UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

LUCIANA MOREIRA MARAMALDO COSTA

ESTUDO DO PERFIL ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIO DE UMA NOVA SÉRIE DE DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS OTIMIZADOS A PARTIR DO PROTÓTIPO LASSBio-129

RIO DE JANEIRO

2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Luciana Moreira Maramaldo Costa

ESTUDO DO PERFIL ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIO DE UMA NOVA SÉRIE DE DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS OTIMIZADOS A PARTIR DO PROTÓTIPO LASSBio-129

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profª Drª Ana Luísa Palhares de Miranda

Rio de Janeiro

2008

Luciana Moreira Maramaldo Costa

ESTUDO DO PERFIL ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIO DE UMA NOVA SÉRIE DE DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS OTIMIZADOS A PARTIR DO PROTÓTIPO LASSBio-129

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

_____
(Ana Luísa Palhares de Miranda, Faculdade de Farmácia, UFRJ)

_____
(Fernanda Carla Ferreira de Brito, Instituto Biomédico, UFF)

_____
(André Lopes Fuly, Instituto de Biologia, UFF)

_____
(Suzana Guimarães Leitão, Faculdade de Farmácia, UFRJ)

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Luciana Moreira Maramaldo.
Estudo do Perfil Antiagregante Plaquetário de uma Nova Série de Derivados *N*-Acilidrazônicos Otimizados a partir do Derivado LASSBio-129 / Luciana Moreira Maramaldo Costa. Rio de Janeiro: Faculdade de Farmácia/ UFRJ, 2008.

xvi, p., il., tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Rio de Janeiro, 2008.
Orientador: Ana Luísa Palhares de Miranda

1. Agregação plaquetária 2. Antiplaquetários 3. Desagregação plaquetária I. Título.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) – Faculdade de Farmácia – UFRJ, sob a orientação da professora Drª. Ana Luísa Palhares de Miranda.

“O pessimista se queixa do vento; o otimista espera que ele mude; o realista ajusta as velas do barco.”

William George Ward

À minha avó, companheira e amiga, Leopoldina Sampaio Moreira, por seu exemplo de vida e obstinação e por seu amor incondicional. Por ter sido porto seguro durante toda minha vida acadêmica. Essa conquista também é sua.

AGRADECIMENTOS

- À professora Drª Ana Luísa Palhares de Miranda, pela amizade e confiança. Por me trazer de volta às atividades acadêmicas.
- Aos professores Dr. Eliezer J. Barreiro, Dr. Carlos Alberto Manssour Fraga e Drª Lídia M. Lima, pelo acolhimento, pelas discussões e valiosas contribuições a este trabalho.
- Aos professores Drª Nelilma Romeiro e Dr. Carlos Maurício Santanna, pelo incentivo e pelas contribuições a este trabalho.
- Ao professor Dr. Marcelo de Pádula, membro da Comissão de Acompanhamento, pela atenção e contribuições a este trabalho.
- À banca examinadora, por aceitarem o convite e pelas contribuições que farão a este trabalho.
- À Me. Ana Paula Cunha Rodrigues, que sintetizou os compostos objetos de estudo deste trabalho, por ter me confiado a avaliação farmacológica desses.
- Aos amigos Bruna Lima, Cleverton Kleiton (KC) e Leandro Louback, pelo apoio fundamental na parte metodológica, pelas discussões e pelo auxílio nas análises estatísticas; e acima de tudo, pelo carinho e amizade.
- Aos amigos Ewerton (Eiton), Dudu, Daniel Ig, Marina Martins, Paula, Milla, Thaís e Thiago, pelo auxílio nas atividades do laboratório. Por tornarem a rotina mais simples e alegre.
- Aos amigos doutores Jorge, Fernanda, Josiane e Josélia, brilhantes farmacologistas, pelo exemplo de dedicação e obstinação.
- Aos amigos Mes. Cláudia Ormelli, Kelly Cristine e Paulo Henrique, pelo ensino das metodologias do laboratório, por todo apoio e paciência durante a iniciação científica.

- Aos amigos do LASSBio: Alexandra Lopes, Aline Guerra, Andréia, Ariane, Arthur Kümmerle, Carla, Carolina Ávila, Carolina Duarte, Éverton D'andrea, Fabrício, Fernando Rodrigues, Guilherme Barroso, Maria Letícia, Marina Amaral, Nailton, Raquel Lopes, Renata Lacerda, Rodolfo Maia, Thaíse Martins e Uros Laban, pelo incentivo, apoio nas discussões SAR, pela convivência harmoniosa.
- À Profª Carla Hollandino e às suas alunas Gleice, Vânia Buco, Camilla Siqueira e Luciana, pela disponibilidade e auxílio nas dúvidas.
- Aos meus irmãos e fãs, Tatiana e Thadeu, pela amizade, por me apoiarem e incentivarem sempre; e aos meus pais, José Estevam e Luci Moreira, que sempre me incentivaram ao estudo.
- A Alan Dias, companheiro e amigo, por estar sempre ao meu lado, por seu amor e dedicação.
- À amiga Aline Dias, pelo incentivo e auxílio na formatação do texto.
- Aos órgãos de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento (CNPq - Proc. CNPq 420015/05-1), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ - Proc. FAPERJ 171.532/2006)
- A todos os voluntários que doaram sangue para execução dos ensaios de agregação plaquetária.

RESUMO

Os eventos isquêmicos cardiovasculares representam a principal causa de morte e invalidez em todo o mundo. Nesse sentido, a agregação plaquetária é um dos principais eventos envolvidos nos acidentes agudos isquêmicos. Por outro lado, os agentes antiplaquetários disponíveis no mercado têm eficácia insatisfatória, o que evidencia a importância da identificação de novos protótipos para a terapia antiplaquetária.

Inserido em um grupo de pesquisas que trabalha no planejamento, desenvolvimento e avaliação farmacológica de substâncias inéditas candidatas a protótipos de fármacos, o presente trabalho descreve o estudo das atividades antiagregantes e desagregantes plaquetárias de uma série de novos compostos planejados a partir da modificação estrutural do protótipo LASSBio-129, um antiagregante plaquetário anteriormente desenvolvido no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio). Foi realizado o estudo da atividade antiagregante plaquetária de 15 novos compostos *N*-acilidrazônicos em plasma rico em plaqueta de coelhos frente aos diferentes agonistas da agregação plaquetária. Os compostos mais ativos foram submetidos a estudos de potência, através dos quais foram identificados compostos com atividade otimizada, destacando-se LASSBio-1215, que apresentou valores de CI_{50} na agregação induzida por colágeno e ácido araquidônico na ordem de 4,5 µM e 0,7 µM, respectivamente. O composto LASSBio-1215 foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno e ADP em plaquetas humanas. Sua ação sobre o metabolismo do ácido araquidônico (AA) foi confirmada através da inibição da formação TXA_2, principal metabólito do AA nas plaquetas.

O composto LASSBio-1215 foi capaz de desfazer os agregados plaquetários formados em plaquetas de coelho estimuladas por diversos agonistas e em plaquetas humanas estimuladas por ADP, caracterizando seu perfil desagregante plaquetário. Estudos qualitativos sobre o envolvimento de nucleotídeos cíclicos na reversão da agregação plaquetária foram conduzidos e mostraram que as ações antiagregante e desagregante plaquetárias exibidas por esse composto envolvem a regulação dos níveis intraplaquetários do GMPc.

Palavras-chave: plaqueta, *N*-acilidrazonas, antiagregante plaquetário, desagregante plaquetário, LASSBio-1215.

ABSTRACT

Ischemic cardiovascular events represent the leading cause of mortality and morbidity worldwide, and platelet aggregation and thrombus formation are the main effectors of acute arterial ischemic events. Although antiplatelet therapy is the cornerstone of antithrombotic treatment of ischemic cardiovascular disorders, available antiplatelet agents have less than satisfactory efficacy; thus, the identification of novel potential target candidates for antiplatelet therapy shoud be highly pursued.

In the scope of a research group that aims the planning, development and parmacological evaluation of new drug leads, this work describes the evaluation of the anti-aggregating properties of a new series of compounds developed as structural modification of the lead compound LASSBio-129, previously described as a potent anti-aggregating agent.

Antiplatelet profile of 15 new componds was monitored in rabbit platelet rich plasma induced by several agonists. Potency of the most active compounds was determined and identified those with optimized antiplatelet activity.

LASSBio-1215 exhibited the best performance, with IC_{50} values of 4,5 µM in the aggregation assay induced by collagen and 0,7 µM in the assay induced by aracdonic acid. This compound was able to inhibit platelet aggregation induce by collagen and ADP in human platelets. Its activity on the aracdonic acid cascade was confirmed by its ability to inhibit the production of aracdonic acid's main metabolite in platelet, TXA_2.

LASSBio-1215 was also able to revert platelet aggregation in rabbit PRP induced by several agonists and in human PRP induced by ADP, which characterized its disaggregating profile. Qualitative studies concerning the involvement of cyclic nucleotides in the reversion of platelet aggregation were carried out and showed that anti-aggregating and disaggregating properties involve regulation of GMPc intracellular levels.

Keywords: platelet, *N*-acylhydrazones, antiplatelet, aggregation, disaggregation, LASSBio 1215.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 A PLAQUETA 2
1.1.1 Morfologia Plaquetária 2
1.1.2 Função Plaquetária e Vias de Sinalização Celular 5
1.1.2.1 Via dos Fosfolipídeos de Inositol 6
1.1.2.2 Metabolismo do Ácido Araquidônico (AA) 7
1.1.2.3 Íon cálcio (Ca^{2+}) 8
1.1.2.4 Nucleotídeos Cíclicos 9
1.2 AGONISTAS DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA 10
1.2.1 Colágeno 10
1.2.2 Difosfato de Adenosina (ADP) 11
1.2.3 Fator de Ativação Plaquetária (PAF) 12
1.2.4 Trombina 12
1.3 FISIOPATOLOGIA PLAQUETÁRIA 13
1.3.1 Trombose 16
1.4 TERAPIAS ANTIPLAQUETÁRIAS 19
1.5 JUSTIFICATIVA 22
2 OBJETIVOS 26
3 MATERIAL E MÉTODOS 27
3.1 SUBSTÂNCIAS, REAGENTES E SOLVENTES 27
3.2 SOLUÇÕES 28
3.3 MONITORIZAÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA 31
3.3.1 Método turbidimétrico 31
3.3.2 Amostras de sangue 32
3.3.3 Obtenção do PRP e do PPP 33
3.3.4 Agonistas da Agregação 33
3.3.5 Contagem de Plaquetas 34
3.3.6 Estudo da agregação plaquetária em plaqueta lavada 34
3.3.7 Estudo indireto da atividade inibidora de fosfodiesterases em plaqueta humana lavada 35

3.3.8 Estudo do efeito da inibição da guanilato ciclase estimulada por NO na agregação plaquetária em PRP citratado de coelhos e humano 35
3.3.9 Estudo do efeito da inibição da adenilato ciclase na agregação plaquetária em PRP citratado de coelhos e humano 36
3.3.10 Estudo do efeito da inibição de PKA na agregação plaquetária em PRP de coelhos e humano 36
3.3.11 Estudo da agregação plaquetária em sangue humano total 36
3.3.12 Estudo da secreção plaquetária através da medida da luminescência 37
3.4 DOSAGEM DE TXB_2 EM SANGUE HUMANO 37
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 39
4.1 ESTUDO DE TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA DOS NOVOS DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS ANÁLOGOS AO LASSBio-129 39
4.1.1 Avaliação dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária (AP) induzida por AA (200 µM) em PRP citratado de coelhos 39
4.1.2 Avaliação dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP citratado de coelhos 39
4.1.3 Avaliação dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por ADP (5 µM) em PRP citratado de coelhos 42
4.1.4 Avaliação dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por U46619 (3 µM) em PRP citratado de coelhos 42
4.1.5 Avaliação dos derivados *N*-Acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por PAF (1 µM) em PRP citratado de coelho 42
4.1.6 Avaliação dos derivados *N*-Acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por trombina (0,5 UI/ml) em plaqueta de coelho lavada 45
4.2 ESTUDOS DE POTÊNCIA 47
4.2.1 Determinação da potência dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por AA (200 µM) em PRP citratado de coelhos 47
4.2.2 Determinação da potência dos compostos *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP citratado de coelhos 51

4.3 ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA x ATIVIDADE DOS DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS 54
4.4 ESTUDO DA AÇÃO DOS COMPOSTOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS EM PLAQUETAS HUMANAS 59
4.4.1 Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 μg/ml) em PRP humano citratado 59
4.4.2 Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por ADP (3 μM) em PRP humano citratado 60
4.4.3 Avaliação dos derivados *N*-acilidrazônicos em sangue humano total 62
4.5 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DOS COMPOSTOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS 63
4.5.1 Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos na formação de TXB_2 63
4.5.2 Estudo de Secreção Plaquetária através da medida de luminescência 64
4.6 ATIVIDADE DESAGREGANTE PLAQUETÁRIA DOS COMPOSTOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS 65
4.6.1 Reversão da agregação plaquetária e desagregação em PRP de coelho 65
4.6.2 Efeito desagregante em PRP humano 68
4.6.3 Estudo do efeito de LASSBio-1215 no balanço de nucleotídeos cíclicos 72
4.6.3.1 Efeito da dideoxiadenosina (DDA) [100 μM] na inibição da agregação plaquetária promovida por LASSBio-1215 (100 μM) na AP induzida por induzida por colágeno 5 μg/ml em PRP citratado de coelho. 72
4.6.3.2 Efeito do KT-5720 (5 μM) na inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno 5 μg/ml promovida por LASSBio-1215 (100 μM) em PRP citratado de coelho e humano. 73
4.6.3.3 Avaliação do efeito do ODQ (10 μM) na inibição da agregação plaquetária promovida por LASSBio-1215 (100 μM) na AP induzida por colágeno 5 μg/ml em PRP citratado de coelho e humano 74
4.6.3.4 Avaliação indireta da atividade inibidora de fosfodiesterases em plaqueta humana lavada 76

4.6.3.5 Efeito de LASSBio-1215 na presença de zaprinast na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP humano citratado.....79
5 CONCLUSÕES.....81
6 PERSPECTIVAS.....82
7 REFERÊNCIAS.....83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Oclusão de artéria por formação do trombo plaquetário. 1
Figura 2 A- Megacariócito: célula poliplóide e extensões pró-plaquetárias; B e C: plaqueta e seu conteúdo citoplasmático. 3
Figura 3 Formação de TXA_2 a partir do metabolismo do ácido araquidônico e seus mecanismos de sinalização intracelular. 8
Figura 4 Modulação de PDE3 e PDE2 por GMPc 10
Figura 5 Micrografia eletrônica da plaqueta em seu formato discóide (A), ativada e aderida (B), após a secreção do conteúdo granular (C). 14
Figura 6 Formação do trombo plaquetário e hemostasia. 15
Figura 7 Ativação plaquetária mediada por colágeno e fator de von Willebrand: captura, adesão e liberação de mediadores. 17
Figura 8 A. Principais agonistas da agregação plaquetária e seus respectivos receptores. B. Interação plaqueta-plaqueta através da formação de pontes cruzadas mediadas pelo fibrinogênio ligado às integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ de plaquetas adjacentes. 18
Figura 9 Principais terapias antiplaquetárias e seus alvos na plaqueta. 21
Figura 10 Perfil farmacológico dos compostos *N*-acilidrazônicos e seus derivados *N*-metilados. 23
Figura 11 Modificação estrutural de LASSBio-129 através das estratégias de hibridação, simplificação molecular, restrição conformacional e bioisosterismo 24
Figura 12 Série viníloga e seus respectivos compostos *N*-metilados. 25
Figura 13 Série metileno aminas cíclicas 25
Figura 14 Registro do aumento da transmitância de luz pelo método turbidimétrico 32
Figura 15 Curvas c*oncentração X efeito* (% inibição agregação plaquetária) dos derivados LASSBio-129, LASSBio-1003, LASSBio-1215 e LASSBio-1220 na agregação plaquetária induzida por AA (200 μM) em PRP de coelho 48
Figura 16 Curvas c*oncentração X efeito* (% inibição agregação plaquetária) dos derivados LASSBio-129, LASSBio-1222 e LASSBio-1223 na agregação plaquetária induzida por AA (200 μM) em PRP de coelho 49
Figura 17 Curvas c*oncentração X efeito* (% inibição agregação plaquetária) dos derivados LASSBio-129, LASSBio-1276, LASSBio-1217 e LASSBio-1221 na agregação plaquetária induzida por AA (200 μM) em PRP de coelho 50

Figura 18 Curvas *concentração X efeito* (% inibição agregação plaquetária) dos derivados LASSBio-129, LASSBio-1003, LASSBio-1215 e LASSBio-1220 na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP de coelho.....52
Figura 19 Curvas *concentração X efeito* (% inibição agregação plaquetária) dos derivados LASSBio-129, LASSBio-1222, LASSBio-1223 e LASSBio-1276 na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP de coelho.....53
Figura 20 Compostos de potência elevada - potências entre 0,7 µM e 8 µM.....54
Figura 21 Compostos de potência moderada: potências entre 23 µM e 47 µM 55
Figura 22 Reversão da AP promovida por LASSBio-1215 (100 µM) comparada à LASSBio-1003 frente ao ADP em PRP de coelhos.....55
Figura 23 Reversão da AP promovida por LASSBio-1215 (100 µM) comparada à LASSBio-1220 frente ao U46619 em PRP de coelhos.....55
Figura 24 Efeito desagregante plaquetário do composto LASSBio-1215 (100 µM) adicionado 1 min após do agente agregante (U46619 3 µM) em PRP coelhos. 66
Figura 25 Efeito desagregante plaquetário do composto LASSBio-1215 (300 µM) adicionado no momento de agregação máxima induzida por AA (200 µM) em PRP de coelhos.....66
Figura 26 Efeito desagregante do composto LASSBio-1215 (300 µM) e DMSO (1%) na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP de coelhos. 67
Figura 27 Efeito desagregante plaquetário do composto LASSBio-1215 e DMSO na agregação plaquetária induzida por ADP (3 µM) em PRP Humano. 69
Figura 28 Efeito desagregante plaquetário dos compostos LASSBio-1276 (300 µM) e LASSBio-1003 (300 µM) na agregação plaquetária induzida por ADP (3 µM) em PRP Humano. 70
Figura 29 Compostos furilidrazônicos com atividade quelante de Ca^{2+} 71
Figura 30 Efeito da inibição da formação de AMPc pelo DDA (100 µM) na inibição da agregação plaquetária promovida por LASSBio-1215. 73
Figura 31 Efeito da inibição da formação de GMPc pelo ODQ (10 µM) na inibição da agregação plaquetária promovida por LASSBio-1215 em PRP de humano. 75
Figura 32 Efeito desagregante de LASSBio-1215 na presença de ODQ 76
Figura 33 Resposta plaquetária no estudo indireto da atividade inibidora de PDE3 77
Figura 34 Resposta plaquetária no estudo indireto da atividade inibidora de PDE2 78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito dos compostos *N*-acilidrazônicos mais ativos na agregação plaquetária induzida por PAF 1 µM em PRP de coelhos; e trombina 0,5 UI/ml em plaqueta de coelhos lavada.....45

Gráfico 2 - Inibição da agregação plaquetária induzida por ADP 3 µM em PRP humano citratado.....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conteúdo das três diferentes subpopulações de grânulos plaquetários ..4
Tabela 2 - Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico (200 µM) em PRP citratado de coelho 40
Tabela 3 - Efeito dos compostos na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP citratado de coelho.....41
Tabela 4 - Efeito dos compostos na agregação plaquetária induzida por ADP (5 µM) em PRP citratado de coelho.....43
Tabela 5 - Efeito dos compostos na agregação plaquetária induzida por U46619 (3 µM) em PRP citratado de coelho 44
Tabela 6 – Compostos selecionados para estudos de potência 46
Tabela 7 – Potência (CI_{50}) dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por AA (200 µM) em PRP citratado de coelho 47
Tabela 8 – Potência (CI_{50}) dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP citratado de coelho.....51
Tabela 9 – Tabela comparativa da atividade antiagregante plaquetária dos derivados *N*-acilidrazônicos metilados e não-metilados (100 µM) na AP induzida por colágeno (5 µg/ml) e AA (200 µM) em PRP de coelho 56
Tabela 10 – Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP humano.....59
Tabela 11 – Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por ADP (3 µM) em PRP humano.....61
Tabela 12 – Efeito dos compostos em sangue total humano estimulado por colágeno (20 µg/ml).....62
Tabela 13 – Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos sobre a produção de TXA_2 em PRP humano estimulado por AA (500 µM). 64
Tabela 14 – Efeito de LASSBio-1215 sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) na presença de zaprinast (100 µM) em PRP humano.....79

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - ácido araquidônico

AAS – ácido acetilsalicílico

ADP – difosfato de adenosina

AP – agregação plaquetária

ATP – trifosfato de adenosina

AINE – antiinflamatório não-estereoidal

AMPc – monofosfato cíclico de adenosina

Ca^{2+} - íon cálcio

COX – ciclooxigenase

DAG – 1,2 diacilglicerol

DDA - didesoxiadenosina

DMSO– dimetilsulfóxido

EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético

EHNA - eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina

EIA – ensaio imunoenzimático

fvW – fator de von Willebrand

GC – guanilato ciclase

GMPc – monofosfato cíclico de guanosina

GP – glicoproteína

IL – interleucina

IP_3 – trifosfato de inositol

NAH - *N*-acilidrazona

NO - óxido nítrico

ODQ - 1*H*-(1,2,4)-oxadiazolo[4,3a]quinoxalin-1-ona

OMS – organização mundial de saúde

P – receptor purinérgico

PAF – fator de ativação plaquetária

PAR – receptor ativado por protease

PDE – fosfodiesterase

PG – prostaglandina

PGHS – prostaglandina endoperóxido sintase

PGI_2 – prostaciclina

PIP_2 – bisfosfato de inositol

PKA – proteína cinase A

PKC – proteína cinase C

PKG – proteína cinase G

PLA_2 – fosfolipase A_2

PLC – fosfolipase C

PPP – plasma pobre em plaqueta

PRP - plasma rico em plaquetas

SNP – nitroprussiato de sódio

SUS – sistema único de saúde

TP – receptor de tromboxana A_2

TXA_2 - tromboxana A_2

TXB_2 – tromboxana B_2

TXS – tromboxana sintase

1 INTRODUÇÃO

As desordens isquêmicas cardiovasculares continuam a representar a principal causa de morte e invalidez em todo o mundo: aproximadamente 30% do número total de mortes em 2005, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS).

