquetas humanas, os resultados com plaquetas lavadas de camundongos demonstraram que a ativação plaquetária também foi afetada pelo tratamento prévio com agomelatina e revertido pela presença do luzindole, isto é, quando a concentração do antidepressivo era 2  $\mu\text{M}$ .

É interessante ressaltar que a atividade plaquetária de camundongos é notavelmente maior e mais veloz do que a humana: enquanto estes roedores têm tempo médio de sangramento de 2,5 minutos, humanos podem chegar até 7 minutos (105). Sendo assim, o efeito do agonista melatoninérgico, mesmo na sua menor concentração, foi suficientemente capaz de promover redução na adesão ao fibrinogênio, indicando o possível impacto da ativação dos receptores melatoninérgicos no controle da ativação de plaquetas.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a utilização da agomelatina mostra-se promissora na prevenção de eventos cardiovasculares decorrentes da disfunção plaquetária, uma vez que este antidepressivo promove redução da atividade de plaquetas.

Em suma, a agomelatina reduz a adesão ao fibrinogênio, bem como a agregação plaquetária, produção de tromboxano, mobilização de cálcio e expressão de p-selectina, todos estes induzidos por ácido araquidônico, ao passo que aumentou os níveis intracelulares de AMPc. Estes achados parecem ser dependentes de receptores MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub>, uma vez que a utilização do antagonista melatoninérgico luzindole impediu as a ocorrência de tais fenômenos.

Os efeitos supracitados foram causados pela menor concentração de agomelatina empregada nos ensaios, ou seja, 2  $\mu$ M, valor correspondente a uma dose de 25mg do medicamento ingerido via oral.

Já a maior concentração utilizada (100  $\mu$ M) não pode ser atingida terapêuticamente e se mostrou independente dos receptores melatoninérgicos, uma vez que não ocorreu bloqueio de ação com a utilização concomitante do antagonista.

Por fim, os resultados gerados a partir do modelo animal demonstraram padrões semelhantes aos observados em humanos, logo, a utilização de camundongos surge como alternativa de desenho experimental para outros estudos que pretendem investigar a ação dos receptores melatoninérgicos em plaquetas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization (WHO). Mental health. [https://www.who.int/health-topics/mental-health#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/mental-health#tab=tab_1). 2022.
2. World Health Organization (WHO). Depression. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>. 2021.
3. Santomauro DF, Mantilla Herrera AM, Shadid J, Zheng P, Ashbaugh C, Pigott DM, et al. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. *The Lancet*. 2021 Nov 6;398(10312):1700–12.
4. World Health Organization (WHO). COVID-19 pandemic triggers 25% increase in prevalence of anxiety and depression worldwide. <https://www.who.int/news/item/02-03-2022-covid-19-pandemic-triggers-25-increase-in-prevalence-of-anxiety-and-depression-worldwide>. 2022.
5. Lapi F, Simonetti M, Michieli R, Pasqua A, Brandi ML, Frediani B, et al. Assessing 5-year incidence rates and determinants of osteoporotic fractures in primary care. *Bone*. 2012 Jan;50(1):85–90.
6. Ahmedani BK, Peterson EL, Wells KE, Williams LK. Examining the relationship between depression and asthma exacerbations in a prospective follow-up study. *Psychosomatic Medicine*. 2013;75(3):305–10.
7. Agüera-Ortiz L, Failde I, Mico JA, Cervilla J, López-Ibor JJ. Pain as a symptom of depression: Prevalence and clinical correlates in patients attending psychiatric clinics. *Journal of Affective Disorders*. 2011 Apr;130(1–2):106–12.
8. Yu M, Zhang X, Lu F, Fang L. Depression and Risk for Diabetes: A Meta-Analysis. *Canadian Journal of Diabetes*. 2015 Aug 1;39(4):266–72.
9. Ford DE, Mead LA, Chang PP, Cooper-Patrick L, Wang NY, Klag MJ. Depression Is a Risk Factor for Coronary Artery Disease in Men The Precursors Study [Internet]. Available from: <http://archinte.jamanetwork.com/>
10. Aromaa A, Raitasalo R, Heliovaara M, Lehtinen KP, Joukamaa M, Maatela J. Depression and cardiovascular diseases.
11. Sotelo JL, Nemeroff CB. Depression as a systemic disease. *Personalized Medicine in Psychiatry* [Internet]. 2017;1–2:11–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmip.2016.11.002>
12. Jiang W, Krishnan RRR, O’connor CM. Depression and Heart Disease Evidence of a Link, and its Therapeutic Implications.
13. Surtees PG, Wainwright NW, Luben RN, Wareham NJ, Bingham SA, Khaw KT. Depression and Ischemic Heart Disease Mortality: Evidence From the EPIC-Norfolk United Kingdom Prospective Cohort Study. Vol. 165, *Am J Psychiatry*. 2008.

14. Julio GP filho, Wong LM li. Pathophysiological basis of cardiovascular disease and depression : a chicken-and-egg dilemma Bases fisiopatológicas da doença cardiovascular e depressão : um dilema do ovo e da galinha. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2010;32:181–92.
15. Fritsma GA. Platelet structure and function. *Clinical Laboratory Science*. 2015;28(2):125–31.
16. Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY. Platelet activation: The mechanisms and potential biomarkers. *BioMed Research International*. 2016;2016:10–4.
17. van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nature Reviews Cardiology* [Internet]. 2019;16(3):166–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-018-0110-0>
18. Nagy Z, Senis YA. Platelet inhibitory receptors [Internet]. 4th ed. *Platelets*. Elsevier Inc.; 2019. 279–293 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813456-6.00015-1>
19. Gawaz M, Borst O. The role of platelets in atherothrombosis [Internet]. 4th ed. *Platelets*. Elsevier Inc.; 2019. 459–467 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813456-6.00026-6>
20. Smith SA, Morrissey JH. Interactions between platelets and the coagulation system [Internet]. 4th ed. *Platelets*. Elsevier Inc.; 2019. 393–400 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813456-6.00021-7>
21. Alarayed N, Graham B, Prichard B, Smith C. The potentiation of adrenaline-induced in vitro platelet aggregation by ADP, collagen and serotonin and its inhibition by naftopidil and doxazosin in normal human subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1995;39(4):369–74.
22. Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;7(7):1057–66.
23. Bledzka K, Qin J, Plow EF. Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Platelets*. 2019;227–41.
24. Nieswandt B, Varga-Szabo D, Elvers M. Integrins in platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;7(SUPPL. 1):206–9.
25. Davlouros P, Xanthopoulou I, Mparampoutis N, Giannopoulos G, Deftereos S, Alexopoulos D. Role of Calcium in Platelet Activation: Novel Insights and Pharmacological Implications. *Medicinal Chemistry*. 2016;12(2):131–8.
26. Wonerow P, Pearce AC, Vaux DJ, Watson SP. A critical role for phospholipase  $Cy2$  in  $\alpha$ IIb $\beta$  3-mediated platelet spreading. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(39):37520–9.
27. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2010 Dec;30(12):2341–9.