No Brasil, em 2004, 20% do total de mortes foram atribuídos às doenças cerebrovasculares e cardiovasculares, conforme dados do Sistema Único de Saúde (SUS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

As plaquetas, células sangüíneas envolvidas na manutenção da hemostase, exercem uma função essencial no desenvolvimento de eventos isquêmicos agudos coronarianos e cerebrovasculares e estão criticamente envolvidas no processo de formação da aterosclerose (GAWAZ, 2006). O acúmulo de plaquetas no local de ruptura de uma placa aterosclerótica ou no local de uma lesão vascular é o evento chave no desenvolvimento da trombose arterial (Figura 1).

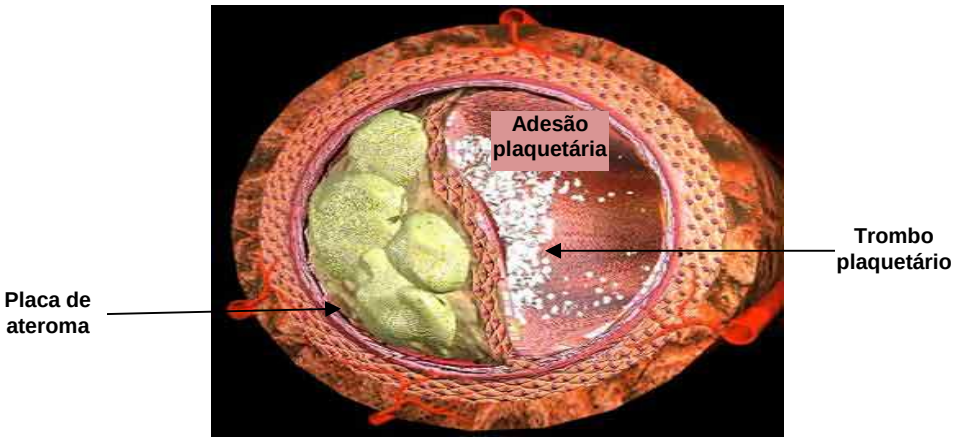


Figura 1 Oclusão de artéria por formação do trombo plaquetário. STROKECENTER (2008)

1.1 A PLAQUETA

1.1.1 Morfologia Plaquetária

As plaquetas são as menores células do sangue. São fragmentos anucleados de megacariócitos da medula óssea e possuem um tempo de vida de aproximadamente 10 dias. Durante a megacariocitopoiese, o megacariócito sofre endomitose. Uma vez que a célula poliplóide atinge a maturação, ela forma extensões pró-plaquetárias a partir das quais as plaquetas são liberadas (ITALIANO & SHIVDASANI, 2003) (Figura 2 – A).

Apesar de anucleadas, as plaquetas são células altamente organizadas e ricas em diferentes organelas, como mitocôndrias viáveis, glicogênio e pelo menos três tipos de grânulos morfologicamente diferentes que estocam diferentes tipos de constituintes: os grânulos alfa (α-grânulos), os grânulos densos e os lisossomas (RENDU & BROHARD-BOHN, 2001) (Figura 2 – B e C).

Os grânulos densos estocam íons bivalentes e moléculas pequenas não protéicas, como o difosfato de adenosina (ADP), o trifosfato de adenosina (ATP), serotonina e pirofosfato, que são secretadas para recrutar outras plaquetas e exercem funções centrais na amplificação da ativação e agregação plaquetárias, assim como na modulação do endotélio vascular e da função leucocitária. Os grânulos alfa contêm moléculas de adesão importantes para as interações entre a plaqueta e outras plaquetas, células sangüíneas e tecidos. Contêm ainda fatores mitogênicos, proteínas plasmáticas e fatores relevantes para a coagulação e fibrinólise. Os grânulos lisossômicos contêm glicosidases, proteases e proteínas catiônicas com atividade bactericida. As enzimas hidrolíticas liberadas digerem material dos agregados plaquetários circulantes (Tabela 1).

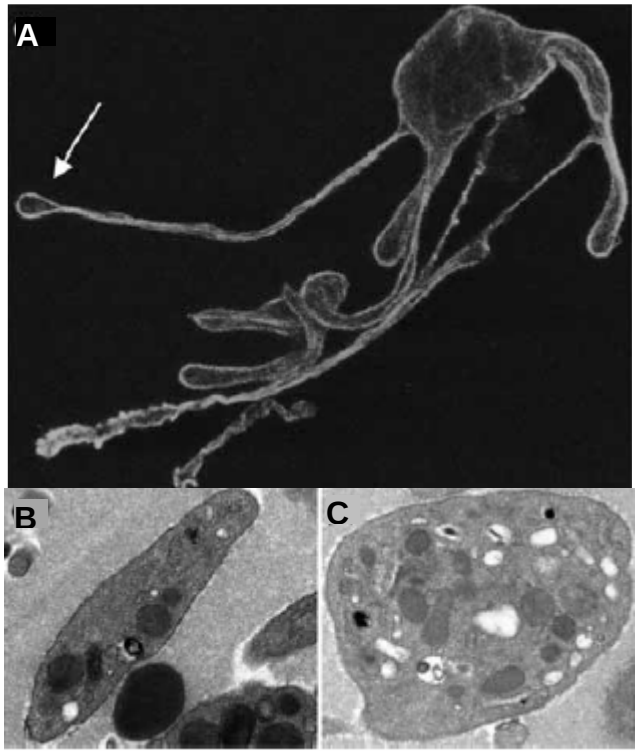


Figura 2 A- Megacariócito: célula poliplóide e extensões pró-plaquetárias; B e C: plaqueta e seu conteúdo citoplasmático. Adaptado de ITALIANO& SHIVDASANI (2003)

As plaquetas apresentam um complexo citoesqueleto, consistindo de microtúbulos e de sistema tubular denso, que exercem importante papel na ativação plaquetária, secreção granular e na retração do coágulo (RENDU & BROHARD-BOHN, 2001).

As plaquetas carreiam alguns componentes específicos através de todo o organismo. Na circulação, elas são reativas a vários estímulos e liberam o material contido em seus grânulos. Essa reação de secreção é um passo importante na hemostase primária. A energia e os mensageiros necessários para a reatividade plaquetária são fornecidos pela mitocôndria e pelo sistema tubular denso. Cada população de grânulos tem propriedades específicas relacionadas tanto com a estrutura quanto com o conteúdo liberado (RENDU & BROHARD-BOHN, 2001).

Tabela 1 - Conteúdo das três diferentes subpopulações de grânulos plaquetários Adaptado de ZARBOCK *et al*.(2007)

GRÂNULOS DENSOS	***Nucleotídeos***
	Adenina: ATP, ADP Guanina: GTP, GDP
	Aminas
	Serotonina Histamina
	Cátions bivalentes
GRÂNULOS ALFA	***Moléculas de adesão***
	P-selectina (CD62P) Molécula 1 de adesão plaqueta-célula endotelial (PECAM-1/CD31) Glicoproteina IIb/IIIa (GP IIb/IIIa, integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, CD41/CD61) Fator von Willebrand (fvW) Trombospondina-1 (TSP-1) Vitronectina, Fibronectina
	Fatores Mitogênicos
	Fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF) Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) Fator βde crescimento transformador (TGF-β)
	Fatores de coagulação
	Fibrinogênio, plasminogênio, Proteína S, Cininogênios Fatores V, VII, XI, XIII
	Inibidores de protease
	Inibidor C1 Ativador Inibidor-1de plasminogênio Inibidor da via do fator tecidual (TFPI)
LISOSSOMAS	***Glicosidases***
	Proteases
	Proteínas catiônicas

1.1.2 Função Plaquetária e Vias de Sinalização Celular

A função plaquetária é controlada por dois tipos de agonistas, que exercem efeitos excitatórios e inibitórios.

Os agonistas excitatórios ao interagirem com seus receptores promovem uma seqüência de eventos, entre eles:

- a mudança de forma da plaqueta;

- a exposição do receptor de fibrinogênio GP IIb-IIIa (integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$) e aumento da sua afinidade pelo ligante;

- agregação e liberação dos grânulos densos, resultando na amplificação da ativação plaquetária devido à liberação de ADP;

- liberação dos grânulos alfa, resultando na estabilização das pontes de fibrinogênio entre as plaquetas e conseqüente irreversibilidade da agregação.

Apesar de todas as repostas serem desencadeadas pela elevação da concentração do Ca^{2+} intracelular, muitos agonistas não conseguem reproduzir totalmente esses eventos. São considerados agonistas fracos aqueles que promovem apenas as duas primeiras respostas. Os agonistas intermediários são aqueles com a capacidade de induzirem os cinco primeiros eventos. Apenas os agonistas capazes de estimular a liberação das hidrolases ácidas são considerados agonistas fortes.

Os agonistas que exercem efeitos inibitórios agem diminuindo essas respostas através da estimulação da adenilato ciclase, gerando o segundo mensageiro 3', 5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPc).

Os efeitos excitatórios e inibitórios de ambos agonista ocorrem via ocupação de receptores acoplados à proteína G (HOURANI & CUSACK, 1991).

Vários receptores para ligantes biológicos de relevância farmacológica foram identificados na superfície plaquetária, incluindo receptores de ligantes excitatórios (epinefrina, ADP, serotonina, fator de ativação plaquetária (PAF), tromboxana A_2 (TXA_2), vasopressina, trombina) e de ligantes inibitórios (adenosina, prostaglandina D_2 (PGD_2), prostaciclina (PGI_2) (HERD & PAGE, 1995).

Os receptores utilizam duas vias de sinalização principais: a via do inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP_3) e do 1, 2-diacilglicerol (DAG), derivados da hidrólise enzimática dos fosfolipídeos de inositol (PIP_2) pela fosfolipase C (PLC); e a via do ácido araquidônico (AA), liberado da membrana a partir da ação da fosfolipase A_2 (PLA_2).

1.1.2.1 Via dos Fosfolipídeos de Inositol

IP_3 e DAG causam importantes respostas intracelulares induzindo alterações em proteínas alvo tanto diretamente quanto indiretamente pela ativação de proteínas cinases. IP_3 libera Ca^{2+} dos estoques intracelulares, ativando diversas enzimas dependentes de Ca^{2+}, como a cinase de cadeia leve de miosina, relacionada à mudança de forma da plaqueta e ativando a proteína cinase C (PKC) dependente de Ca^{2+}, envolvida na regulação da agregação e secreção. DAG ativa proteína cinase C (PKC), responsável pela fosforilação de diversas proteínas (KROLL & SCHAFER, 1995).

1.1.2.2 Metabolismo do Ácido Araquidônico (AA)

O ácido araquidônico (AA) é liberado dos fosfolipídeos de membrana pela ação da fosfolipase A_2 (PLA_2). A enzima ciclooxigenase (COX), também conhecida por prostaglandina endoperóxido sintase (PGHS), metaboliza o AA e gera a prostaglandina H_2 (PGH_2). Nas plaquetas, a isoforma predominante da enzima COX é a COX-1, e o principal prostanóide formado é a tromboxana A_2 (TXA_2), sintetizada pela ação da enzima tromboxana sintase (TXS) sobre PGH_2. A TXA_2, um potente agente pró-agregante e vasoconstrictor, estimula, de forma autócrina e parácrina, o receptor específico (TP) na superfície plaquetária, acoplado à proteína G_q, que ativa fosfolipase C (PLC) e mobiliza Ca^{2+} intracelular (Figura 3). A regulação negativa é realizada pela prostaciclina (PGI_2), principal prostanóide secretado pelas células endoteliais. Esse prostanóide se liga ao receptor IP plaquetário, acoplado à proteína G_s, e promove o aumento da concentração intracelular de AMPc, antagonizando a resposta agregatória e inibindo a trombose. A prostaciclina se liga também aos receptores IP das células da musculatura vascular lisa, inibindo a contração do vaso. A síntese desse prostanóide pela via COX exerce importante função no controle da hemostasia vascular e da trombose (SIMMONS *et al*., 2004; NAKAHATA, 2008).

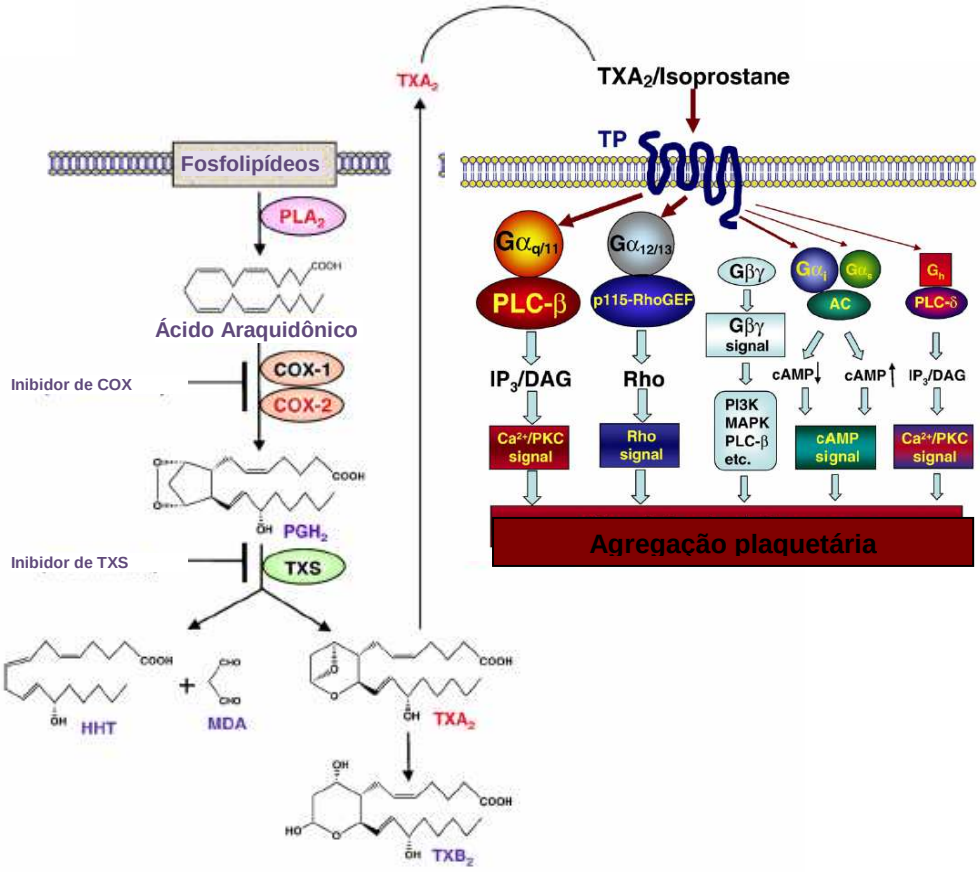


Figura 3 Formação de TXA_2 a partir do metabolismo do ácido araquidônico e seus mecanismos de sinalização intracelular. Adaptado de NAKAHATA (2008)

1.1.2.3 Íon cálcio (Ca^{2+})

O Ca^{2+} exerce uma função chave em várias funções plaquetárias. Todos os agonistas excitatórios da plaqueta, exceto a epinefrina, induzem o aumento das concentrações citosólicas de Ca^{2+}, tanto a partir da sua mobilização dos estoques internos (sistema tubular denso) quanto a partir do aumento do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular. O aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} causa ativação plaquetária, mudança de forma da plaqueta e liberação de seu conteúdo granular (AUTHI, 1993; HOURANI & CUSACK, 1991).

1.1.2.4 Nucleotídeos Cíclicos

Agonistas plaquetários como a prostaciclina (PGI_2), prostaglandina E_1 (PGE_1) e prostaglandina D_2 (PGD_2), que aumentam os níveis de AMPc intracelulares, são os mais potentes inibidores da ativação plaquetária. Essas substâncias se ligam a receptores acoplados à proteína G estimulatória (G_s), que estimula adenilato ciclase e leva ao aumento do AMPc intracelular. Os efeitos inibitórios do AMPc são devido à fosforilação de proteínas chave pela proteína cinase dependente de AMPc (PKA). Uma das etapas de inibição pelo AMPc inclui a inibição da ativação da PLC (SIESS *et al.*, 1993).

Os níveis de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) na plaqueta são controlados pela ação da guanilato ciclase solúvel que é ativada por óxido nítrico (NO). No entanto, os níveis celulares de nucleotídeos cíclicos não são apenas regulados pelas enzimas que os sintetizam (adenilato e guanilato ciclases), mas também pelas enzimas que os degradam, representadas pela família das fosfodiesterases (PDEs) (WALTER *et al.,*1993).

As plaquetas em repouso apresentam um balanço equilibrado da formação e hidrólise de AMPc de forma a alcançar níveis intracelulares suficientes para impedir a ativação plaquetária em condições fisiológicas normais. Isto implica que as fosfodiesterases (PDEs), ao controlarem a hidrólise de AMPc, exercem um efeito regulatório na ativação plaquetária, mesmo na ausência de agonistas que estimulam a adenilato ciclase.

As plaquetas contêm pelo menos três tipos de PDEs: PDE2 – estimulada por GMPc, PDE3 – inibida por GMPc, ambas utilizam AMPc e GMPc como substratos, e PDE5, que hidrolisa exclusivamente GMPc. Existe uma importante relação entre as vias de sinalização dos dois nucleotídeos cíclicos, uma vez que níveis elevados de

GMPc exercem efeito inibitório sobre PDE3, aumentando, conseqüentemente, os níveis de AMPc, e exercem efeito estimulatório sobre PDE2, reduzindo os níveis de AMPc (FEIJGE *et al.*, 2004) (Figura 4).

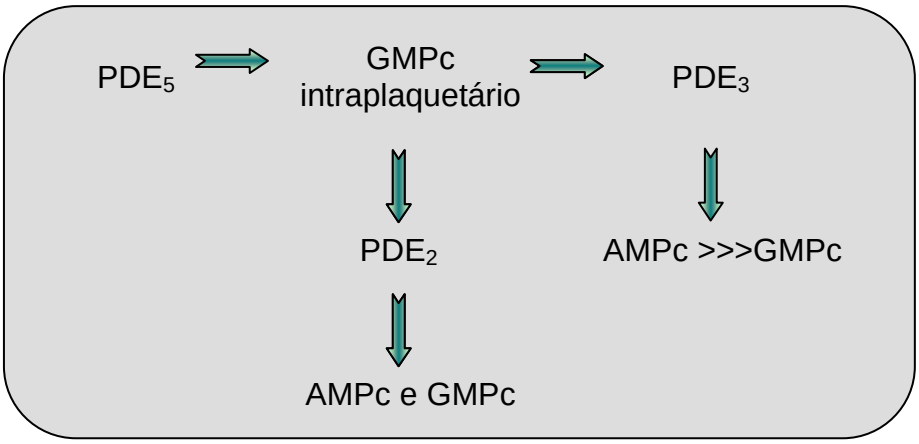


Figura 4 Modulação de PDE3 e PDE2 por GMPc

1.2 AGONISTAS DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

1.2.1 Colágeno

O colágeno é o componente mais trombogênico da matriz subendotelial. Ele se liga a seus receptores específicos na superfície plaquetária, GPVI e GPIa-IIa (integrina $\alpha_2\beta_1$) para promover a adesão, ativação e agregação plaquetária no local da lesão vascular. No entanto, a interação das plaquetas com o colágeno é bem mais complexa do que uma simples interação ligante-receptor (SURIN *et al.*, 2007).