28. Musselman DL, Tomer A, Manatunga AK, Knight BT, Porter MR, Kasey S, et al. Exaggerated platelet reactivity in major depression. *American Journal of Psychiatry*. 1996;153(October):1313–7.
29. Can MM, Guler G, Guler E, Ozveren O, Turan B, Dinicolantino JJ, et al. Enhanced platelet reactivity in pediatric depression: An observational study. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 2015 Jan 1;26(7):731–5.
30. Walsh MT, Dinan TG, Condren RM, Ryan M, Kenny D. Depression is associated with an increase in the expression of the platelet adhesion receptor glycoprotein Ib. *Life Sciences*. 2002;70(26):3155–65.
31. Nemeroff CB, Musselman DL. Are platelets the link between depression and ischemic heart disease? *American Heart Journal*. 2000;140(4 SUPPL.).
32. Piletz J, Zhu H, Madakasira S, Pazzaglia P, Lindsay DeVane C, Goldman N, et al. Elevated p-selectin on platelets in depression: response to bupropion [Internet]. Available from: [www.elsevier.com/locate/jpsychires](http://www.elsevier.com/locate/jpsychires)
33. Schins A, Hamulyák K, Scharpé S, Lousberg R, van Melle J, Crijns H, et al. Whole blood serotonin and platelet activation in depressed post-myocardial infarction patients. *Life Sciences*. 2004 Dec 24;76(6):637–50.
34. Hrdina PD, Bakish D, Ravindrana A, Chudzik J, Cavazzonia P, Lapierre YD. Platelet serotonergic indices in major depression: up-regulation of 5-HT<sub>2</sub> receptors unchanged by antidepressant treatment. Vol. 66, *Psychiatry Research*. 1997.
35. Arora RC, Meltzer HY. Increased serotonin<sub>2</sub> (5-HT<sub>2</sub>) receptor binding as measured by 3H-lysergic acid diethylamide (3H-LSD) in the blood platelets of depressed patients. *Life Sciences*. 1989;44:725–34.
36. Kusumi I, Koyama T, Yamashita I. Serotonin-induced platelet intracellular calcium mobilization in depressed patients. Vol. 113, *Psychopharmacology*. 1994.
37. Eckert A, Gann H, Riemann D, Aldenhoff J, Moiler WE. Elevated Intracellular Calcium Levels after 5-HT<sub>2</sub> Receptor Stimulation in Platelets of Depressed Patients. Vol. 565, *BIOL PSYCHIATRY*. 1993.
38. Halperin D, Reber G. Influence of antidepressants on hemostasis. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2007;9(1):47–59.
39. Bismuth-Evenzal Y, Gonopolsky Y, Gurwitz D, Iancu I, Weizman A, Rehavi M. Decreased serotonin content and reduced agonist-induced aggregation in platelets of patients chronically medicated with SSRI drugs. *Journal of Affective Disorders*. 2012 Jan;136(1–2):99–103.
40. Hallbäck I, Hägg S, Eriksson AC, Whiss PA. In vitro effects of serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors on human platelet adhesion and coagulation. *Pharmacological Reports*. 2012;64(4):979–83.
41. Meijer WEE, Heerdink ER, Nolen WA, Herings RMC, Hubert ;, Leufkens GM, et al. Association of Risk of Abnormal Bleeding With Degree of Serotonin Reuptake

- Inhibition by Antidepressants [Internet]. Available from: <http://archinte.jamanetwork.com/>
42. Montgomery SA, Baldwin DS, Blier P, Fineberg NA, Kasper S, Lader M, et al. Which antidepressants have demonstrated superior efficacy? A review of the evidence. Vol. 22, *International Clinical Psychopharmacology*. Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
  43. le Strat Y, Gorwood P. Agomelatine, an innovative pharmacological response to unmet needs. *J Psychopharmacol*. 2008;22(7 Suppl):4–8.
  44. de Bodinat C, Guardiola-Lemaitre B, Mocaër E, Renard P, Muñoz C, Millan MJ. Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: Discovery, characterization and development. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010;9(8):628–42.
  45. Guardiola-Lemaitre B, de Bodinat C, Delagrangé P, Millan MJ, Muñoz C, Mocaër E. Agomelatine: Mechanism of action and pharmacological profile in relation to antidepressant properties. *British Journal of Pharmacology*. 2014;171(15):3604–19.
  46. Slee A, Nazareth I, Bondaronek P, Liu Y, Cheng Z, Freemantle N. Pharmacological treatments for generalised anxiety disorder: a systematic review and network meta-analysis. *The Lancet*. 2019 Feb 23;393(10173):768–77.
  47. Cipriani A, Furukawa TA, Salanti G, Chaimani A, Atkinson LZ, Ogawa Y, et al. Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. *The Lancet*. 2018 Apr 7;391(10128):1357–66.
  48. Millan MJ, Gobert A, Lejeune F, Dekeyne A, Pasteau V, Cussac D. The Novel Melatonin Agonist Agomelatine (S20098) Is an Antagonist at 5-Hydroxytryptamine. *Pharmacology*. 2003;306(3):954–64.
  49. Diaz SL, Doly S, Narboux-Nme N, Fernández S, Mazot P, Banas SM, et al. 5-HT<sub>2B</sub> receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions. *Molecular Psychiatry*. 2012 Feb;17(2):154–63.
  50. Diaz SL, Doly S, Narboux-Nme N, Fernández S, Mazot P, Banas SM, et al. 5-HT<sub>2B</sub> receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions. *Molecular Psychiatry*. 2012 Feb;17(2):154–63.
  51. Przyklenk K, Frelinger AL, Linden MD, Whittaker P, Li Y, Barnard MR, et al. Targeted inhibition of the serotonin 5HT<sub>2A</sub> receptor improves coronary patency in an in vivo model of recurrent thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010 Feb;8(2):331–40.
  52. Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, Popovska-Gorevski M, Dubocovich ML. MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. Vol. 56, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Annual Reviews Inc.; 2016. p. 361–83.

53. Stauch B, Johansson LC, McCorvy JD, Patel N, Han GW, Huang XP, et al. Structural basis for ligand recognition at the human MT1 melatonin receptor. *Nature*. 2019;569:284–288.
54. Reiter RJ, Tan DX, Lorena FB. Melatonin: A multitasking molecule [Internet]. First edit. Vol. 181, *Progress in Brain Research*. Elsevier; 2010. 127–151 p. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)81008-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6123(08)81008-4)
55. Wurtman RJ, Axelrod J. The Formation, Metabolism, and Physiologic Effects of Melatonin \*?
56. Zhang JJ, Meng X, Li Y, Zhou Y, Xu DP, Li S, et al. Effects of melatonin on liver injuries and diseases. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2017.
57. Xu P, Wang J, Hong F, Wang S, Jin X, Xue T, et al. Melatonin prevents obesity through modulation of gut microbiota in mice. *Journal of Pineal Research*. 2017 May 1;62(4).
58. Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, energy metabolism, and obesity: A review. Vol. 56, *Journal of Pineal Research*. Blackwell Publishing Ltd; 2014. p. 371–81.
59. Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Tan DX, Acuna-Castroviejo D, Qin L, Yang SF, et al. Melatonin, a full service anti-cancer agent: Inhibition of initiation, progression and metastasis. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2017.
60. Pandi-Perumal SR, BaHammam AS, Ojike NI, Akinseye OA, Kendzerska T, Buttoo K, et al. Melatonin and Human Cardiovascular Disease. Vol. 22, *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. SAGE Publications Ltd; 2017. p. 122–32.
61. Yaprak M, Altun A, Vardar A, Aktoz M, Ciftci S, Ozbay G. Decreased nocturnal synthesis of melatonin in patients with coronary artery disease. *International Journal of Cardiology*. 2003;89(1):103–7.
62. Grossman E, Laudon M, Zisapel N. Effect of melatonin on nocturnal blood pressure: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Vascular Health and Risk Management*. 2011;7(1):577–84.
63. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia MJ. Decreased nocturnal melatonin levels during acute myocardial infarction. *J Pineal Res*. 2002;33:248–52.
64. Kornblihtt LI, Finocchiaro L, Molinas FC. Inhibitory effect of melatonin on platelet activation induced by collagen and arachidonic acid. *J Pineal Res*. 1993;14:184–91.
65. De M, del Zarf LM, Martinuzzo M, Falcon C, Cardinali DP, Carreras LO, et al. Inhibition of Human Platelet Aggregation and Thromboxane-B<sub>2</sub> Production by