A ativação plaquetária induzida por colágeno pode ser dividida em três etapas principais:

- interação das plaquetas com o complexo formado entre o colágeno e o fator de von Willebrand (fvW), que ativa PLC e leva ao aumento do Ca^{2+} intracelular;

- liberação do conteúdo granular (grânulos densos e grânulos alfa);

- exposição e ativação do receptor GPIIb-IIIa (integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$), levando à ativação das plaqueta adjacentes para formação do trombo plaquetário (SURIN *et al.,* 2007).

1.2.2 Difosfato de Adenosina (ADP)

O difosfato de adenosina (ADP) foi reconhecido como indutor da agregação plaquetária no início da década de 1960. Embora seja um fraco agonista plaquetário, ele exerce uma função chave na agregação plaquetária porque, uma vez secretado dos grânulos densos, amplifica a ativação plaquetária induzida por outros agonistas, inclusive pelos agonistas fracos como: serotonina, epinefrina e quimiocinas (GACHET, 2001).

Estudos bioquímicos, clínicos e farmacológicos levaram à proposta de um modelo de três receptores purinérgicos que contribuem separadamente para o complexo processo da agregação plaquetária induzida por ADP:

- o receptor ionotrópico **P2X1**, responsável pelo rápido influxo de Ca^{2+} para o citosol, que interage principalmente com ATP;

- o receptor metabotrópico **P2Y1**, acoplado à proteína G_q, que regula a PLC e os eventos dependentes de Ca^{2+} e inicia a mudança de forma da plaqueta (“shape change”);

- o receptor **P2Y12**, acoplado à proteína G_i, que leva à subseqüente inibição da adenilato ciclase, regulação da PI3-cinase - responsável pela amplificação da agregação iniciada por outros agonistas e pelo próprio ADP, e exposição da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (CATTANEO & GACHET, 2001).

A secreção plaquetária e a agregação secundária normalmente observadas após estimulação de plaquetas humanas com ADP são causadas pela formação de

TXA_2, que requer a coativação de ambos receptores P2Y1 e P2Y12 e a sinalização externa promovida pela interação de $\alpha_{IIb}\beta_3$ com o fibrinogênio (JIN *et al*., 2002).

1.2.3 Fator de Ativação Plaquetária (PAF)

O PAF é um potente agente agregante plaquetário. Ele promove a mudança de forma da plaqueta, agregação e liberação do conteúdo granular. Em plaquetas humanas, a liberação do conteúdo granular depende do metabolismo do AA. O PAF induz o metabolismo dos fosfolipídeos de inositol, a mobilização de Ca^{2+} e inibe a adenilato ciclase. Ele é liberado das plaquetas ativadas e as ativa, participando do complexo sistema de amplificação e sinergismo característico da resposta plaquetária (HOURANI & CUSACK, 1991).

1.2.4 Trombina

A serina protease trombina é um potente ativador plaquetário e dispara sua sinalização, em parte, através dos receptores ativados por protease ligados à proteína G (PARs). Estes receptores convertem um evento de clivagem proteolítica extracelular em um sinal transmembranar. Quatro receptores PARs distintos foram identificados até o momento. As plaquetas humanas expressam PAR1 e PAR4. PAR1 medeia respostas plaquetárias rápidas em baixas concentrações de trombina, enquanto PAR4 é ativado apenas em altas concentrações (SAVAGE *et al.*, 2001; HAMILTON, 2008).

Os receptores PARs, acoplados à proteína G_q, ativam PLC levando ao aumento de Ca^{2+} e ativação de PKC. O aumento do Ca^{2+} regula muitos eventos que

levam à agregação plaquetária, inclusive a ativação da PLA_2 pela via da proteína cinase ativada por mitógeno (RUGGERI, 2002).

Além de ativar as plaquetas através da clivagem de seu receptor PAR, a trombina ainda cliva a GPV do complexo GPIb-IX-V, o que permite a sua ligação à $GPIb_{\alpha}$, processo que resulta na ativação plaquetária (WAGNER & BURGER, 2003). A trombina (fator IIa da cascata de coagulação) também é responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina, via final da cascata de coagulação (KAHN *et al.*, 1998; SAVAGE *et al.,* 2001).

1.3 FISIOPATOLOGIA PLAQUETÁRIA

As plaquetas estão envolvidas na hemostase e na inflamação. Sob condições fisiológicas, elas circulam em um estado quiescente, protegidas da ativação precoce por mediadores inibitórios liberados das células endoteliais intactas, como o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI_2) e a adenosina originada da ação da ectoADPase (CD39) sobre o ADP extracelular (ZARBOCK *et al.*, 2007).

A matriz subendotelial é uma superfície altamente reativa para as plaquetas. A adesão das plaquetas às proteínas de matriz subendotelial resulta na sua rápida ativação.

Durante a ativação, as plaquetas alteram sua topografia, passando de um formato discóide para um formato esférico com emissão de longas extensões dendríticas que facilitam a adesão (Figura 5). O citoplasma, rico em actina e miosina, permite essa mudança de forma. A adesão das plaquetas ativadas ao local da lesão vascular se torna estável, e então ela promove a expansão de sua superfície sobre a área lesada para formar um pseudo-endotélio, altamente reativo para o recrutamento de novas plaquetas circulantes e para a formação do agregado plaquetário. Este

processo não é importante apenas na hemostase primária e secundária, uma vez que, quando descontrolado, pode levar à formação de trombos oclusivos. Esses trombos se formam nos locais de ruptura de uma placa aterosclerótica, resultando nos acidentes isquêmicos cerebrovasculares e cardiovasculares (DOPHEIDE *et al*., 2001).

Em resposta a uma lesão vascular, alterações no fluxo sangüíneo ou a um estímulo químico, as plaquetas apresentam três respostas funcionais: adesão, secreção e agregação (Figura 6).

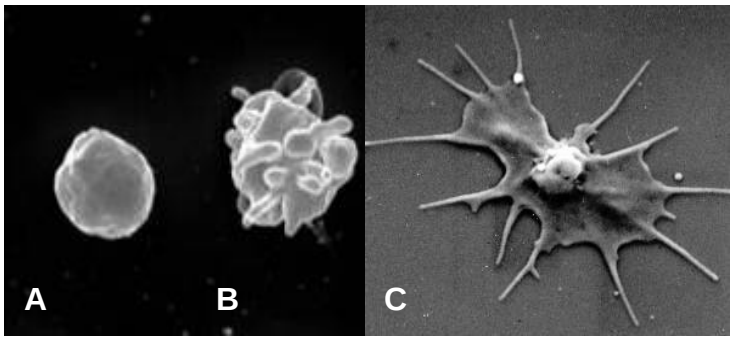


Figura 5 Micrografia eletrônica da plaqueta em seu formato discóide (A), ativada e aderida (B), após a secreção do conteúdo granular (C). AUSTRALIAN CENTER FOR BLOOD DISEASES (2008)

As plaquetas estimulam a ativação local de fatores de coagulação plasmática, levando à geração de uma rede de fibrina que reforça o agregado plaquetário.

A trombose é caracterizada pela formação indesejada de um tampão hemostático (trombo), que difere estruturalmente do coágulo por apresentar uma estrutura bem definida. A localização do trombo caracteriza dois tipos de processos fisiopatológicos: a trombose arterial e a trombose venosa. Na trombose arterial, o trombo cresce de maneira desordenada, dificultando a passagem do fluxo sangüíneo, podendo provocar a oclusão da artéria, resultando em necroses isquêmicas, infarto do miocárdio e aterosclerose. Na trombose venosa, a cauda

trombótica possui maior rigidez, o que facilita sua fragmentação. Ao atingirem vasos de menor calibre, os fragmentos causam obstrução, promovendo embolias, principalmente a pulmonar (HAMPTON & PRESTON, 1997).

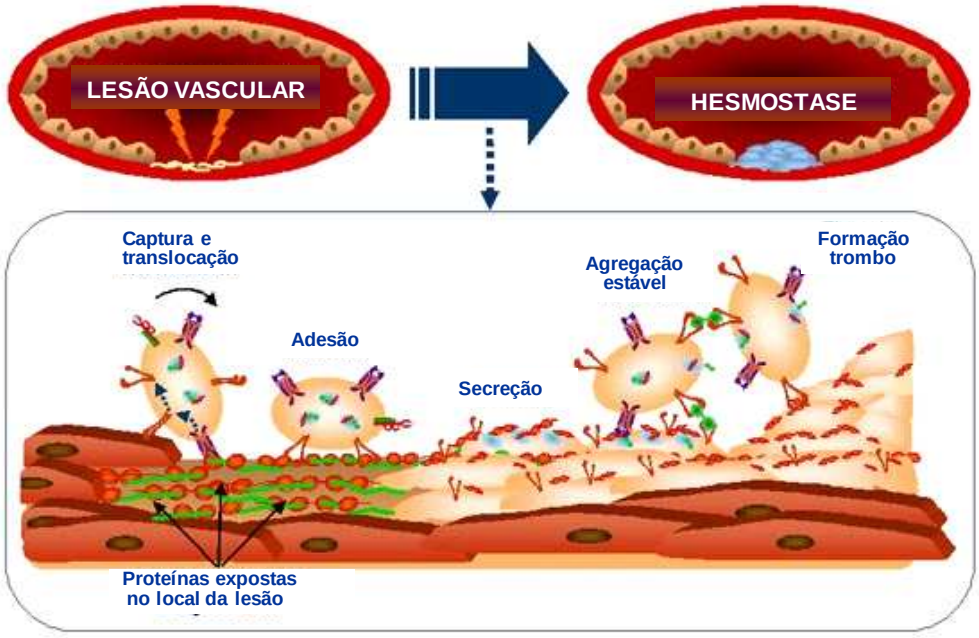


Figura 6 Formação do trombo plaquetário e hemostasia. Adaptado de MONASH UNIVERSITY (2008)

É cada vez mais evidente que as plaquetas não exercem apenas funções importantes na hemostasia e trombose, mas também estão envolvidas no desenvolvimento de doenças vasculares ateroscleróticas. Durante o processo de adesão, as plaquetas se ativam e liberam várias substâncias mitogênicas e inflamatórias no microambiente, alterando as propriedades quimiotáticas, adesivas e proteolíticas das células endoteliais. Estas alterações induzidas pela plaqueta no fenótipo endotelial promovem quimiotaxia, adesão e transmigração de monócitos para o sítio inflamatório. A citocina IL-1β foi identificada como o principal mediador da ativação das células endoteliais induzida pela plaqueta (WEBER, 2005; GAWAZ, 2006).

1.3.1 Trombose

Uma lesão vascular severa acarreta a ruptura da integridade do endotélio e a exposição da matriz subendotelial, que inclui proteínas de adesão como o colágeno e o fator de von Willebrand (fvW).

O fator de von Willebrand, previamente produzido e liberado pelo endotélio ou adsorvido do plasma sobre o tecido exposto, é crucial para adesão plaquetária, em particular nos vasos com alta tensão de cisalhamento, como as artérias e as arteríolas. Ele se liga ao seu receptor glicoproteico GP Ib-IX-V na superfície plaquetária e estabelece uma ligação transiente que reduz a movimentação da plaqueta (rolamento) e facilita a sua ativação. Após a captura da plaqueta, uma rápida estabilização da adesão é necessária para que ocorra a formação do trombo. Este processo é inicialmente mediado pela interação do colágeno com o receptor glicoprotéico GPVI e com a integrina $\alpha_2\beta_1$ (GPIa-IIa), receptor membro da família das imunoglobulinas expresso na superfície plaquetária (Figura 7) (WAGNER & BURGER, 2003).

A geração de sinais intracelulares a partir da interação do colágeno com GPVI e do fvW com GPIb converte as integrinas β_1 e β_3 ao seus estados de alta afinidade e induz a síntese de tromboxana A_2 (TXA_2) e a secreção dos grânulos plaquetários, com a conseqüente liberação de agonistas solúveis, como ADP, serotonina, epinefrina. O acúmulo de ADP e TXA_2 liberados resulta na ativação das demais plaquetas circulantes que não estão em contato com as proteínas da matriz subendotelial expostas no local da lesão vascular, amplificando o sinal e resultando no crescimento do trombo. A ação desses agonistas promove a exposição e o aumento da afinidade da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Em contrapartida, a adesão mediada por essa integrina fortalece as interações do colágeno com seu receptor GPVI, levando

ao aumento da sinalização, regulação das integrinas, liberação de mediadores e desenvolvimento da atividade pró-coagulante (NIESWANDT & WATSON, 2003).

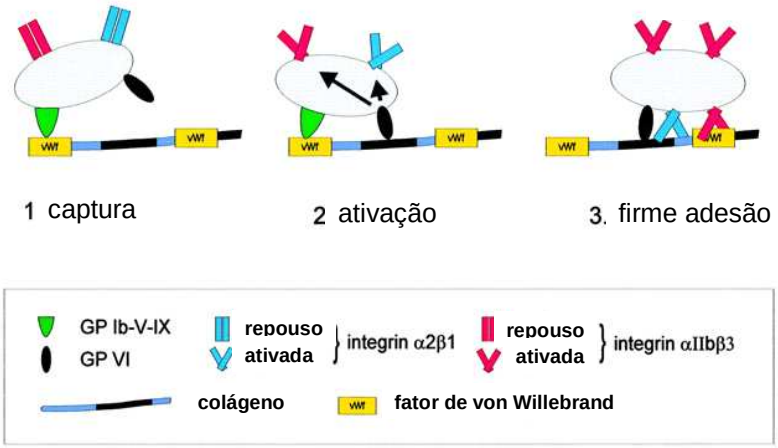


Figura 7 Ativação plaquetária mediada por colágeno e fator de von Willebrand: captura, adesão e liberação de mediadores. Adaptado de NIESWANDT & WATSON (2003)

As integrinas são reconhecidas como a principal classe de receptores de superfície que medeiam a adesão estável das células hematopoiéticas em alta tensão de cisalhamento. São proteínas heterodiméricas que consistem de subunidades α e β. Estão presentes na superfície da maioria das células em uma conformação de repouso que tem baixa afinidade pelo seu ligante natural, mas podem ser convertidas a um estado de alta afinidade através da sinalização interna gerada pela interação de outros receptores de superfície com seus ligantes (NIESWANDT & WATSON, 2003).

Quando as plaquetas são ativadas por seus agonistas através de seus receptores específicos, a conformação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ é alterada aumentando sua afinidade para seus principais ligantes: fibrinogênio, fator de von Willebrand e fibronectina A interação do complexo $\alpha_{IIb}\beta_3$-fibrinogênio/fibronectina/fvW com a

integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ de outra plaqueta ativada adjacente promove a interação cruzada plaqueta-plaqueta (SIMS *et al.,*1991; RUGGERI, 2002) (Figura 8).

Ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e sua ligação ao fibrinogênio, via final comum à ativação promovida por todos os agonistas plaquetários, é apenas o início do processo de agregação plaquetária, uma vez que essas interações induzem uma transdução de sinal que é essencial para as mudanças na organização do citoesqueleto e da agregação plaquetária (ISENBERG *et al.* 1987).

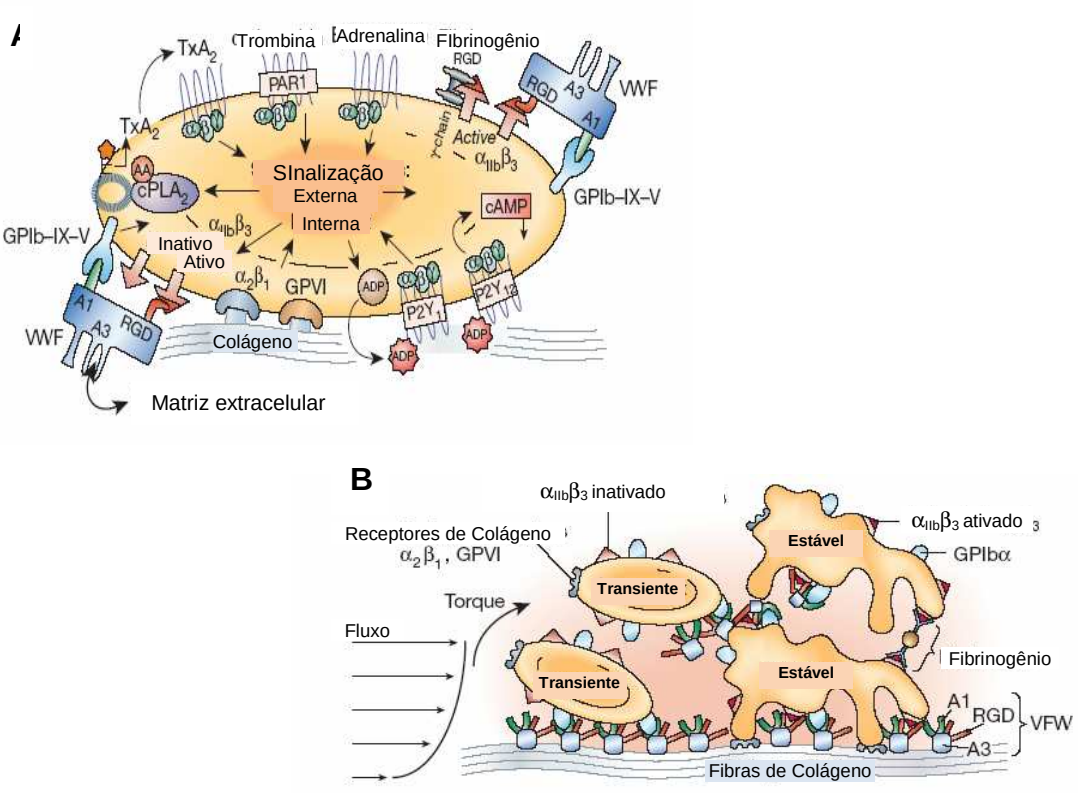


Figura 8 A. Principais agonistas da agregação plaquetária e seus respectivos receptores. B. Interação plaqueta-plaqueta através da formação de pontes cruzadas mediadas pelo fibrinogênio ligado às integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ de plaquetas adjacentes. Adaptado/Retirado de RUGGERI (2002)

1.4 TERAPIAS ANTIPLAQUETÁRIAS

Até o momento, nenhum fármaco utilizado na terapia antiplaquetária é suficientemente potente, seguro e ativo por via oral para a prevenção da trombose arterial. As terapias mais comumente utilizadas – ácido acetilsalicílico (AAS), clopidogrel, tirofibano - apresentam uma ou mais limitações, que incluem: pouca eficácia, risco significativo de hemorragias, irritabilidade gástrica, resistência ao fármaco ou a via de administração exclusivamente parenteral (Figura 9) (HAMILTON, 2008).

O AAS inibe irreversivelmente a enzima cicloxigenase, impedindo a formação de TXA_2 nas plaquetas ativadas. Ele continua sendo a terapia padrão nos eventos isquêmicos agudos e na prevenção secundária. Alguns estudos sugerem um aumento de eventos cardiovasculares em indivíduos que demonstraram resistência ao AAS (BHATT & TOPOL, 2003; HAMILTON, 2008).

Outra importante classe de inibidores da agregação plaquetária representam os antagonistas do receptor purinérgico P2Y12. A tienopiridina ticlopidina é um pró-fármaco com alta biodisponibilidade oral que inibe irreversivelmente esse receptor. Assim como o AAS, possui um curto tempo de meia-vida com uma longa duração de ação. No entanto, os efeitos adversos associados, como o desconforto gastrointestinal e, mais gravemente, o surgimento de neutropenia e trombocitopenia, limitaram sua utilização clínica. O clopidogrel, outro composto da classe das tienopiridinas, é um agente antitrombótico cuja aplicação clínica está bem estabelecida nas síndromes coronarianas agudas e nas intervenções coronarianas percutâneas. O clopidogrel é um pró-fármaco com lento início de ação, e exibe eficácia semelhante a do AAS na prevenção secundária ao infarto. Sua utilização em combinação com o AAS tem apresentado eficácia superior, o que se justifica pela

ação desses fármacos em mecanismos antiplaquetários distintos (GOODMAN, 2006; MICHELSON, 2008; HAMILTON, 2008).

A classe de inibidores da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, receptor do fibrinogênio e do fvW, age inibindo a via final comum na agregação plaquetária. A ação desses fármacos bloqueia a agregação plaquetária induzida por qualquer agonista e, por isso, essa classe é constituída pelos antiplaquetários mais potentes disponíveis atualmente, como o tirofibano, abciximabe e a eptifibatida. Apesar disso, eles apresentam algumas limitações, principalmente em relação à via de administração, exclusivamente parenteral devido à baixa biodisponibilidade oral, e induzem taxas elevadas de sangramento clinicamente relevantes e trombocitopenia (HAMILTON, 2008).

A elevação dos níveis intracelulares de AMPc e GMPc é um dos mecanismos mais potentes de inibição da agregação plaquetária. Esses agentes podem interferir com todas as vias conhecidas da agregação plaquetária, assim como com a secreção de grânulos. O principal estímulo endógeno da adenilato ciclase é a prostaciclina, enquanto o óxido nítrico (NO) é um potente estimulador da guanilato ciclase (SCHWARZ *et al.*, 2001).