- Melatonin: Evidence for a Diurnal Variation\*. Vol. 70, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1990.
66. Obayashi K, Saeki K, Kurumatani N. Higher melatonin secretion is associated with lower leukocyte and platelet counts in the general elderly population: The Kyo-Heijo cohort. *Journal of Pineal Research*. 2015;58(2):227–33.
  67. Zhang Y, Wang Y, Xu J, Tian F, Hu S, Chen Y, et al. Melatonin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via improving mitochondrial fusion/mitophagy and activating the AMPK-OPA1 signaling pathways. *Journal of Pineal Research*. 2019 Mar 1;66(2).
  68. Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J. International union of basic and clinical pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. Vol. 62, *Pharmacological Reviews*. 2010. p. 343–80.
  69. Boiko DI, Shkodina AD, Hasan MM, Bardhan M, Kazmi SK, Chopra H, et al. Melatonergic Receptors (Mt1/Mt2) as a Potential Additional Target of Novel Drugs for Depression. *Neurochemical Research*. Springer; 2022.
  70. Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptor. *Frontiers in Bioscience*. 2003;8:1093–108.
  71. Oishi A, Gbahou F, Jockers R. Melatonin receptors, brain functions, and therapies. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2021. p. 345–56.
  72. Onuma T, Tanabe K, Kito Y, Tsujimoto M, Uematsu K, Enomoto Y, et al. Sphingosine 1-phosphate (S1P) suppresses the collagen-induced activation of human platelets via S1P4 receptor. *Thrombosis Research*. 2017 Aug 1;156:91–100.
  73. Brunkhorst R, Pfeilschifter W, Rajkovic N, Pfeffer M, Fischer C, Korf HW, et al. Diurnal regulation of sphingolipids in blood. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2019 Mar 1;1864(3):304–11.
  74. Yatorni Y, Ruan F, Hakomori SI, Lgarashi Y. Sphingosine-1-Phosphate: A Platelet-Activating Sphingolipid Released From Agonist-Stimulated Human Platelets.
  75. Kumari S, Dash D. Melatonin elevates intracellular free calcium in human platelets by inositol 1,4,5-trisphosphate independent mechanism. *FEBS Letters* [Internet]. 2011;585(14):2345–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.067>
  76. Yau MYC, Pang CS, Kravtsov G. 2[125I] Iodomelatonin binding sites in guinea pig platelets. *J Pineal Res*. 2002;32:97–105.
  77. Mendes-Silvério CB, Alexandre EM, Lescano CH, Antunes E, Mónica FZ. Mirabegron, a  $\beta_3$ -adrenoceptor agonist reduced platelet aggregation through cyclic

- adenosine monophosphate accumulation. *European Journal of Pharmacology*. 2018 Jun 15;829:79–84.
78. Mendes-Silverio CB, Leiria LOS, Morganti RP, Anhô GF, Marcondes S, Mónica FZ, et al. Activation of Haem-Oxidized Soluble Guanylyl Cyclase with BAY 60-2770 in Human Platelets Lead to Overstimulation of the Cyclic GMP Signaling Pathway. *PLoS ONE*. 2012 Nov 8;7(11).
  79. Mendes-Silverio CB, Lescano CH, Zaminelli T, Sollon C, Anhô GF, Antunes E, et al. Activation of soluble guanylyl cyclase with inhibition of multidrug resistance protein inhibitor-4 (MRP4) as a new antiplatelet therapy. *Biochemical Pharmacology*. 2018 Jun 1;152:165–73.
  80. Nga NTH, Ngoc TTB, Trinh NTM, Thuoc TL, Thao DTP. Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. *Analytical Biochemistry*. 2020 Dec 1;610.
  81. Naumann GB, Silva LF, Silva L, Faria G, Richardson M, Evangelista K, et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2011 Jul;1810(7):683–94.
  82. Eriksson AC, Whiss PA. Characterization of static adhesion of human platelets in plasma to protein surfaces in microplates. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 2009 Apr;20(3):197–206.
  83. Rosenblum WI, Nelson GH, Cockrell CS, Ellis EF. Some properties of mouse platelets. *Thrombosis Research*. 1983;30:347–55.
  84. Chan M v., Warner TD. Standardised optical multichannel (optimul) platelet aggregometry using high-speed shaking and fixed time point readings. Vol. 23, *Platelets*. 2012. p. 404–8.
  85. Thomas SG. The structure of resting and activated platelets [Internet]. 4th ed. *Platelets*. Elsevier Inc.; 2019. 47–77 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813456-6.00003-5>
  86. Rao GHR, White JG. Role of arachidonic acid metabolism in human platelet activation and irreversible aggregation. *American Journal of Hematology*. 1985;19(4):339–47.
  87. FitzGerald GA. Mechanisms of platelet activation: Thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. *The American Journal of Cardiology*. 1991;68(7).
  88. Munnix ICA, Strehl A, Kuijpers MJE, Auger JM, van der Meijden PEJ, van Zandvoort MAM, et al. The glycoprotein VI-phospholipase C $\gamma$ 2 signaling pathway controls thrombus formation induced by collagen and tissue factor in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25(12):2673–8.

89. Surin WR, Barthwal MK, Dikshit M. Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: Emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. *Thrombosis Research*. 2008;122(6):786–803.
90. Lotufo CMC, Lopes C, Dubocovich ML, Farsky SHP, Markus RP, Brazil B, et al. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation [Internet]. Vol. 430, *European Journal of Pharmacology*. 2001. Available from: [www.elsevier.com/locate/ejphar](http://www.elsevier.com/locate/ejphar)
91. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet receptors [Internet]. 4th ed. *Platelets*. Elsevier Inc.; 2019. 169–192 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813456-6.00009-6>
92. Hayward CPM, Moffat KA. Platelet aggregation [Internet]. 4th ed. Vol. 3, *Platelets*. Elsevier Inc.; 2019. 609–626 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813456-6.00034-5>
93. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(8):2994–8.
94. Lopez JJ, Salido GM, Rosado JA. Cardiovascular and hemostatic disorders: SOCE and Ca<sup>2+</sup> handling in platelet dysfunction. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017;993:453–72.
95. Gurbel PA, Jeong YH, Tantry US. Phosphodiesterase inhibitors [Internet]. 4th ed. *Platelets*. Elsevier Inc.; 2019. 979–989 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813456-6.00054-0>
96. Nakade S, Rhee SK, Hamanaka H, Mikoshiba K. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of an immunoaffinity-purified homotetrameric inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (type I) increases Ca<sup>2+</sup> flux in reconstituted lipid vesicles. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(9):6735–42.
97. Supattapone S, Danoff SK, Theibert A, Joseph SK, Steiner J, Snyder SH. Cyclic AMP-Dependent Phosphorylation of a Brain Inositol Trisphosphate Receptor Decreases Its Release of Calcium. Vol. 85. 1988.
98. Zhdanova I v., Raz DJ. Effects of melatonin ingestion on cAMP and cGMP levels in human plasma. *Journal of Endocrinology*. 1999;163(3):457–62.
99. Marcus AJ, Zucker-Franklin D, Safier LB, Ullman HL. Studies on Human Platelet Granules and Membranes \*. Vol. 45, *Journal of Clinical Investigation*. 1966.
100. Tavassoli M, Yelenosky R, Tavassoli B. Platelet-derived Acid Phosphatase Isoenzyme in the Serum in Thrombocytopenia [Internet]. Available from: <http://ajcp.oxfordjournals.org/>
101. Giannini S, Falet H, Hoffmeister K. Platelet glycobiology and the control of platelet function and lifespan. *Platelets*. 2019;79–97.
102. Mahtta D, Bavry AA.  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 (GPIIb-IIIa) antagonists. *Platelets*. 2019;3:957–91.

103. Li Z, Smyth SS. Interactions between platelets, leukocytes, and the endothelium. In: Platelets. Elsevier; 2019. p. 295–310.
104. Merten M, Thiagarajan P. P-Selectin Expression on Platelets Determines Size and Stability of Platelet Aggregates [Internet]. 2000. Available from: <http://www.circulationaha.org>
105. A guide to murine platelet structure, function, assays, and genetic alterations [Internet]. Available from: <http://www.informatics.jax.org>.