Outra abordagem para promover o aumento dos níveis de nucleotídeos cíclicos é baseada na inibição de fosfodiesterases (dipiridamol, milrinona, cilostazol). Embora o dipiridamol não seja utilizado na terapia antiplaquetária, é recomendado seu uso em combinação com varfarina para profilaxia pós-operatória primária de tromboembolismo em pacientes com válvulas cardíacas protéticas. Mais recentemente, o inibidor seletivo de PDE3 (cilostazol) tem sido utilizado na clínica para o tratamento da claudicação intermitente, doença aterosclerótica dos vasos periféricos. A utilização clínica desses inibidores, especialmente em combinação

com baixas doses de agentes que elevam os níveis de nucleotídeos cíclicos, poderia ser bastante útil em situações em que se deseja a inibição específica da função plaquetária, sem apresentar efeitos sobre a musculatura lisa (SCHWARZ *et al,* 2001).

Uma vez que as terapias disponíveis se apresentam insuficientes para o controle efetivo dos eventos vasculares, tanto a descoberta de novos alvos terapêuticos como a de fármacos que atuem em mais de um alvo terapêutico, constituem-se abordagens importantes para o desenvolvimento de novos agentes antiplaquetários.

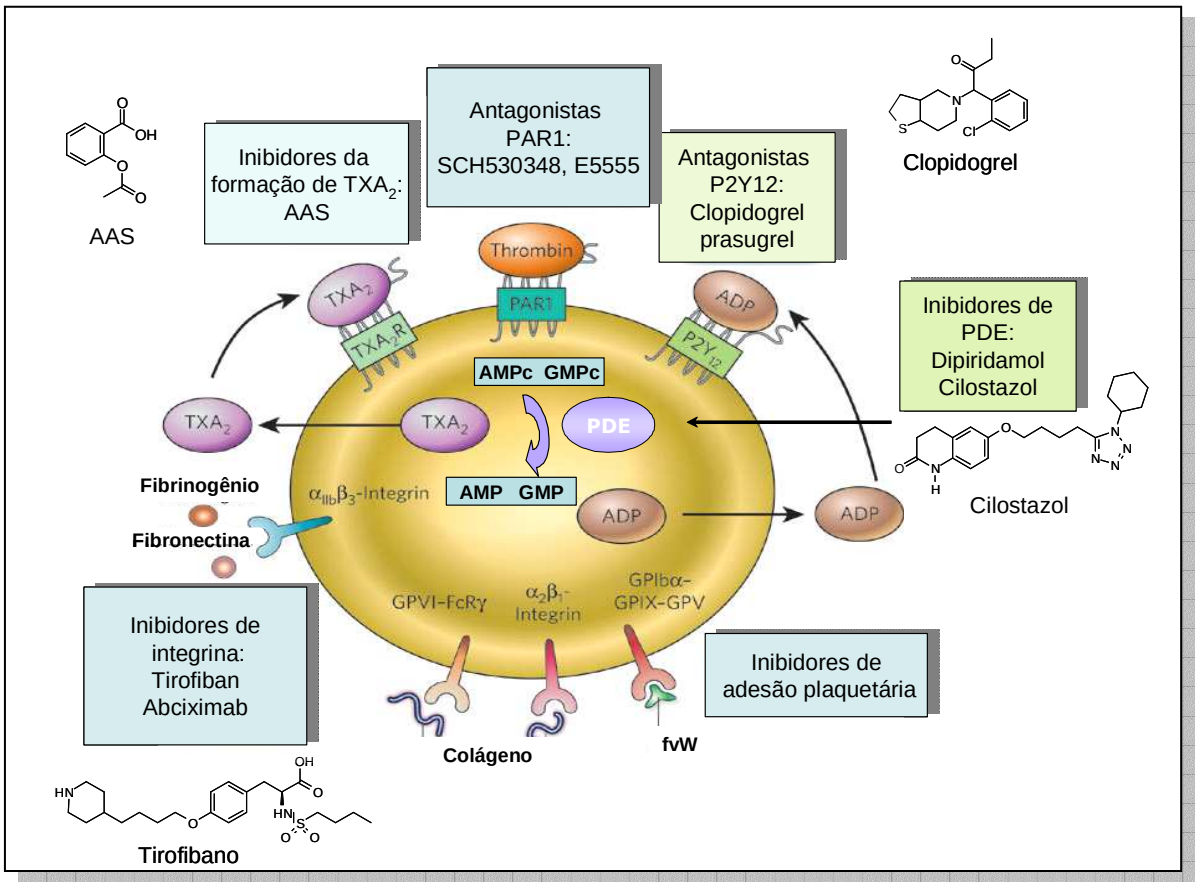


Figura 9 Principais terapias antiplaquetárias e seus alvos na plaqueta. Adaptado de MACKMAN (2008).

1.5 JUSTIFICATIVA

Os derivados *N*-acilidrazônicos (NAH) são bastante conhecidos por apresentarem atividade biológica em diferentes alvos farmacológicos, uma vez que possuem uma subunidade estrutural mínima capaz de fornecer pontos ligantes para mais de um tipo de biorreceptor, cuja seletividade pode ser modulada pela adequada introdução de subunidades farmacofóricas auxiliares (FRAGA & BARREIRO, 2006).

Ormelli (1999), em sua dissertação de mestrado, demonstrou que o composto 3,4-metilenodioxibenzoil-2-furilidrazona, LASSBio-129, apresentava uma potente atividade antiagregante plaquetária.

Kümmerle (2005) propôs a *N*-alquilação dos protótipos LASSBio-129 e LASSBio-294, resultando na obtenção dos compostos *N*-metilados LASSBio-1003 e LASSBio-785 (Figura 10), respectivamente, visando adequar a relação entre a potência e a seletividade nos modelos farmacológicos avaliados. A *N*-alquilação resultou no aumento da potência vasodilatadora, como ilustrado na Figura 10.

Posteriormente, Brito (2005), em sua tese de doutorado, demonstrou que a *N*-alquilação dos compostos tienilacilidrazônicos planejados a partir da modificação no protótipo LASSBio-294 levou à obtenção de compostos com potente ação antiagregante plaquetária e potencial efeito antitrombótico.

Inserido no programa de pesquisa em Química Medicinal desenvolvido no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) que compreende o planejamento, a síntese e a avaliação das propriedades farmacológicas de substâncias bioativas candidatas a protótipos de fármacos, três novas séries de compostos NAH foram sintetizadas a partir do protótipo LASSBio-129.

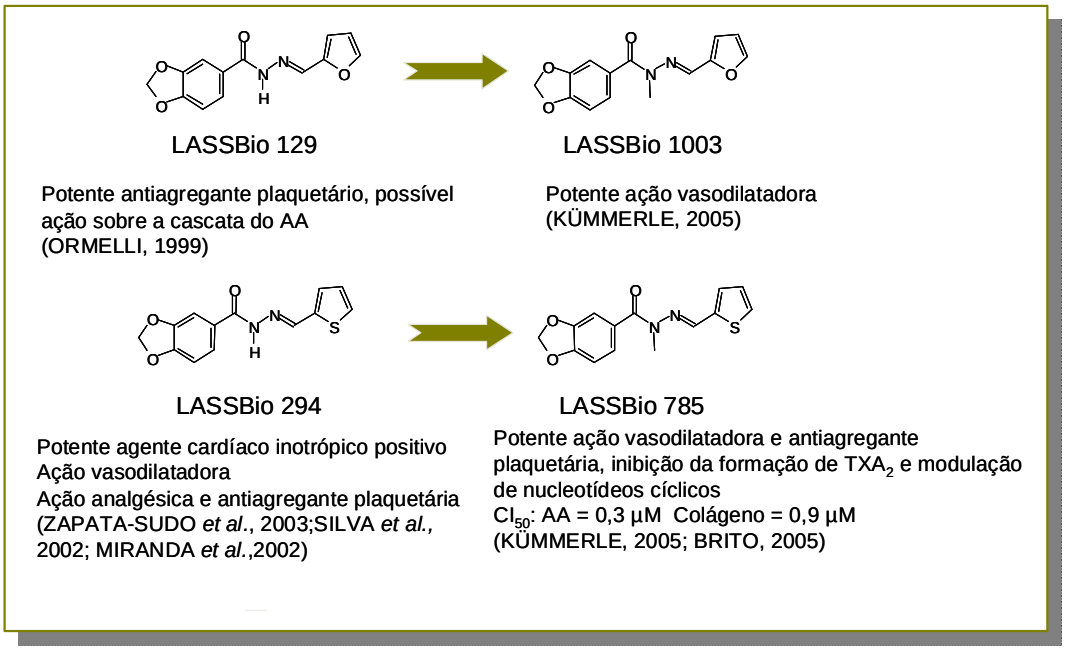


Figura 10 Perfil farmacológico dos compostos *N*-acilidrazônicos e seus derivados *N*-metilados.

Essas séries foram estruturalmente planejadas explorando modificações na posição 5 do anel furânico, a *N*-metilação do nitrogênio amídico e a introdução de unidades vinílogas, visando otimizar as propriedades antiagregantes plaquetárias do protótipo LASSBio-129 (RODRIGUES, 2008).

Os compostos LASSBio-1214, LASSBio-1215, LASSBio-1216, LASSBio-1221, LASSBio-1222 e LASSBio-1223 foram planejados por hibridação molecular e simplificação molecular entre o protótipo LASSBio-129 e o derivado hidantoínico dantroleno, um bloqueador da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático que apresenta o grupamento acilidrazona em sua estrutura (WARD, CHAFFMAN & SORKIN, 1986) (Figura 11).

O planejamento dos compostos LASSBio-1217, LASSBio-1218, LASSBio-1220 e LASSBio-1276 baseou-se na estratégia de homologação da cadeia lateral ligada ao C-2 do anel furânico, com o objetivo de avaliar a eventual influência do aumento desta cadeia no perfil antiplaquetário desses análogos (Figura 12).

Os compostos LASSBio-1219, LASSBio-1267, LASSBio-1268 e LASSBio-1275 foram planejados com o intuito de se obter compostos provavelmente mais hidrossolúveis em relação ao protótipo LASSBio-129 e analisar os efeitos estéricos e físico-químicos na agregação plaquetária (Figura 13).

Finalmente, a *N*-alquilação presente nos compostos LASSBio-1215, LASSBio-1220, LASSBio-1221, LASSBio-1222, LASSBio-1276 foi realizada para se avaliar a influência do grupo metila no perfil de bioatividade destes compostos, assim como a importância da restrição conformacional do grupo *N*-acilidrazona (Figuras 11, 12 e 13).

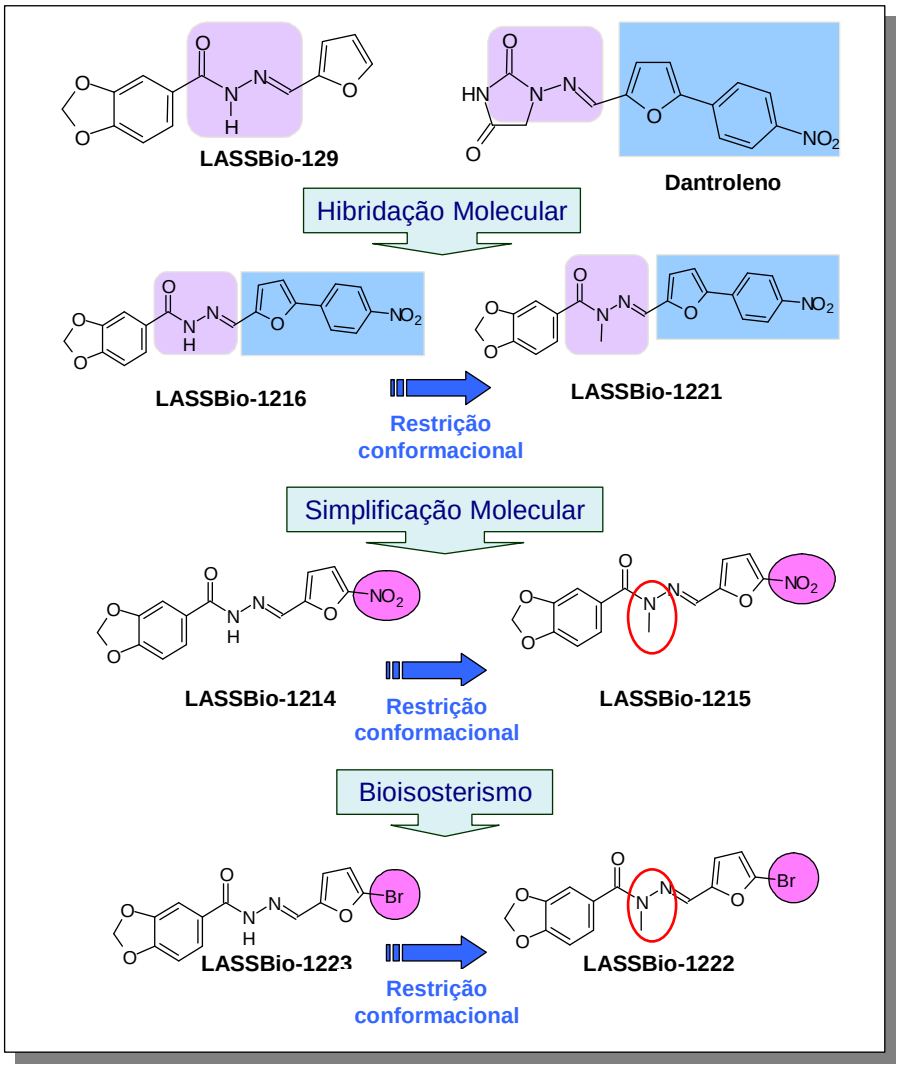


Figura 11 Modificação estrutural de LASSBio-129 através das estratégias de hibridação, simplificação molecular, restrição conformacional e bioisosterismo (RODRIGUES, 2008)

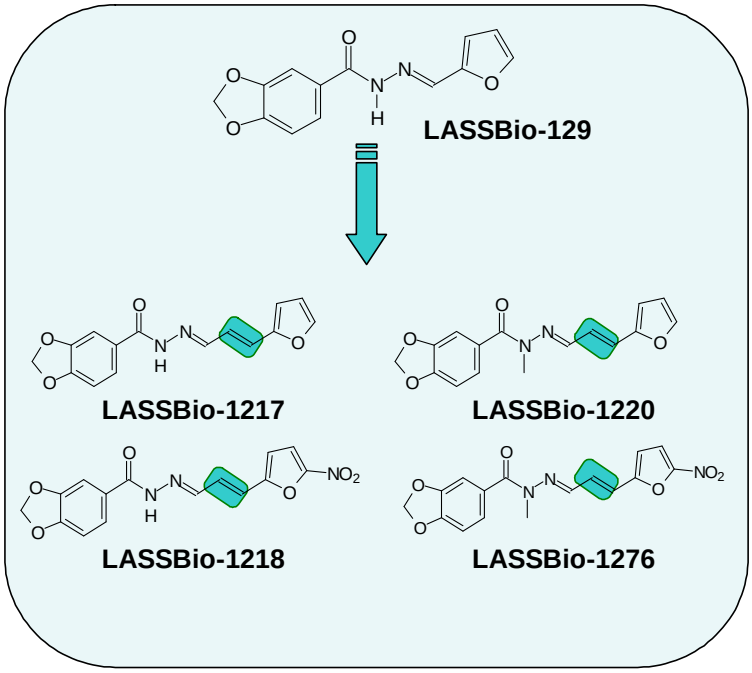


Figura 12 Série viníloga e seus respectivos compostos *N*-metilados (RODRIGUES, 2008)

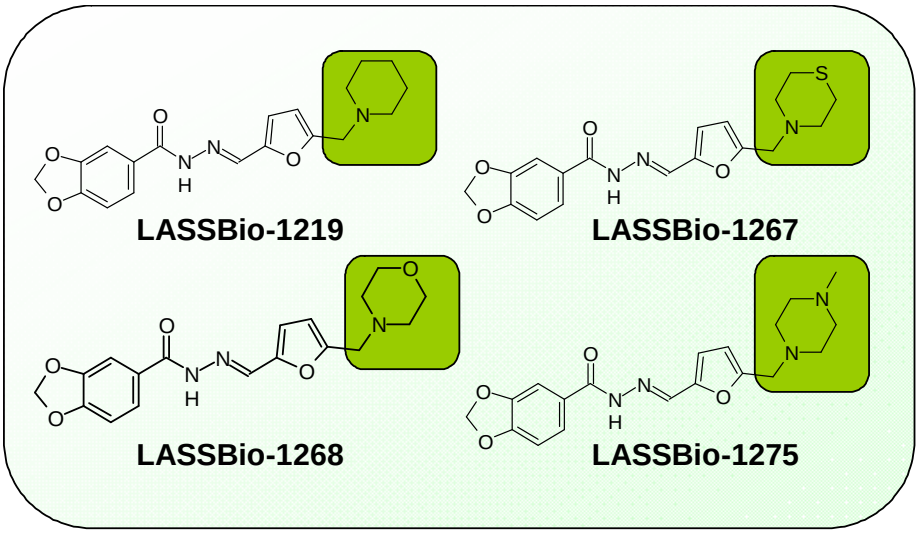


Figura 13 Série metileno aminas cíclicas (RODRIGUES, 2008)

2 OBJETIVOS

Avaliar o perfil da atividade antiagregante plaquetária das novas séries de compostos *N*-acilidrazônicos furânicos modificados a partir do protótipo LASSBio-129 (Anexo I).

- Realizar o estudo de triagem da série de compostos frente aos principais agonistas da agregação plaquetária – AA, colágeno, ADP, U46619, PAF e trombina, em plaquetas de coelho e identificar os compostos mais ativos.
- Determinar a potência dos compostos selecionados.
- Estudar a ação dos compostos em plaquetas humanas.
- Avaliar os efeitos sobre a produção de metabólitos da cascata do AA.
- Estudar os possíveis mecanismos de ação dos compostos mais ativos: estudo funcional sobre fosfodiesterases (PDEs), participação de nucleotídeos cíclicos e receptores de adenosina.
- Estudar a relação entre a estrutura química e a atividade observada para os compostos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SUBSTÂNCIAS, REAGENTES E SOLVENTES

Substância	***Fonte***
Ácido Acetilsalicílico	Synth
Ácido Araquidônico, sal sódico, 99%	SIGMA
Ácido cítrico	Grupo Química
Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA)	SIGMA
Ácido Sulfúrico	Synth
Adenosina	SIGMA
Albumina sérica bovina (BSA)	SIGMA
Álcool Etílico absoluto	Merck
Bicarbonato de Sódio ($NaHCO_3$)	Vetec
Citrato trissódico	Química Moderna
Cloreto de Magnésio ($MgCl . 6 H_2O$)	Grupo Química
Cloreto de Potássio (KCl)	MERCK
Cloreto de Sódio (NaCl)	Synth
Colágeno de tendão de Aquiles de boi, tipo I, insolúvel	SIGMA
Dideoxiadenosina (DDA)	SIGMA
Difosfato de Adenosina (ADP)	SIGMA
Dimetilsulfóxido (DMSO)	SIGMA
EHNA [eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina]	SIGMA
Formaldeído	Synth

Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	Vetec
Fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4 . 12 H_2O)	Grupo Química
Glicose	Vetec
HEPES ácido[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico]	SIGMA
Indometacina	Merck
Kit de EIA de TXB_2	Amershan
KT-5720	SIGMA
Luciferina-Luciferase	SIGMA
Milrinona	SIGMA
Nitroprussiato de sódio (SNP)	SIGMA
ODQ (1-H-[1,2,4]oxadiolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona)	SIGMA
Trifosfato de adenosina (ATP)	SIGMA
Trombina	SIGMA
U46619	SIGMA
Zaprinast	SIGMA

3.2 SOLUÇÕES

Solução EDTA 0,08M

EDTA 2,336 g

H_2O destilada q.s.p. 100 ml

Ajustar o pH para 7,4 com NaOH 0,1M

Solução Salina 0,9%

NaCl	0,9 g
H_2O destilada q.s.p.	100 ml

Solução Salina 0,9% - Formol 1%

NaCl	0,9 g
Formaldeído	1 ml
H_2O destilada q.s.p.	100 ml

Solução de Citrato de Sódio 3,8%

Citrato de sódio	3,8 g
H_2O destilada q.s.p.	100 ml

Tampão Tyrode para Lavagem de Plaquetas

NaCl	7,83 g
$NaHCO_3$	1,01 g
KCl	0,22 g
Na_2HPO_4 . 12 H_2O	0,06 g
$MgCl_2$ 6 H_2O	0,20 g
HEPES	2,38 g
Glicose	0,90 g
BSA	0,3 g/100 ml
pH	7,4
H_2O destilada q.s.p.	100 ml

Solução de ACD

Citrato trissódico	2,5 g
Ácido cítrico	1,37 g
Glicose	2,0 g
H_2O destilada q.s.p.	100 ml

Solução de colágeno 0,05%

A partir da solução estoque, preparada na concentração de 0,25% em ácido acético 3%, mantida entre 2-8℃, é preparada uma di luição em solução salina para obter concentração final de 0,05%.

Solução de Ácido Araquidônico 40 mM

O sal sódico de AA adquirido comercialmente (Sigma A8798) foi ressuspendido em etanol absoluto para preparar uma solução estoque de concentração 40 mM. Foram preparadas alíquotas em tubos eppendorf e armazenadas a -20℃.

Solução de Difosfato de Adenosina 0,4 mM

O ADP foi solubilizado em água destilada e armazenado em solução estoque na concentração de 20 mM a -20℃. A cada experiment o, uma nova solução de ADP na concentração de 0,4 mM era preparada utilizando água destilada como diluente.

Solução de U46619 0,4 mM

A solução comercial de U46619 tem como solvente o acetato de metila. O solvente foi removido por secagem em atmosfera de nitrogênio. Em seguida, adicionou-se etanol absoluto para obter uma solução estoque de 0,4 mM. Alíquotas foram preparadas e armazenadas a -20℃.

3.3 MONITORIZAÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

3.3.1 Método turbidimétrico

A atividade antiagregante plaquetária dos compostos foi determinada *in vitro* em plasma rico em plaquetas (PRP) citratado de coelhos e humano através do método turbidimétrico descrito por Born & Cross (1962), monitorada em um agregômetro Chrono-Log modelo 560-CA. Esse método consiste na monitoração da agregação plaquetária através da transmitância de luz. Um feixe de luz de comprimento de onda 240 nm atravessa o PRP, suspensão opaca de plaquetas correspondendo a 0% de transmitância, que após a adição do agente agregante torna-se progressivamente translúcida proporcionalmente à formação dos agregados, permitindo maior passagem de luz e conseqüente aumento da transmitância. O aparelho é calibrado para que o PRP corresponda a 0% de transmitância e o plasma pobre em plaquetas (PPP) corresponda a 100% de transmitância (Figura 14). Os registros da agregação foram obtidos através do software AggroLink v. 5.1.

A agregação plaquetária foi registrada até atingir o máximo de agregação e durante, no máximo, 5 minutos após a adição dos agonistas. A agregação plaquetária foi expressa em percentual de agregação para os agonistas AA, ADP e

U46619, e em velocidade de agregação (inclinação da reta tangente à curva de transmitância de luz) para o colágeno.

Alíquotas de PRP (300 µl) foram acondicionadas em cubetas siliconizadas e incubadas a 37℃ sob agitação de 1200 rpm por um pe ríodo mínimo de 1 minuto.

As substâncias teste e o veículo empregado (DMSO) foram pré-incubados por 5 minutos antes da adição do agente agregante. A concentração de DMSO na amostra não ultrapassou o limite de 1%. As amostras foram analisadas em duplicata e foram realizados no mínimo de 3 experimentos independentes para cada substância.

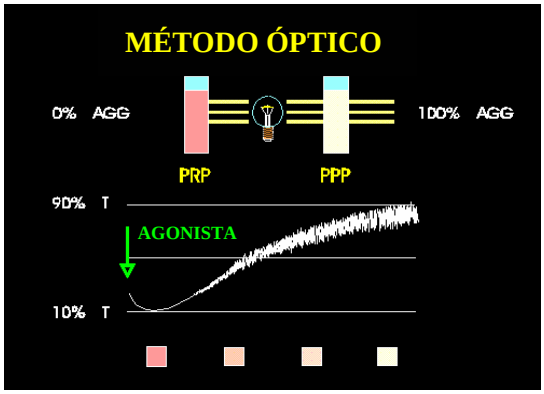


Figura 14 Registro do aumento da transmitância de luz pelo método turbidimétrico descrito por BORN & CROSS (1962).

3.3.2 Amostras de sangue

Os procedimentos experimentais obedeceram aos princípios éticos da manipulação animal, seguindo as normas para a prática didático-científica da vivissecção de animais de acordo com a lei n° 11.79 4 de 08 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008).

Foram utilizados coelhos albinos de ambos sexos mantidos no Biotério do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) da

Universidade do Brasil, com livre acesso à água e ração, em condições de temperatura ambiente variando entre 22 e 26℃, com ciclo de claro e escuro de 12h.

Foram utilizados coelhos albinos de ambos sexos, pesando entre 2,5 e 3,5 kg. O sangue foi puncionado da artéria central da orelha em citrato de sódio 3,8% na proporção de 1:9 (V/V).

Plaquetas humanas foram obtidas de voluntários adultos, saudáveis, de ambos sexos, na faixa etária de 21 a 35 anos, sem uso de medicamentos ou outras substâncias que pudessem interferir no experimento pelo período mínimo de 15 dias. O sangue foi coletado por punção venosa da veia braquial média, com auxílio de scalp 21 e seringa de 20 ml, em citrato 3,8% ou ACD (ensaio com plaquetas lavadas), na proporção de 9 volumes de sangue para 1 volume de citrato ou ACD. Todas as amostras de sangue humano empregadas nos estudos foram obtidas de indivíduos voluntários doadores que assinaram consentimento informado sobre a utilização do material doado. Não foi realizado qualquer tipo de estudo clínico.

3.3.3 Obtenção do PRP e do PPP

Para todas as espécies, o PRP foi obtido por centrifugação a 500 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. A separação do plasma foi realizada com cuidado a fim de evitar ativação plaquetária. O PPP foi obtido por centrifugação do sedimento a 2.000 x g, por 10 minutos, à temperatura ambiente.

3.3.4 Agonistas da Agregação

Foram utilizados como agonistas da agregação plaquetária:

- *Em PRP de coelhos:* AA (200 µM), colágeno (5 µg/ml), ADP (5 µM) e U46619 (3 µM).

- *Em PRP humano:* AA (500 µM), colágeno (5 µg/ml), ADP (3 µM).

As concentrações dos agonistas escolhidas foram as concentrações capazes de induzir a agregação plaquetária submáxima. Durante o experimento, os agonistas foram mantidos a 0℃.

3.3.5 Contagem de Plaquetas

Uma alíquota de 20 µl de PRP foi diluída em 980 µl de solução salina-formol 1%. A contagem foi realizada em Câmara de Neubauer e a leitura em microscópio óptico Olympus, modelo BX 40, aumento de 100x. As suspensões de plaquetas de coelho e humanas foram utilizadas nas concentrações média de 600.000 plaquetas/µl e 300.000 plaquetas/µl, respectivamente.

3.3.6 Estudo da agregação plaquetária em plaqueta lavada

O sangue foi coletado em 1 volume de ACD para 9 volumes de sangue, centrifugado por 10 minutos a 500 x g para remoção dos eritrócitos. O PRP foi centrifugado então a 2000 x g por 12 minutos para obtenção do *pellet* plaquetário. O sobrenadante foi descartado e as plaquetas suspensas em tampão Tyrode de lavagem. Realizou-se nova centrifugação, descarte do sobrenadante e as plaquetas foram novamente suspensas no tampão Tyrode. O experimento de agregação foi realizado utilizando o tampão Tyrode como 100% de transmitância.

Procedeu-se a agregação conforme descrito em 3.3.1 empregando-se a trombina 0,05 UI/ml como agente agregante.

3.3.7 Estudo indireto da atividade inibidora de fosfodiesterases em plaqueta humana lavada

A atividade qualitativa sobre a inibição de PDE foi avaliada indiretamente utilizando plaqueta humana lavada estimulada por trombina 0,5 UI/ml na presença ou ausência do doador de óxido nítrico, SNP (10 µM) e inibidor de PDE3 (milrinona 100 µM), monitorada através de método turbidimétrico conforme descrito na seção 3.3.1. Os compostos foram avaliados entre 100-300 µM, pré-incubados por 1 minuto com SNP ou SNP + milrinona antes da adição de trombina. O registro da agregação foi realizado por 2 minutos (DICKINSON *et al.*, 1997).

3.3.8 Estudo do efeito da inibição da guanilato ciclase estimulada por NO na agregação plaquetária em PRP citratado de coelhos e humano

O inibidor da guanilato ciclase estimulada por NO, ODQ, 1-H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona, foi incubado na concentração de 10 µM por 5 minutos em PRP humano ou de coelhos e, posteriormente, foram adicionados os compostos teste na concentração de 100 µM, incubados por mais 5 minutos. O colágeno (5 µg/ml) foi empregado como agonista da agregação plaquetária, monitorada conforme descrito na seção 3.3.1 (JANG *et al*., 2002). O composto SNP foi utilizado como controle positivo (10-100 µM).

3.3.9 Estudo do efeito da inibição da adenilato ciclase na agregação plaquetária em PRP citratado de coelhos e humano

O inibidor de adenilato ciclase, 2', 5' dideoxiadenosina (DDA), foi incubado na concentração de 100 µM por 5 minutos em PRP de coelhos e, posteriormente, foram adicionados os compostos teste na concentração de 100 µM, incubados por mais 5 minutos. O colágeno (5 µg/ml) foi empregado como agonista da agregação plaquetária, monitorada conforme descrito na seção 3.3.1. O inibidor da agregação plaquetária adenosina, agonista do receptor A_{2A} acoplado à proteína Gs, foi utilizado como controle positivo (JANG *et al*., 2002).

3.3.10 Estudo do efeito da inibição de PKA na agregação plaquetária em PRP de coelhos e humano

O inibidor de PKA, KT-5720, foi incubado na concentração de 5 µM por 5 minutos e, posteriormente, foram adicionados os compostos teste na concentração de 100 µM e incubados por mais 5 minutos. O colágeno (5 µg/ml) foi empregado como agonista da agregação plaquetária, monitorada conforme descrito na seção 3.3.1. O nitroprussiato de sódio (SNP), doador de óxido nítrico, foi utilizado como controle positivo (LI *et al*., 2003).

3.3.11 Estudo da agregação plaquetária em sangue humano total

A agregação plaquetária em sangue humano total foi realizada através do método de impedância. A impedância foi medida em sangue diluído em solução fisiológica (NaCl 0,9%) na proporção 1:1 através do uso de eletrodos apropriados. O

colágeno (20 µg/ml) foi empregado como agonista e o registro da impedância feito em Ω/min (CARDINAL & FLOWER, 1980).

3.3.12 Estudo da secreção plaquetária através da medida da luminescência (FEINMAN *et al.*, 1977)

A reação de secreção plaquetária foi medida através da quantificação do ATP secretado por luminescência empregando-se o reagente luciferina-luciferase. O reagente é adicionado à suspensão de plaquetas quatro minutos antes da adição do agonista (colágeno 5 µg/ml). A luciferina/luciferase reage com o ATP liberado a partir dos grânulos de estocagem, degradando-o em AMP, com emissão de fótons de energia (luminescência). A intensidade de luminescência é previamente calibrada na presença de uma concentração de 2 nM de ATP, estabelecendo um ganho no aparelho que permite o registro da luminscência em torno de 50%. Os resultados de secreção foram obtidos através da seguinte relação:

nM ATP secretado = luminescência do ensaio/ganho do ensaio x ganho do padrão/luminescência do padrão x nM ATP padrão

3.4 DOSAGEM DE TXB_2 EM SANGUE HUMANO

Foi procedido o ensaio de agregação plaquetária em PRP humano citratado conforme descrito na seção 3.3.1 e empregando-se o AA como agonista na concentração de 500 µM – concentração capaz de produzir agregação paquetária

submáxima em plaquetas humanas. Após 5 minutos da adição de AA, a reação de formação de TXB_2 foi interrompida pela adição de indometacina 10 μM e EDTA 2 mM. O plasma foi então centrifugado a 6.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante recolhido e armazenado entre 2-8℃ para posterior dosagem de TXB_2. A dosagem foi realizada por kits de ensaio imunoenzimático, conforme orientação do fabricante. As amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram analisados por ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet ou pelo teste “t” de Student, ambos testes para um nível de significância de *$p<0,05$. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média utilizando o programa Prisma Plot versão 4.0. Os valores de CI_{50} (concentração da substância inibitória que produz 50% de inibição da resposta) foram obtidos através de regressão não linear.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO DE TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA DOS NOVOS DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS ANÁLOGOS AO LASSBio-129

4.1.1 Avaliação dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária (AP) induzida por AA (200 μM) em PRP citratado de coelhos

Os compostos LASSBio-129, LASSBio-1003, LASSBio-1215, LASSBio-1217, LASSBio-1220, LASSBio-1221, LASSBio-1222, LASSBio-1223 e LASSBio-1276, na concentração de 100 μM, foram capazes de inibir significativamente a agregação plaquetária (AP) induzida por AA (Tabela 2). Cinco dos compostos – LASSBio-1220, LASSBio-1222, LASSBio-1223, LASSBio-1003 e LASSBio-1276 - inibiram a agregação em 100%. o fármaco dantroleno, protótipo utilizado no planejamento estrutural, não apresentou atividade inibitória.

4.1.2 Avaliação dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 μg/ml) em PRP citratado de coelhos

Os compostos LASSBio-1215, LASSBio-1220, LASSBio-1222, LASSBio-1223, LASSBio-1003 e LASSBio-1276, na concentração de 100 μM, inibiram significativamente a AP induzida por colágeno de 50-76% (Tabela 3).

Todos os seis compostos ativos frente a esse agonista também inibiram a agregação plaquetária induzida por AA, o que sugere que o mecanismo de inibição

possa estar relacionado à cascata do AA, já que a formação de TXA_2 é uma via comum à ação de ambos agonistas.

Tabela 2 - Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico (200 μM) em PRP citratado de coelho

Substância (100 μM)	n	% Agregação	%Inibição
AA 200 μM	7	70,1 ± 3,9	-
DMSO[#]	7	60,7 ± 6,0	14,0 n.s.
LASSBio-129	4	16,9 ± 12,4	**72,1****
LASSBio-1003	4	0,0 ± 0,0	**100****
LASSBio-1214	4	61,0 ± 13,7	-0,5 n.s.
LASSBio-1215	4	4,3 ± 3,0	**93,0****
LASSBio-1216	4	69,8 ± 6,2	-14,9 n.s.
LASSBio-1217	7	15,7 ± 11,0	**74,1****
LASSBio-1218	4	53,8 ± 19,4	11,4 n.s.
LASSBio-1219	4	56,3 ± 19,3	7,2 n.s.
LASSBio-1220	4	0,0 ± 0,0	**100****
LASSBio-1221	6	28,5 ± 11,6	**53,0***
LASSBio-1222	4	0,0 ± 0,0	**100****
LASSBio-1223	4	0,0 ± 0,0	**100****
LASSBio-1267	3	49,4 ± 13,2	18,6 n.s.
LASSBio-1268	3	61,7 ± 4,1	-1,6 n. s.
LASSBio1275	3	58,0 ± 4,9	4,5 n.s.
LASSBio-1276	3	0,0 ± 0,0	**100****
Dantroleno	3	62,3 ± 4,4	-2,6 n.s.

Resultados expressos em média ± erro padrão; n = número de experimentos independentes; n.s. = não significativo; *p<0,05, **p<0,01 (ANOVA oneway; Dunnet test). Substâncias foram incubadas com o PRP 5 min antes da adição do agonista. [#]A concentração de veículo nas amostras não excedeu 1%.

Tabela 3 - Efeito dos compostos na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP citratado de coelho

Substância (100 µM)	% Agregação/minuto	%Inibição
Colágeno 5 µg/ml	58,5 ± 4,1	-
DMSO[#]	62,0 ± 1,6	5,9 n.s.
LASSBio-129	55,0 ± 3,5	11,3 n.s.
LASSBio-1003	31,2 ± 3,2	**49,6****
LASSBio-1214	60,0 ± 4,6	3,2 n.s.
LASSBio-1215	15,0 ± 2,9	**75,8****
LASSBio-1216	53,5 ± 3,7	13,7 n.s.
LASSBio-1217	51,0 ± 1,0	17,7 n.s.
LASSBio-1218	60,7 ± 2,5	2,1 n.s.
LASSBio-1219	47,8 ± 6,7	22,9 n.s.
LASSBio-1220	17,5 ± 5,4	**71,7****
LASSBio-1221	48,1 ± 5,2	22,4 n.s.
LASSBio-1222	19,2 ± 5,9	**69,0****
LASSBio-1223	18,5 ± 6,0	**70,2****
LASSBio-1267	57,7 ± 3,0	6,9 n.s.
LASSBio-1268	63,5 ± 1,0	-2,4 n.s.
LASSBio1275	60,7 ± 2,9	2,1 n.s.
LASSBio-1276	27,8 ± 2,6	**55,2****
Dantroleno	74 ± 5,1	-19,3 n.s.

Resultados expressos em média ± erro padrão; n = 3 (número de experimentos independentes); n.s. = não significativo; **p<0,01 (ANOVA oneway; Dunnet test). Substâncias foram incubadas com o PRP 5 min antes da adição do agonista. [#]A concentração de veículo nas amostras não excedeu 1%.

4.1.3 Avaliação dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por ADP (5 μM) em PRP citratado de coelhos

Os derivados LASSBio-1215 e LASSBio-1276, na concentração de 100 μM, foram os únicos capazes de inibir significativamente a agregação induzida por ADP, embora esta inibição tenha se apresentado de forma mais moderada comparada com os agonistas anteriores (Tabela 4).

4.1.4 Avaliação dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por U46619 (3 μM) em PRP citratado de coelhos

Nenhum dos compostos foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida pelo análogo de PGH_2, U46619, agonista do receptor TP, na concentração de 100 μM (Tabela 5).

4.1.5 Avaliação dos derivados *N*-Acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por PAF (1 μM) em PRP citratado de coelho

Os derivados mais ativos foram avaliados na concentração de triagem (100 μM) frente ao PAF. Não foi observado efeito antiagregante plaquetário significativo (Gráfico 1A).

Tabela 4 - Efeito dos compostos na agregação plaquetária induzida por ADP (5 μM) em PRP citratado de coelho

Substância (100 μM)	n	% Agregação	%Inibição
ADP 5 μM		57,9 ± 4,5	-
DMSO[#]	7	54,5 ± 1,9	5,8 n.s.
LASSBio-129	3	46,8 ± 3,3	14,1 n.s.
LASSBio-1003	3	53,3 ± 3,1	2,2 n.s.
LASSBio-1214	3	46,2 ± 2,4	15,2 n.s.
LASSBio-1215	3	40,5 ± 2,0	**25,7***
LASSBio-1216	3	48,9 ± 4,4	10,3 n.s.
LASSBio-1217	3	46,0 ± 0,6	15,6 n.s.
LASSBio-1218	3	44,5 ± 4,1	18,3 n.s.
LASSBio-1219	3	45,8 ± 3,0	15,9 n.s.
LASSBio-1220	3	55,3 ± 1,5	1,4 n.s.
LASSBio-1221	3	49,5 ± 1,1	9,2 n.s.
LASSBio-1222	3	44,3 ± 8,4	18,7 n.s.
LASSBio-1223	3	46,3 ± 2,3	15,0 n.s.
LASSBio-1267	3	55,0 ± 1,3	0,0 n.s.
LASSBio-1268	3	57,8 ± 3,4	0,0 n.s.
LASSBio1275	3	50,3 ± 0,9	7,7 n.s.
LASSBio-1276	3	42,2 ± 3,5	**22,6***
Dantroleno		Não realizado	

Resultados expressos em média ± erro padrão; n = número de experimentos independentes; n.s. = não significativo; *p<0,05 (ANOVA oneway; Dunnet test). Substâncias foram incubadas com o PRP 5 min antes da adição do agonista. [#] A concentração de veículo nas amostras não excedeu 1%.

Tabela 5 - Efeito dos compostos na agregação plaquetária induzida por U46619 (3 μM) em PRP citratado de coelho

Substância (100 μM)	n	% Agregação	%Inibição
DMSO[#]	4	60,0± 1,8	8,3 n.s.
LASSBio-129	3	65,0 ± 2,0	6,7 n.s.
LASSBio-1003	3	60,0 ± 8,4	3,3 n.s.
LASSBio-1214	3	56,0 ± 5,2	6,7 n.s.
LASSBio-1215	4	52,0 ± 2,8	13,3 n.s.
LASSBio-1216	4	44,0 ± 6,3	26,7 n.s.
LASSBio-1217	3	54 ,0 ± 6,9	10,0 n.s.
LASSBio-1218	4	53,0 ± 5,1	11,6 n.s.
LASSBio-1219	3	52,0 ± 2,6	13,3 n.s.
LASSBio-1220	3	49,0 ± 4,0	18,3 n.s.
LASSBio-1221	4	62,0 ± 3,0	3,3 n.s.
LASSBio-1222	3	52,0 ± 5,5	13,3 n.s.
LASSBio-1223	3	53,0 ± 4,6	11,7 n.s.
LASSBio-1267	3	58,0 ± 0,0	3,3 n.s.
LASSBio-1268	3	70,0 ± 2,6	16,7 n.s.
LASSBio1275	3	59,0 ± 7,2	1,7 n.s.
LASSBio-1276	4	47,0 ± 14,0	21,7 n.s.
Dantroleno		Não realizado	

Resultados expressos em média ± erro padrão; n = número de experimentos independentes; n.s. = não significativo; *p<0,05 (ANOVA oneway; Dunnet test). Substâncias foram incubadas com o PRP 5 min antes da adição do agonista. [#] A concentração de veículo nas amostras não excedeu 1%.