## ANEXOS

### Anexo 1 – Parecer de aprovação emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Estudo do efeito da Agomelatina na agregação e adesão de plaquetas humanas

**Pesquisador:** JULIA MODESTO VICENTE

**Área Temática:**

**Versão:** 6

**CAAE:** 20454419.0.0000.5404

**Instituição Proponente:** FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - CEP/CHS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.585.082

##### Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos apresentados para apreciação ética e das informações inseridas pelo Pesquisador Responsável do estudo na Plataforma Brasil.

##### Emenda:

As mudanças realizadas no projeto foram: a inclusão de voluntários do sexo feminino e a utilização de novos agonistas de receptores melatoninérgicos MT1 (UCM871) e MT2 (UCM924). A utilização de amostras de mulheres é necessária para aumentar a representatividade populacional no estudo, contudo, é importante ressaltar que o tamanho amostral não será alterado, permanecendo 30 voluntários no total. O uso dos compostos UCM871 e UCM924 torna-se imprescindível para a avaliação mais acurada do papel dos receptores melatoninérgicos em plaquetas humanas, uma vez que seu mecanismo de ação difere-se dos antagonistas Luzindole e 4-P-PDOT.

##### Objetivo da Pesquisa:

Segundo informações do pesquisador.

##### Objetivo Primário:

O presente projeto pretende analisar a capacidade da Agomelatina de alterar a atividade

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



Continuação do Parecer: 4.585.082

plaquetária frente à estímulos agregantes. Pretendemos esclarecer se este potencial efeito da Agomelatina depende da ativação dos receptores melatoninérgico.

**Objetivo Secundário:**

Determinar se a Agomelatina modula a agregação plaquetária induzida por colágeno, trombina, ácido araquidônico ou ADP com ou sem serotonina em Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Plaquetas Lavadas (PL); Avaliar se a modulação da agregação plaquetária causada pela Agomelatina é impedida por antagonistas de receptores melatoninérgicos MT1 (Luzindole ou UCM871) e MT2 (4-PPDOT ou UCM924); Avaliar se a modulação da agregação plaquetária causada pela Agomelatina é acompanhada por mudança na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs); Avaliar se a modulação da agregação plaquetária causada pela Agomelatina é acompanhada por mudanças de conformação em integrinas plaquetárias GIIb/IIIa; Determinar se a Agomelatina modula a adesão plaquetária induzida por colágeno, trombina, ácido araquidônico ou ADP com ou sem serotonina em Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Plaquetas Lavadas (PL); Determinar se a Agomelatina modula as alterações na concentração de Cálcio ( $[Ca^{+2}]_i$ ) intracelular induzidas por colágeno, trombina, ácido araquidônico ou ADP com ou sem serotonina ou em Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Plaquetas Lavadas (PL); Determinar por Western Blot a presença de receptores MT1 e MT2 em plaquetas humanas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo informações do pesquisador.

**Riscos:**

Considera os riscos inerentes da punção venosa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

-Aluna de Mestrado: Julia Modesto Vicente; Orientador: Prof. Dr. Gabriel Forato Anhé.

-Projeto original aprovado em outubro de 2019, com coleta de dados iniciada em outubro de 2019.

-Em dezembro 2019 solicitado Emenda visando o aumento do volume da coleta de sangue dos participantes, de 30 para 60 ml. Os pesquisadores apresentaram como justificativa, a viabilização de experimentos.

-Em 08 fevereiro 2021 solicitado nova Emenda para inclusão de voluntários do sexo feminino e para a utilização de outros agonistas de receptores melatoninérgicos MT1 (UCM871) e MT2 (UCM924).

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



Continuação do Parecer: 4.585.082

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Para apreciação das pendências:

- PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1481059\_E2.pdf 23/12/2019: Incluso modificações da emenda 3 (atual). Vide item recomendações.
- Projeto detalhado: Os pesquisadores incluíram as alterações relacionadas a Emenda atual.

**Recomendações:**

No Formulário informações Básicas do Projeto, apresentado ao CEP em 08/02/2021:

Conforme Emenda 2 no Item "Desenho do projeto", alterar o volume de sangue venoso coletado dos participantes da pesquisa (de 30 para 60mL). Favor na próxima emenda que for ser submetida realizar esta adequação.