4.1.6 Avaliação dos derivados *N*-Acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por trombina (0,5 UI/ml) em plaqueta de coelho lavada

Tendo em vista a relevante atividade antiagregante plaquetária observada em PRP de coelhos, os compostos mais ativos (100 µM) foram avaliados em plaqueta lavada de coelhos frente à trombina 0,5 UI/ml. Nenhum dos compostos apresentou atividade relevante frente a esse agonista (Gráfico 1B).

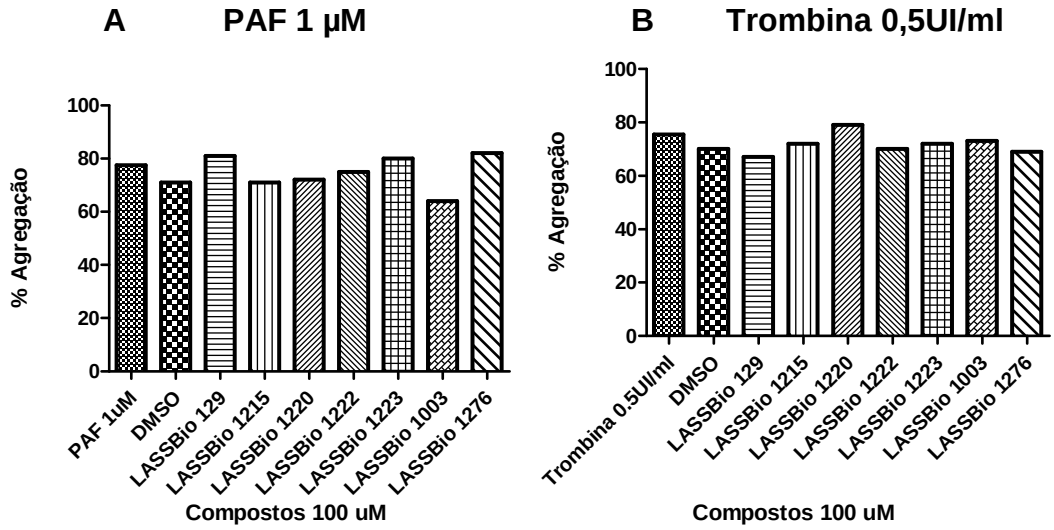


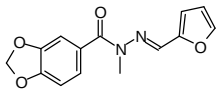
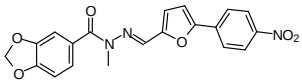
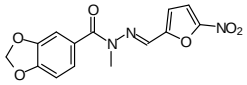
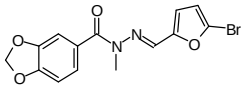
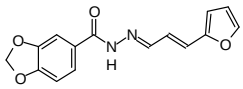
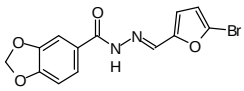
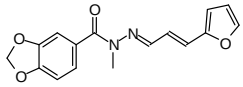
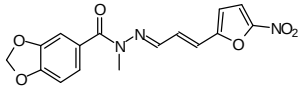
Gráfico 1 Efeito dos compostos *N*-acilidrazônicos mais ativos na agregação plaquetária induzida por PAF 1 µM em PRP de coelhos; e trombina 0,5 UI/ml em plaqueta de coelhos lavada. n = 3 experimentos independentes.

Os estudos de triagem permitiram a seleção de um grupo de oito compostos que apresentaram atividade significativa na agregação induzida por AA e de seis compostos ativos na agregação induzida por colágeno. A potente atividade desses compostos frente a esses dois agonistas aponta para um mecanismo de ação sobre a cascata do AA, uma vez que ambos ativam a plaqueta por uma via comum que envolve a participação de metabólitos do AA (KARNIGUIAN *et al.,*1990). A atividade antiagregante plaquetária dos derivados *N*-acilidrazônico se dá, possivelmente, pela

inibição da enzima COX-1, principal isoforma encontrada na plaqueta, e/ou pela inibição da enzima tromboxana sintase. A ação inibitória sobre o receptor de TXA_2, TP, pode ser excluída, uma vez que os compostos foram incapazes de inibir a AP induzida pelo agonista desse receptor, U46619. Além disso, em PRP de coelhos, a agregação induzida por ADP não é majoritariamente dependente da formação de TXA_2 e os compostos da série não apresentaram atividade inibitória da agregação induzida por esse agonista. Da mesma forma, a inatividade frente aos demais agonistas cujas vias de sinalização são independentes do metabolismo do AA, reforçam essa hipótese.

Os compostos mais ativos (Tabela 6) foram selecionados para os estudos de potência. Esses estudos permitirão identificar possíveis diferenças na atividade observada resultantes das modificações estruturais propostas.

Tabela 6 – Compostos selecionados para estudos de potência

Compostos			
LASSBio-1003		LASSBio-1221	
LASSBio-1215		LASSBio-1222	
LASSBio-1217		LASSBio-1223	
LASSBio-1220		LASSBio-1276	

4.2 ESTUDOS DE POTÊNCIA

4.2.1 Determinação da potência dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por AA (200 μM) em PRP citratado de coelhos

Depois de identificados os compostos mais ativos frente aos principais agonistas da agregação plaquetária, foi iniciado o estudo de determinação de suas potências (CI_{50}) na agregação induzida por AA em PRP citratado de coelhos (Tabela 7; Figuras 15-17).

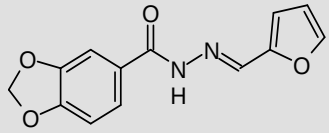
Os compostos foram testados individualmente em concentrações crescentes de 0,3 μM, 1 μM, 3 μM, 10 μM, 30 μM, 100 μM e 300 μM.

Tabela 7 – Potência (CI_{50}) dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por AA (200 μM) em PRP citratado de coelho

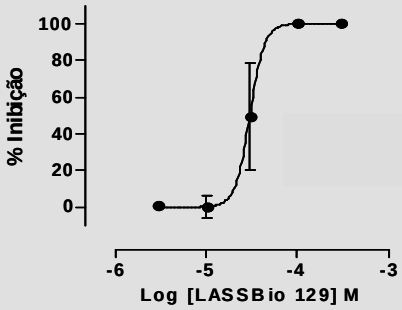
Compostos	n	CI_{50} (μM)
LASSBio-129	5	30,1 (29,8 – 30,4)
LASSBio-1003	5	1,2 (0,4 – 3,4)
LASSBio-1215	5	0,7 (0,6 – 1,1)
LASSBio-1217	5	47,4 (43,8 – 51,3)
LASSBio-1220	6	1,7 (0,9 – 3,1)
LASSBio-1221	5	29,6 (27,6 – 31,7)
LASSBio-1222	7	2,0 (1,9 – 2,2)
LASSBio-1223	8	7,9 (6,2 – 10,2)
LASSBio-1276	4	23,2 (23,1 – 23,4)

Resultados de CI_{50} com intervalo de confiança de 95% do valor de CI_{50}. n= número de experimentos independentes. Substâncias foram incubadas com o PRP 5 min antes da adição do agonista

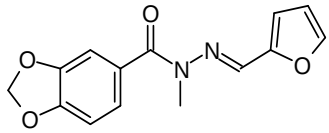
LASSBio-129



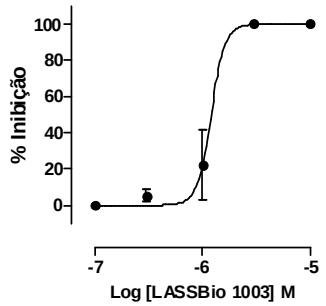
CI_{50} = 30,1 µM



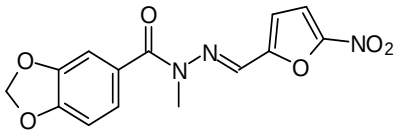
LASSBio-1003



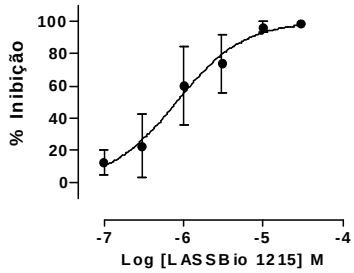
CI_{50} = 1,2 µM



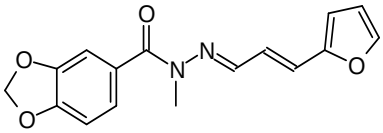
LASSBio-1215



CI_{50} = 0,7 µM



LASSBio-1220



CI_{50} = 1,7 µM

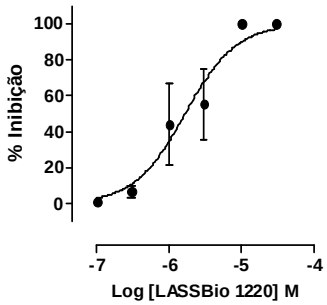


Figura 15 Curvas c*oncentração X efeito* (% inibição agregação plaquetária) dos derivados LASSBio-129, LASSBio-1003, LASSBio-1215 e LASSBio-1220 na agregação plaquetária induzida por AA (200 µM) em PRP de coelho

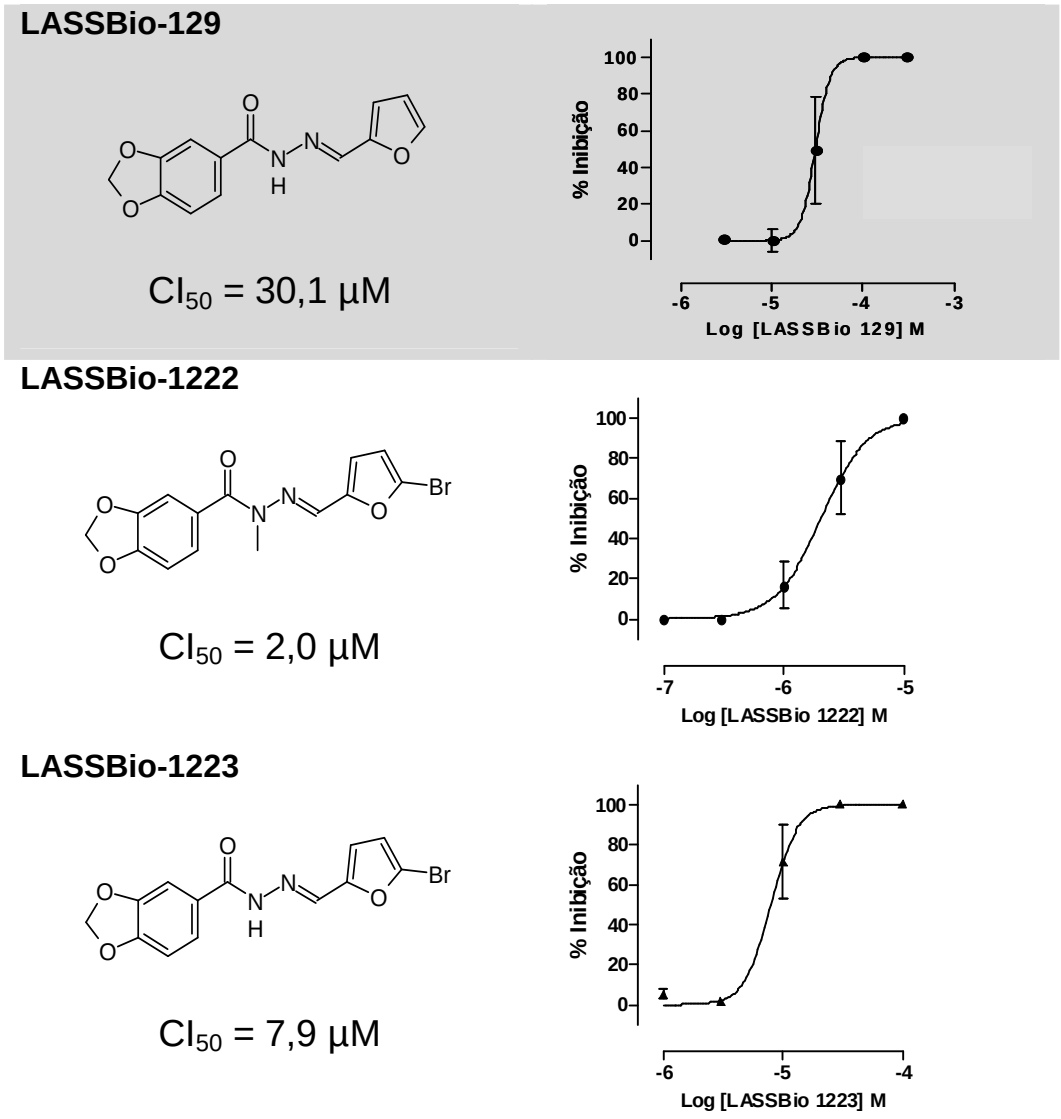


Figura 16 Curvas c*oncentração X efeito* (% inibição agregação plaquetária) dos derivados LASSBio-129, LASSBio-1222 e LASSBio-1223 na agregação plaquetária induzida por AA (200 µM) em PRP de coelho

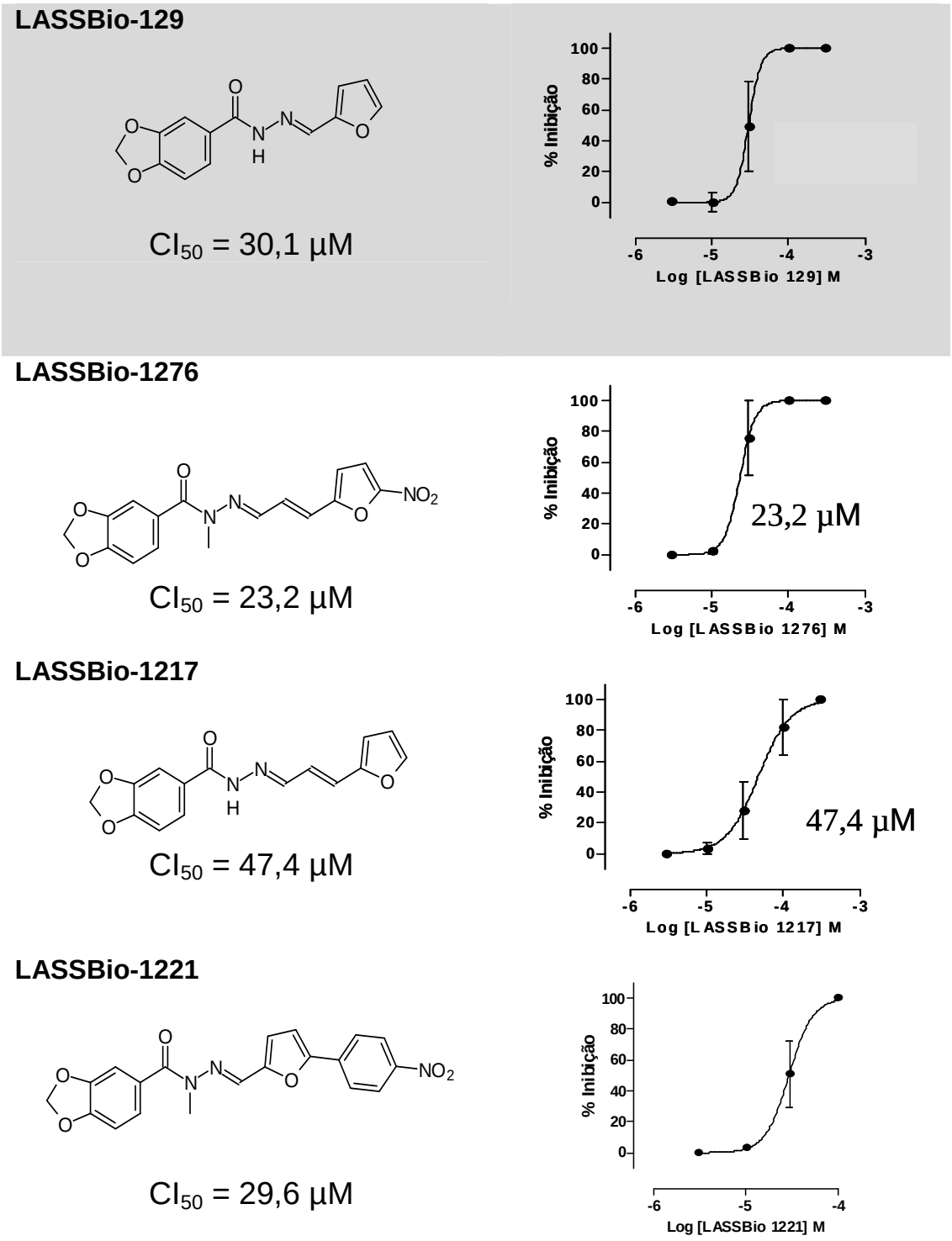


Figura 17 Curvas c*oncentração X efeito* (% inibição agregação plaquetária) dos derivados LASSBio-129, LASSBio-1276, LASSBio-1217 e LASSBio-1221 na agregação plaquetária induzida por AA (200 µM) em PRP de coelho

4.2.2 Determinação da potência dos compostos *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP citratado de coelhos

Foi realizado estudo da potência antiagregante plaquetária dos compostos mais ativos frente ao colágeno em PRP citratado de coelhos através da determinação das respectivas CI_{50} (Tabela 8; Figuras 18 e 19).

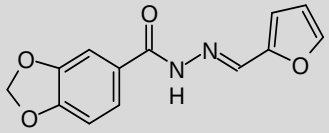
Os compostos foram testados individualmente em concentrações crescentes de 0,3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM, 100 µM e 300 µM.

Tabela 8 – Potência (CI_{50}) dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP citratado de coelho

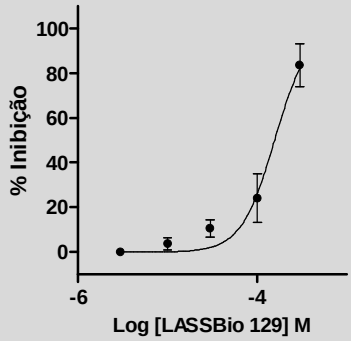
Compostos	**n**	**CI_{50} (µM)**	
LASSBio-129	5	156,1	(114,4-212,9)
LASSBio-1003	7	8,2	(6,0 – 11,1)
LASSBio-1215	8	4,5	(3,9 – 5,1)
LASSBio-1220	7	6,1	(4,3 – 8,5)
LASSBio-1222	7	6,0	(4,9 – 7,4)
LASSBio-1223	6	47,7	(39,7 – 57,3)
LASSBio-1276	6	41,2	(32,7 – 51,7)

Resultados de CI_{50} com intervalo de confiança de 95% do valor de CI_{50}. n= no. de experimentos independentes. Substâncias foram incubadas com o PRP 5 min antes da adição do agonista.

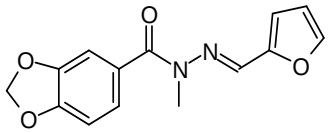
LASSBio-129



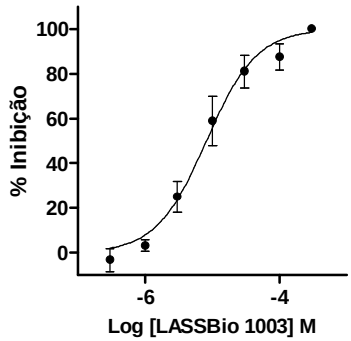
CI_{50} = 156,1 µM



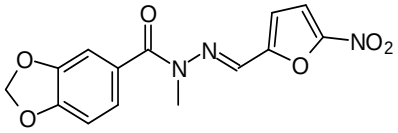
LASSBio-1003



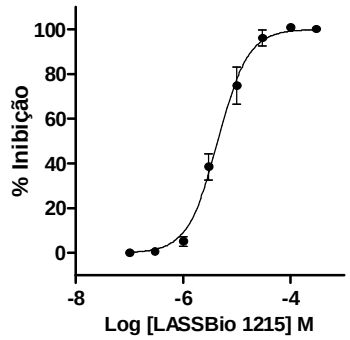
CI_{50} = 8,2 µM



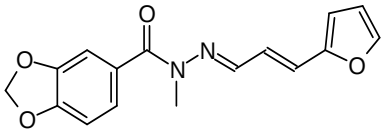
LASSBio-1215



CI_{50} = 4,5 µM



LASSBio-1220



CI_{50} = 6,1 µM

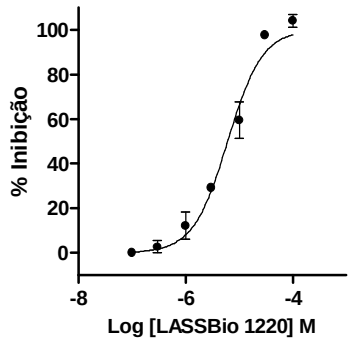
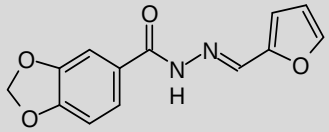
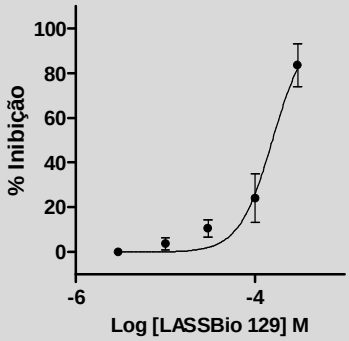


Figura 18 Curvas *concentração X efeito* (% inibição agregação plaquetária) dos derivados LASSBio-129, LASSBio-1003, LASSBio-1215 e LASSBio-1220 na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP de coelho

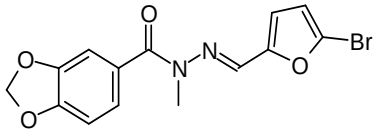
LASSBio-129



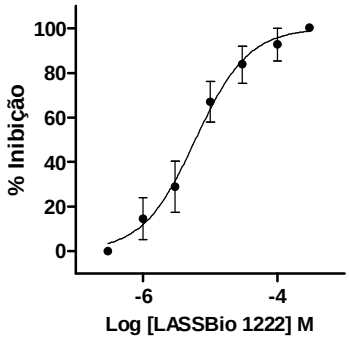
CI_{50} = 156,1 µM



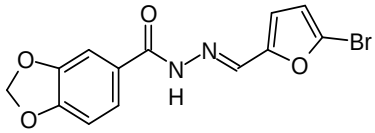
LASSBio-1222



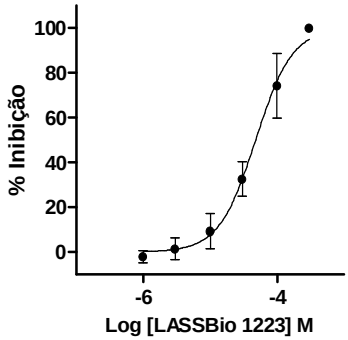
CI_{50} = 6,0 µM



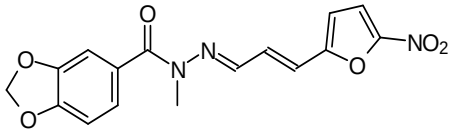
LASSBio-1223



CI_{50} = 47,7 µM



LASSBio-1276



CI_{50} = 41,2 µM

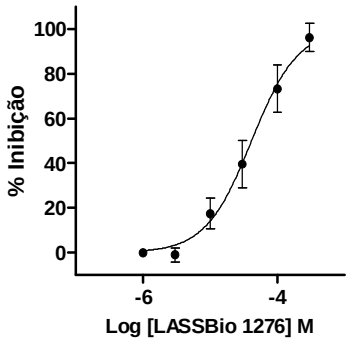


Figura 19 Curvas *concentração X efeito* (% inibição agregação plaquetária) dos derivados LASSBio-129, LASSBio-1222, LASSBio-1223 e LASSBio-1276 na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP de coelho

4.3 ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA x ATIVIDADE DOS DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS

Buscando identificar os compostos mais ativos da série e compreender o perfil de atividade frente às modificações estruturais propostas, foram iniciados os estudos de potência.

Com base nos estudos de potência, podemos identificar dois grupos de derivados de acordo com a ordem de grandeza da potência (CI_{50}) apresentada frente ao AA: o primeiro grupo, formado pelos compostos LASSBio-1215, LASSBio-1220, LASSBio-1222, LASSBio-1223 e LASSBio-1003 (Figura 20), que apresentaram valores de CI_{50} entre 0,7 μM e 8 μM; e o segundo grupo, formado pelos compostos LASSBio-1217, LASSBio-1221 e LASSBio-1276 (Figura 21), que apresentaram valores de CI_{50} entre 23 μM e 47 μM.

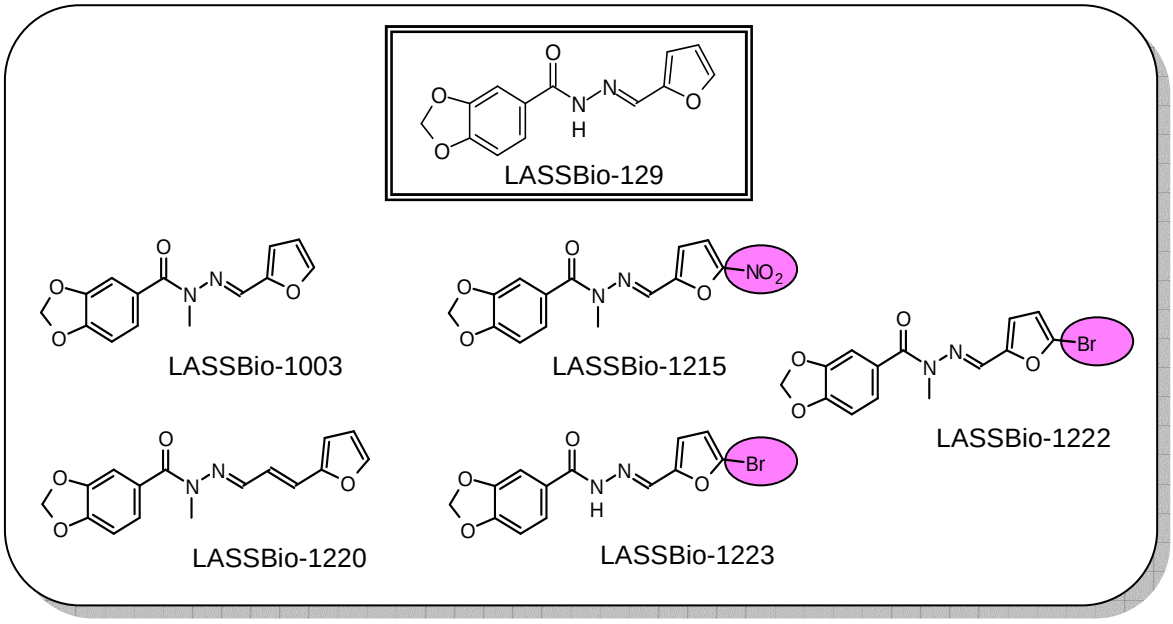


Figura 20 Compostos de potência elevada - potências entre 0,7 μM e 8 μM

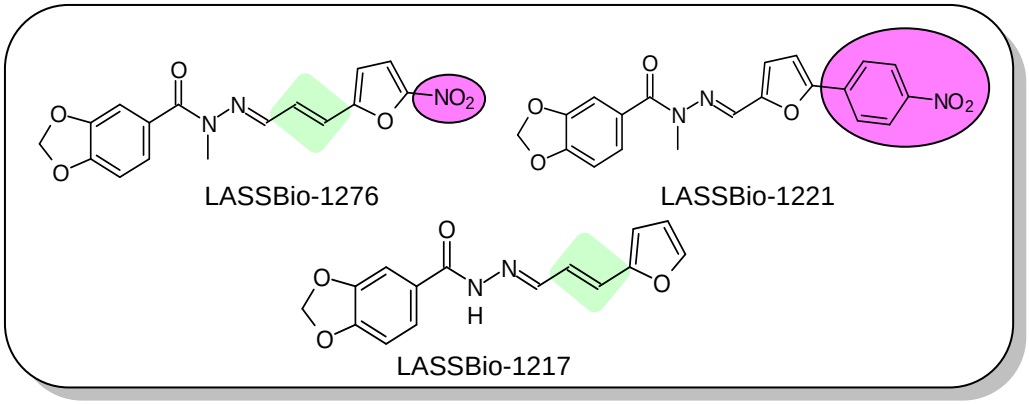


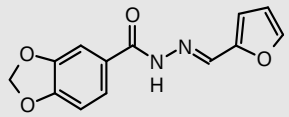
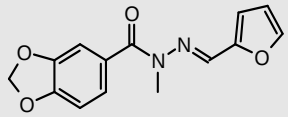
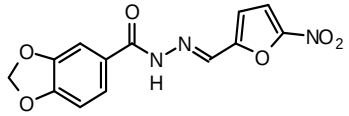
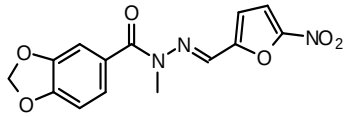
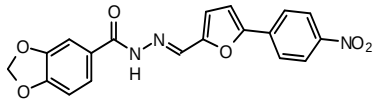
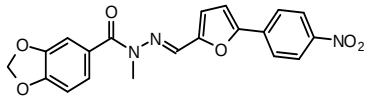
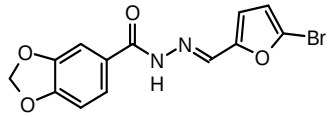
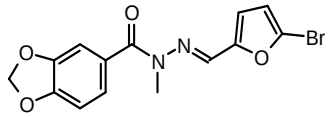
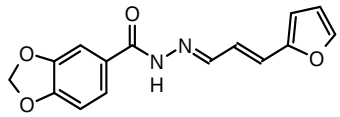
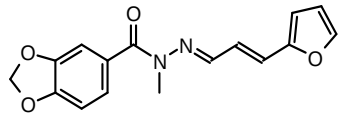
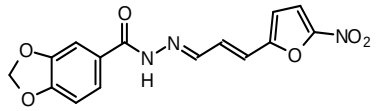
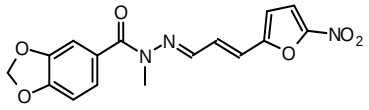
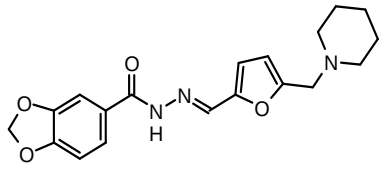
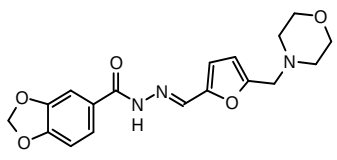
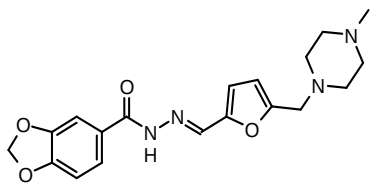
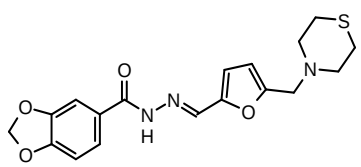
Figura 21 Compostos de potência moderada: potências entre 23 µM e 47 µM

O primeiro grupo apresentou atividade otimizada em relação ao seu protótipo LASSBio-129.

A introdução do grupo metila no nitrogênio amídico da acilidrazona representou um importante incremento da atividade antiagregante plaquetária, o que pode ser observado se comparamos as atividades de todos os compostos metilados da série em relação a seus análogos não metilados (Tabela 9). Esses resultados corroboram aqueles observados na potencialização da atividade antiagregante plaquetária de derivados tienilacilidrazônicos através da introdução de substituintes no *N*-amídico do grupamento *N*-acilidrazona (KÜMMERLE, 2005; BRITO, 2005).

A introdução de substituintes na posição 5 do anel furânico, com exceção dos substituintes bromo e nitro, representou uma perda significativa da atividade, a exemplo de LASSBio-1216 e LASSBio-1221, com substituinte *p*-nitrofenila, e de LASSBio-1219, LASSBio-1267, LASSBio-1268 e LASSBio-1275, com as subunidades metileno amina cíclica (Tabela 9). Analisando a potência do derivado LASSBio-1215 (CI_{50} = 0,7 µM frente ao AA e 4,5 µM frente ao colágeno), podemos observar que a introdução do grupamento nitro (NO_2) conferiu a este o dobro da potência em relação ao seu análogo não substituído, LASSBio-1003 (CI_{50} = 1,2 µM frente ao AA e 8,2 µM frente ao colágeno).

Tabela 9 – Tabela comparativa da atividade antiagregante plaquetária dos derivados *N*-acilidrazônicos metilados e não-metilados (100 μM) na AP induzida por colágeno (5 μg/ml) e AA (200 μM) em PRP de coehos.

Composto	% Inibição		Composto	% Inibição	
LASSBio-129	AA	Col	LASSBio-1003	AA	Col
	72,1	11,3		100	49,6
LASSBio-1214 	n.s.	n.s.	LASSBio-1215 	93,0	75,8
LASSBio-1216 	n.s.	n.s.	LASSBio-1221 	53,0	n.s.
LASSBio-1223 	100	70,2	LASSBio-1222 	100	69,0
LASSBio-1217 	74,1	n.s.	LASSBio-1220 	100	71,7
LASSBio-1218 	11,4	n.s.	LASSBio-1276 	100	55,2
LASSBio-1219 	n.s.	n.s.	LASSBio-1268 	n.s.	n.s.
LASSBio-1275 	11,8	n.s.	LASSBio-1267 	18,6	n.s.

Por outro lado, a introdução do átomo bromo, presente em LASSBio-1223, significou um importante aumento da atividade observada, uma vez que este composto foi o análogo não metilado mais potente da série, sendo sua potência comparável à dos compostos *N*-metilados na agregação plaquetária induzida por AA (Tabela 7). Vale a pena ressaltar que na série de compostos tienilacilidrazônicos, o composto bromo-substituído, LASSBio-789 (CI_{50} = 3,1 µM frente ao AA e 3,4 µM frente ao colágeno), também representou incremento de atividade antiagregante plaquetária em relação ao seu protótipo não substituído, LASSBio-294 (CI_{50} = 15,3 µM frente ao AA e 18,3 µM frente ao colágeno) (BRITO, 2005).

Pode-se inferir que, na inibição da agregação plaquetária induzida por AA, a introdução do substituinte bromo representa um incremento de atividade tão importante quanto a *N*-metilação em relação ao protótipo, sugerindo que este átomo esteja conferindo à molécula propriedades diferentes que otimizam seu perfil antiagregante plaquetário. Sabe-se que os grupos Br e NO_2 exercem um efeito retirador de elétrons sobre o anel heterocíclico, sendo o grupo NO_2 mais retirador que o grupo Br. No entanto, esses substituintes se diferenciam bastante com relação à lipofilicidade (RODRIGUES, 2008), indicando provavelmente que o efeito antiagregante plaquetário deve estar mais provavelmente relacionado ao caráter lipofílico conferido pelo substituinte Br.

É curioso notar que o derivado *N*-metilado com substituinte bromo, LASSBio-1222, não apresentou atividade superior ao análogo *N*-metilado não substituído, LASSBio-1003 (Tabela 7), o que sugere que as propriedades conferidas por essas modificações estruturais em diferentes regiões da molécula não se somam, ou seja, contribuem por mecanismos independentes e diferentes para o incremento da atividade antiagregante plaquetária induzida por AA.

A estratégia de homologação parece não interferir na atividade antiagregante plaquetária uma vez que os compostos vinílogos LASSBio-1220 e LASSBio-1217 não apresentaram incremento nem perda de atividade em relação a seus análogos não homologados LASSBio-1003 e LASSBio-129. A introdução do substituinte nitro nos compostos homólogos representou perda de atividade, o que pode ser observado nos derivados LASSBio-1276 e LASSBio-1218 quando comparados a seus análogos vinílogos LASSBio-1220 e LASSBio-1217, respectivamente.

Na agregação plaquetária induzida por colágeno, de forma análoga, também se distingue dois grupos de derivados em função da ordem de grandeza da potência observada. LASSBio-1003, LASSBio-1215, LASSBio-1220 e LASSBio-1222 (valores de CI_{50} entre 4 μM e 8 μM) e LASSBio-1223 e LASSBio-1276 (valores de CI_{50} 48 μM e 41 μM, respectivamente). Todos os compostos apresentaram atividade otimizada em relação ao protótipo LASSBio-129 frente a esse agonista. O composto LASSBio-1223 foi menos ativo que seu análogo *N*-metilado, indicando que, frente a esse agonista, a contribuição do grupo metila é mais importante do que a contribuição do átomo bromo na posição 5 do anel furânico.

Os compostos LASSBio-1003 e LASSBio-1215 destacam-se, portanto, como os mais ativos da série.

A fim de melhor caracterizar o perfil de atividade da série, os compostos mais ativos foram estudados em plaquetas humanas induzidas por colágeno (5 μg/ml) e ao ADP (3 μM).

4.4 ESTUDO DA AÇÃO DOS COMPOSTOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS EM PLAQUETAS HUMANAS

4.4.1 Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP humano citratado

Os compostos foram avaliados na agregação plaquetária induzida por colágeno nas concentrações de 100 µM e 300 µM. Nenhum dos compostos foi capaz de inibir significativamente a agregação plaquetária na concentração de 100 µM. Na concentração de 300 µM, os compostos LASSBio-1215, LASSBio-1223 e LASSBio-1003 inibiram significativamente a agregação plaquetária em PRP humano (Tabela 10).

Tabela 10 – Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP humano

Substância	**% Agregação/ min**	**% Inibição**	**%Agregação/ min**	**% Inibição**
	[LASSBio] 100 µM		[LASSBio] 300 µM	
Colágeno 5 µg/ml	111,3 ± 4,7		111,5 ± 8,5	
DMSO[#]	125,8 ± 9,9		107,5 ± 11,5	
LASSBio-129	114,0 ± 18,0	9,3 n.s.	102,5 ± 7,5	4,7 n.s.
LASSBio-1003	91,3 ± 18,2	27,4 n.s.	18,0 ± 4,0	**83,3***
LASSBio-1215	98,3 ± 9,3	21,9 n.s.	28,5 ± 7,5	**73,5***
LASSBio-1220	122, ± 13,5	2,6 n.s.	92,0 ± 9,0	14,4 n.s.
LASSBio-1222	120,5 ± 13,5	4,2 n.s.	68,0 ± 11,0	36,7 n.s.
LASSBio-1223	101,7 ± 5,3	19,2 n.s.	59,5 ± 11,5	**44,7***
LASSBio-1276	113,0 ± 11,9	10,1 n.s.	112,0 ± 3,0	0

Resultados expressos em média ± desvio padrão médio; número de experimentos independentes = 3; n.s. = não significativo; *p<0,05 (ANOVA oneway; Dunnet test). Substâncias foram incubadas com o PRP 5 min antes da adição do agonista. [#] A concentração de veículo nas amostras não excedeu 1%.

4.4.2 Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por ADP (3 µM) em PRP humano citratado

Na agregação plaquetária induzida por ADP em plaquetas humanas, é observada uma segunda onda de agregação em função da concentração empregada. Essa é uma característica da resposta desse agonista em PRP humano e está relacionado à formação de TXA_2 (CAZENAVE *et al.,* 1983). Essa segunda onda de agregação é completamente inibida pelo ácido acetilsalicílico (AAS) e pela indometacina.

A maioria dos derivados testados foi capaz de inibir completamente a segunda onda da agregação plaquetária induzida por ADP em PRP humano. Os derivados LASSBio-129 e LASSBio-1221 bloquearam parcialmente esse fenômeno (Tabela 10, Gráfico 2). Esse resultado indica uma possível ação dessas substâncias sobre as enzimas da cascata do ácido araquidônico responsáveis pela formação de TXA_2, possivelmente COX-1, isoforma predominante na plaqueta, ou tromboxana sintase (TXS). O derivado LASSBio-1276 não inibiu significativamente o fenômeno.

Nenhum dos compostos foi capaz de inibir significativamente a 1ª onda da agregação. Esses resultados sugerem que a ação antiagregante plaquetária dos compostos provavelmente não envolve a inibição dos receptores purinérgicos P2Y1 e/ou P2Y12.

Cabe destacar a atividade dos derivados LASSBio-1215 e LASSBio-1223, que inibiram significativamente a agregação induzida por ADP em torno de 40% e 30%, respectivamente, conferindo-lhes um perfil de atividade antiagregante plaquetária superior, já que conseguem controlar a AP induzida por diferentes agonistas em plaquetas humanas (Tabela 11, Gráfico 2).

Tabela 11 – Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos na agregação plaquetária induzida por ADP (3 µM) em PRP humano

Substância (100 µM)	n	% Agregação	% Inibição total	% Inibição 1ª onda	% Inibição 2ª onda
ADP 3µM	4	64,0 ± 4,4	-	-	-
DMSO[#]	4	69,3 ± 7,8	-	-	-
AAS	3	53,0 ± 5,5	23,5 n.s.	n.s	96,5*
LASSBio-129	4	58,0 ± 6,0	16,2 n.s	n.s	41,7*
LASSBio-1003	4	52,5 ± 6,0	24,5 n.s	n.s	96,1*
LASSBio-1215	4	42,5 ± 3,8	**38,6***	n.s	97,4*
LASSBio-1220	4	55,5 ± 3,8	19,9 n.s	n.s	97,0*
LASSBio-1221	4	63,3 ± 5,4	8,7 n.s	n.s	40,4*
LASSBio-1222	4	55,8 ± 6,6	19,5 n.s	n.s	94,7*
LASSBio-1223	4	48,5 ± 3,0	**30,0***	n.s	88,3*
LASSBio-1276	4	69,0 ± 7,6	0,4 n.s	n.s	22,4 n.s

Resultados expressos em média ± desvio padrão médio; n = número de experimentos independentes; n.s. = não significativo; *p<0,05 (ANOVA oneway; Dunnet test). Substâncias foram incubadas com o PRP 5 min antes da adição do agonista. [#] A concentração de veículo nas amostras não excedeu 1%.