---

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

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

- Aconselha-se a adoção de medidas para a prevenção e gerenciamento de todas as atividades de pesquisa, garantindo-se as ações primordiais à saúde, minimizando prejuízos e potenciais riscos, além de prover cuidado e preservar a integridade e assistência dos participantes e da equipe de pesquisa.
- Em observância às dificuldades operacionais decorrentes de todas as medidas impostas pela pandemia do SARS-CoV-2 (COVID-19), é necessário zelar pelo melhor interesse do participante da pesquisa, mantendo-o informado sobre as modificações do protocolo de pesquisa que possam afetá-lo, principalmente se houver ajuste na condução do estudo, cronograma ou plano de trabalho.
- Caso sejam necessários a suspensão, interrupção ou o cancelamento da pesquisa, em decorrência dos riscos imprevisíveis aos participantes da pesquisa, por causas diretas ou indiretas, caberá aos investigadores a submissão de notificação para apreciação do Sistema CEP/Conep.
- Nos casos de ensaios clínicos, é permitida, excepcionalmente, a tramitação de emendas concomitantes à implementação de modificações/alterações no protocolo de pesquisa, visando à

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



Continuação do Parecer: 4.585.082

segurança do participante da pesquisa, assim como dos demais envolvidos no contexto da pesquisa, evitando-se, ainda, quando aplicável, a interrupção no tratamento dos participantes da pesquisa. Eventualmente, na necessidade de modificar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o pesquisador deverá proceder com o novo consentimento, o mais breve possível.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Emenda aprovada

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

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

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

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

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II

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



Continuação do Parecer: 4.585.082

apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

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

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

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

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1699984_E3.pdf	08/02/2021 10:40:13		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	julia_projeto_CEP_2.pdf	08/02/2021 10:38:06	JULIA MODESTO VICENTE	Aceito
Outros	Julia_Carta_Resposta2.pdf	23/12/2019 13:05:51	JULIA MODESTO VICENTE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Novo_TCLE_Julia.pdf	23/12/2019 13:05:16	JULIA MODESTO VICENTE	Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_3667497.pdf	29/10/2019 12:21:58	JULIA MODESTO VICENTE	Aceito
Outros	Carta_Resposta_CEP_Julia_V1.pdf	14/10/2019 11:58:51	JULIA MODESTO VICENTE	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	AtestadoMatricula.pdf	10/09/2019 11:31:45	JULIA MODESTO VICENTE	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoJulia.pdf	05/09/2019 17:11:21	JULIA MODESTO VICENTE	Aceito

**Situação do Parecer:**

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



Continuação do Parecer: 4.585.082

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CAMPINAS, 11 de Março de 2021

---

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

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

## Anexo 2 – Certificado de aprovação emitido pela Comissão de ética no Uso de Animais



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Estudo do efeito da Agomelatina na agregação e adesão de plaquetas de camundongos**, registrada com o nº **5533-1/2020**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Gabriel Forato Anhé e Julia Modesto Vicente**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de **21/05/2020**.

Finalidade:	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/08/2020 a 01/08/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	21/05/2020 a 01/08/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57bl6J/Unib
No. de animais:	5
Idade/Peso:	4,00 Semanas / 15,00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57bl6J/Unib
No. de animais:	5
Idade/Peso:	4,00 Semanas / 15,00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57bl6J/Unib
No. de animais:	5
Idade/Peso:	4,00 Semanas / 15,00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57bl6J/Unib
No. de animais:	5
Idade/Peso:	4,00 Semanas / 15,00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57bl6J/Unib
No. de animais:	5
Idade/Peso:	4,00 Semanas / 15,00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57bl6J/Unib
No. de animais:	5
Idade/Peso:	4,00 Semanas / 15,00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57bl6J/Unib
No. de animais:	5
Idade/Peso:	4,00 Semanas / 15,00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57bl6J/Unib
No. de animais:	5
Idade/Peso:	4,00 Semanas / 15,00 Gramas
Sexo:	5 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57bl6J/Unib