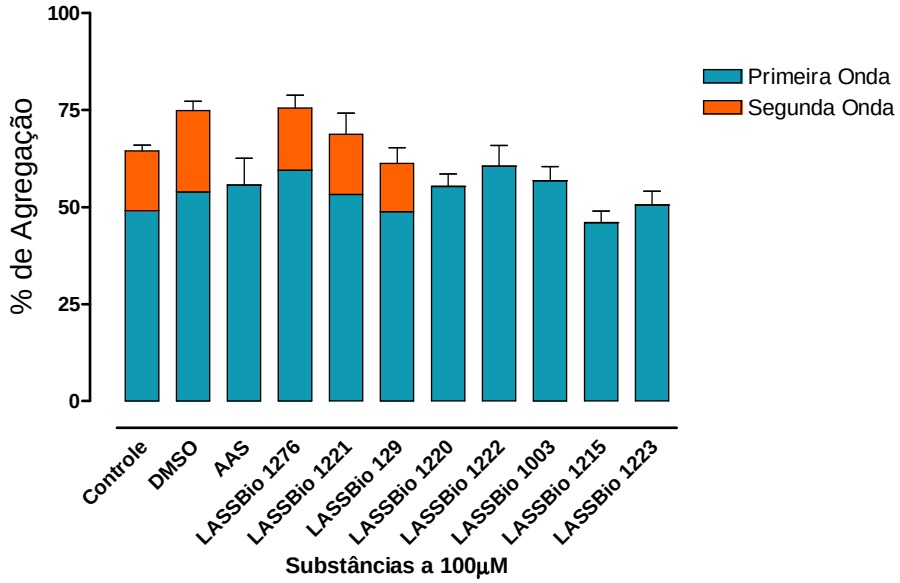


Gráfico 2 Inibição da agregação plaquetária induzida por ADP 3 µM em PRP humano citratado

4.4.3 Avaliação dos derivados *N*-acilidrazônicos em sangue humano total

O efeito inibidor da formação de agregados/coágulos em sangue total sugere um potencial antitrombótico. O efeito dos compostos na agregação plaquetária de sangue humano total foi determinado através do registro da impedância em plaquetas estimuladas por colágeno (20 μg/ml). Os compostos foram testados nas concentrações de 100 μM e 300 μM. LASSBio-1003, LASSBio-1215 e LASSBio-1223 inibiram significativamente a agregação na concentração de 300 μM. O AAS, na concentração de 100 μM, também não foi capaz de inibir a agregação em sangue total (Tabela 12).

Tabela 12 – Efeito dos compostos em sangue total humano estimulado por colágeno (20 μg/ml)

Substância	**Impedância Ω/min**	**% Inibição**	**Impedância Ω/min**	**% Inibição**
	[LASSBio] 100 μM		[LASSBio] 300 μM	
Colágeno 20 μg/ml	9,9 ± 1,0		11,3 ± 1,2	
DMSO[#]	6,7 ± 0,2		8,4 ± 0,9	
AAS	-	28,7 n.s.	-	-
LASSBio-129	-	-	7,5 ± 1,9	11,8 n.s.
LASSBio-1003	5,3 ± 1,7	21,6 n.s.	4,5 ± 0,6	**46,5***
LASSBio-1215	5,4 ± 1,7	19,9 n.s.	4,3 ± 1,4	**49,4***
LASSBio-1220	7,7 ± 1,5	0,0 n.s.	7,5 ± 0,1	11,2 n.s.
LASSBio-1222	6,2 ± 1,8	7,5 n.s.	5,1 ± 0,3	39,4 n.s.
LASSBio-1223	7,7 ± 2,1	0,0 n.s.	4,9 ± 0,3	**42,9***
LASSBio-1276	6,5 ± 1,6	3,5 n.s.	8,8 ± 1,1	0 n.s.

Resultados expressos em média ± desvio padrão médio; número de experimentos independentes = 3; n.s. = não significativo; *p<0,05 (teste t de Student não pareado). Substâncias foram incubadas com a amostra 5 min antes da adição do agonista. [#] A concentração de veículo nas amostras não excedeu 1%.

Os resultados em plaquetas humanas permitiram a identificação de três compostos que foram ativos em todos os sistemas estudados: LASSBio-1003, LASSBio-1215 e LASSBio-1223. Esses resultados apontam e demonstram o potencial desses três derivados como novos protótipos de substâncias antiagregantes plaquetárias.

4.5 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DOS COMPOSTOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS

4.5.1 Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos na formação de TXB_2

A fim verificar a provável ação dos compostos sobre o metabolismo do AA, foram conduzidos os estudos da produção de seu principal metabólito na plaqueta, a TXA_2, através da dosagem de seu metabólito estável, a TXB_2. Foram selecionados para este estudo os compostos LASSBio-1003 e LASSBio-1215, devido à potente ação antiagregante apresentada tanto em plaquetas de coelho quanto em plaquetas humanas, e o composto LASSBio-1276, que mesmo tendo inibido completamente a agregação plaquetária induzida por AA em PRP de coelhos, não foi capaz de inibir a segunda onda da agregação induzida por ADP em PRP humano. Os compostos LASSBio-1003 e LASSBio-1215 inibiram em 100% a AP e inibiram significativamente a produção de TXB_2. O composto LASSBio-1276 inibiu em 100% a agregação induzida por AA em PRP humano na concentração de 300 µM, sem contudo interferir na formação de TXA_2. Esse resultado corrobora o efeito observado em plaqueta humana estimulada por ADP, sugerindo que LASSBio-1276 não exerce seu efeito via inibição da COX-1 ou TXS (Tabela 13).

Tabela 13 – Efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos sobre a produção de TXA_2 em PRP humano estimulado por AA (500 µM).

Compostos	N	TXB_2 (pg/µl plasma)	% Agregação	% Inibição
AA (500 µM)	3	41,92 ± 4,25		-
DMSO[#]	4	39,35 ± 5,41		6,1 n.s.
PRP	3	0,45 ± 0,08		-
Indometacina (10 µM)	3	0,42 ± 0,15		**99,0***
LASSBio-1003 (100 µM)	3	3,30 ± 2,24	0	**92,1***
LASSBio-1215 (100 µM)	4	4,18 ± 1,01	0	**90,0***
LASSBio-1276 (300 µM)	5	35,42 ± 7,81	0	15,5 n.s.

Resultados expressos em média ± desvio padrão médio; n=número de experimentos independentes; n.s. = não significativo; *p<0,05 (Oneway ANOVA, Dunnet test). Substâncias foram incubadas com o PRP 5 min antes da adição do agonista. [#] A concentração de veículo nas amostras não excedeu 1%.

4.5.2 Estudo de Secreção Plaquetária através da medida de luminescência

Foi utilizado PRP de coelho estimulado por colágeno 5 µg/ml para determinar o efeito dos compostos sobre a reação de secreção plaquetária. Nesse modelo, a reação de secreção é avaliada através da medida de luminescência proporcional à liberação de ATP pelos grânulos plaquetários, que reage com o marcador luminescente luciferina-luciferase. Em ensaios preliminares todos os compostos foram capazes de reduzir em mais de 50% a reação de secreção. Resultados anteriores de nosso laboratório mostram que o AAS e a milrinona também apresentam esse efeito (BRITO, 2005).

4.6 ATIVIDADE DESAGREGANTE PLAQUETÁRIA DOS COMPOSTOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS

4.6.1 Reversão da agregação plaquetária e desagregação em PRP de coelho.

Foi observado que o derivado LASSBio-1215 foi capaz de desfazer os agregados plaquetários formados na agregação plaquetária induzida por ADP, AA e U46619 em PRP de coelhos, evidenciando um perfil desagregante plaquetário. Essa propriedade não foi observada em seu análogo não nitrado, LASSBio-1003, nem no derivado homólogo, LASSBio-1220, sugerindo que esse efeito possa ser dependente da presença do substituinte nitro na posição 5 do anel furânico (Figuras 22 e 23) .

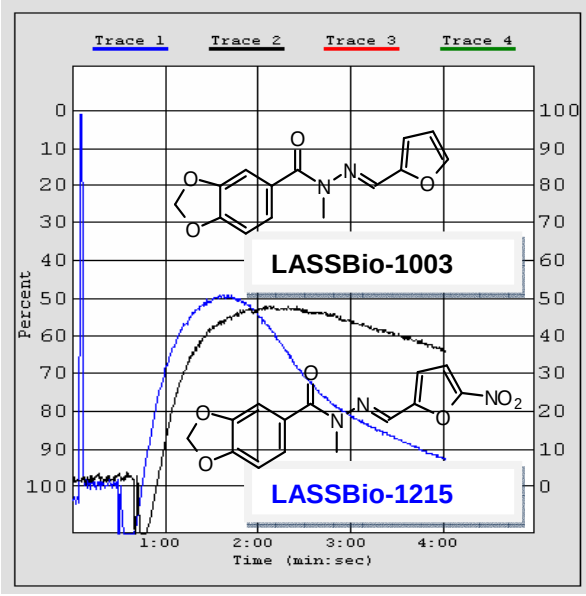


Figura 22 Reversão da AP promovida por LASSBio-1215 (100 µM) comparada à LASSBio-1003 frente ao ADP em PRP de coelhos. Figura representativa de 3 experimentos.

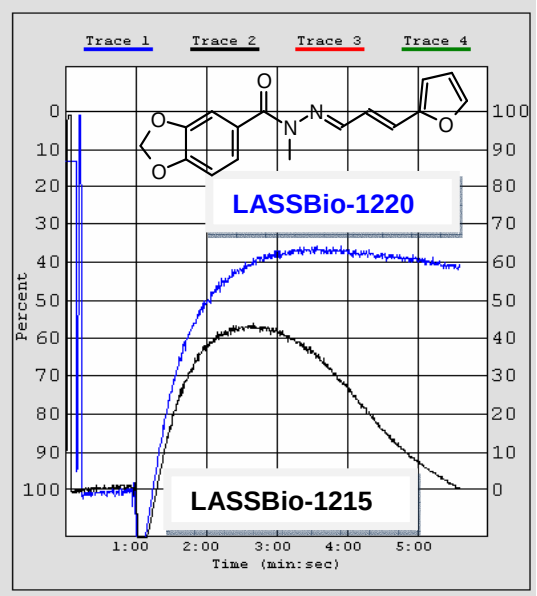


Figura 23 Reversão da AP promovida por LASSBio-1215 (100 µM) comparada à LASSBio-1220 frente ao U46619 em PRP de coelhos.

Figura representativa de 3 experimentos.

A fim de melhor investigar a propriedade desagregante de LASSBio-1215, foi realizado ensaio adicionando o composto (100 µM) após a indução da agregação plaquetária em diferentes tempos: 1 minuto após (Figura 24) e no momento da agregação máxima observada (Figura 25). Em ambos casos foi observada redução da transmitância de luz, caracterizando um fenômeno de desagregação. Aumentando a concentração do composto, observou-se aumento da velocidade de desagregação e reversão total do agregado plaquetário (Figura 25).

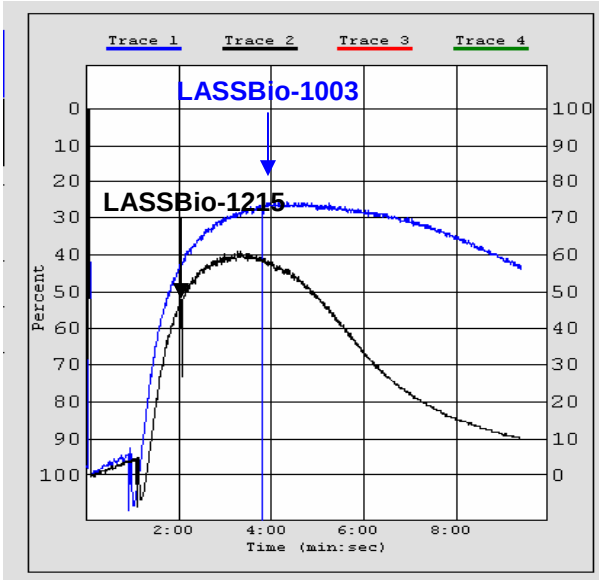


Figura 23 Efeito desagregante plaquetário do composto LASSBio-1215 (100 µM) adicionado 1 min após do agente agregante (U46619 3 µM) em PRP coelhos.

Figura representativa de 3 experimentos.

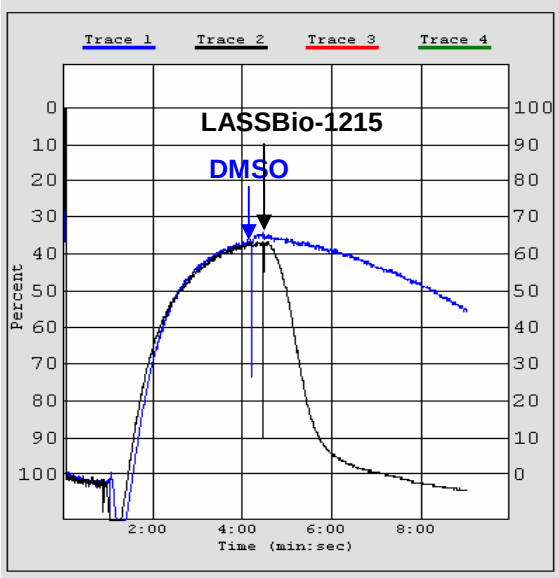


Figura 24 Efeito desagregante plaquetário do composto LASSBio-1215 (300 µM) adicionado no momento de agregação máxima induzida por AA (200 µM) em PRP de coelhos. Figura representativa de 3 experimentos.

Na agregação induzida por colágeno, o composto LASSBio-1215 (300 µM) produziu um pequeno efeito desagregante plaquetário, não sendo capaz, no entanto, de reverter completamente a agregação plaquetária, como foi observado com os outros agonistas (Figura 26).

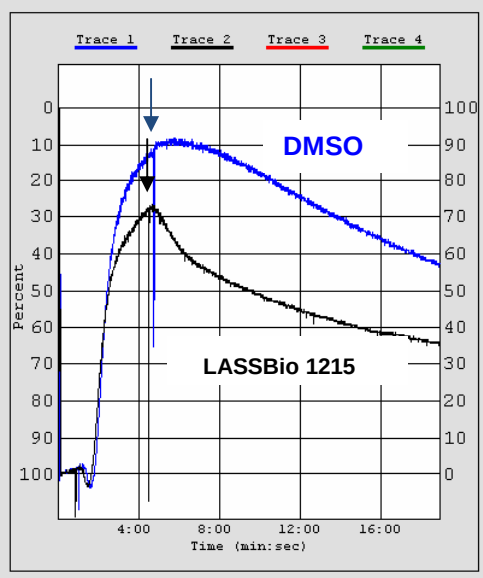


Figura 25 Efeito desagregante do composto LASSBio-1215 (300 µM) e DMSO (1%) na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP de coelhos.

A agregação se torna irreversível pela estabilização da interação plaqueta-fibrinogênio, que envolve a liberação dos constituintes dos grânulos plaquetários (HASKEL & ABDSCHEIN, 1989).

Assim, a reversibilidade da agregação só é possível enquanto não houver secreção completa dos grânulos plaquetários. Uma vez que agonistas fortes como o colágeno e a trombina são capazes de induzir a completa secreção granular, pode-se sugerir porque o composto não foi tão efetivo na desagregação frente ao colágeno. A pequena reversão observada é provavelmente devida aos agregados plaquetários que não foram suficientemente ativados para secretarem o conteúdo de seus grânulos.

4.6.2 Efeito desagregante em PRP humano

Foi avaliada a propriedade desagregante plaquetária dos compostos em PRP humano frente aos principais agonistas da agregação. O composto LASSBio-1215 não foi capaz de promover desagregação dos agregados plaquetários induzidos por colágeno (5 µg/ml), U46619 (3 µM) e AA (500 µM), mesmo na concentração de 300 µM.

Na agregação induzida por ADP (3 µM), o composto teste ou o veículo foram adicionados antes do início da segunda onda de agregação (máximo de agregação da primeira onda), conforme protocolo descrito por Moser (2003), ou após ser atingido o máximo de agregação da segunda onda (HASKEL & ABDSCHEIN, 1989).

O composto LASSBio-1215 reverteu em aproximadamente 80% a agregação plaquetária quando adicionado ao final da primeira onda (Figura 27 A). Quando adicionado ao final da segunda onda, o composto foi capaz de reverter apenas parcialmente a agregação (em torno de 10%) (Figura 27 B). Como, nessa fase, a reação de secreção já ocorreu, os agregados plaquetários formados são estáveis, o que impossibilita sua desagregação.

A fim de observarmos uma possível contribuição da inibição da ciclooxigenase para o efeito desagregante plaquetário, foi realizado o mesmo ensaio na presença de AAS (300 µM) após atingir o máximo de agregação. O AAS também não foi capaz de reverter a segunda onda da agregação plaquetária.

Em baixas concentrações de ADP (1-2 µM), quando se observa agregação reversível, LASSBio-1215 foi capaz de diminuir a agregação máxima, reduzir o tempo para se atingir o nível máximo de agregação e o tempo necessário para ocorrer desagregação completa.

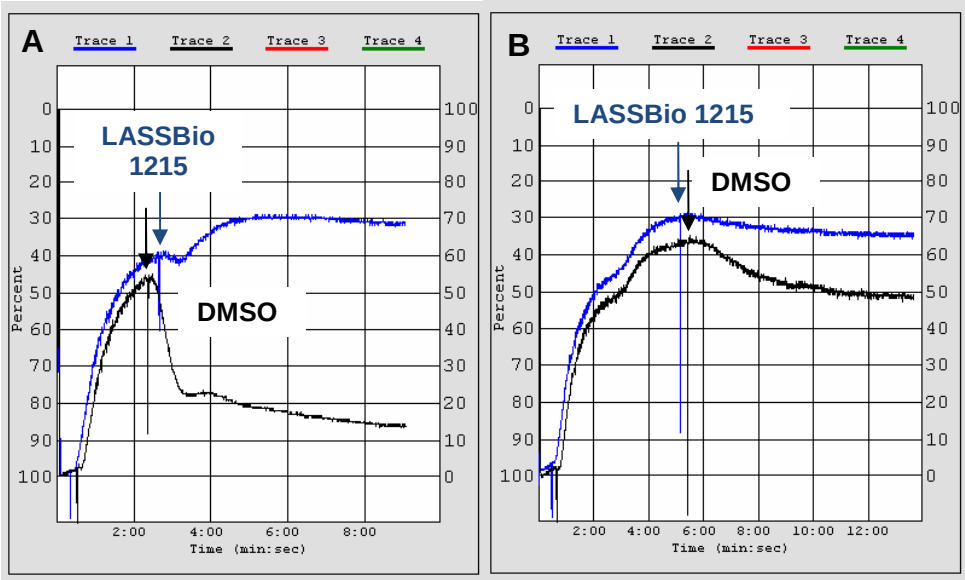


Figura 26 Efeito desagregante plaquetário do composto LASSBio-1215 e DMSO na agregação plaquetária induzida por ADP (3 µM) em PRP Humano. **A**: Adição do composto (300 µM) ou veículo (1%) ao final da primeira onda da agregação. **B**: Adição do composto (300 µM) ou veículo (1%) após o máximo da segunda onda de agregação.

Os compostos LASSBio-1003 e LASSBio-1276 promoveram uma modesta desagregação quando adicionados ao final da primeira onda de agregação (Figura 28), perfil desagregante similar ao observado por Dominguez-Jiménez e cols. (1999) nos antiinflamatórios não esteróides piroxicam e meloxicam na AP induzida por ADP em PRP humano.

No mesmo trabalho, Dominguez-Jiménez e cols. (1999) observaram que alguns fármacos antiinflamatórios não esteróides (AINEs) além de inibirem a agregação plaquetária eram capazes de acelerar a desagregação plaquetária por um mecanismo independente da via ciclooxigenase, envolvendo provavelmente a inibição da ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Este poderia ser um possível mecanismo de ação da atividade desagregante observada para esses compostos.

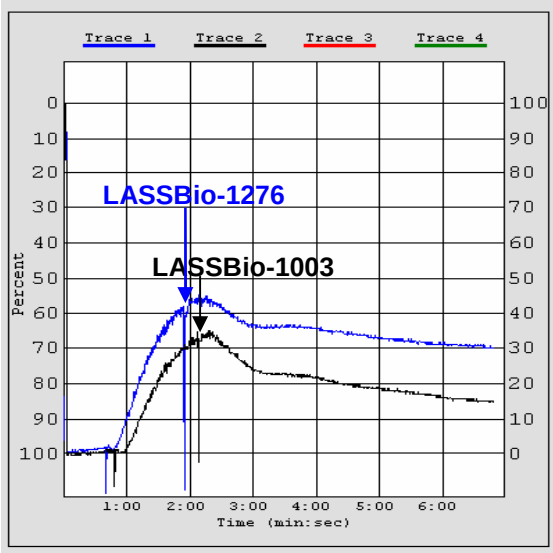


Figura 27 Efeito desagregante plaquetário dos compostos LASSBio-1276 (300 µM) e LASSBio-1003 (300 µM) na agregação plaquetária induzida por ADP (3 µM) em PRP Humano. Adição dos compostos ao final da primeira onda de agregação.

Haskel & Abdschein (1989) demonstraram que o antagonista de integrina $\alpha_{IIb}\beta_{3,}$ RGDY, pode induzir a desagregação plaquetária *in vitro* de forma concentração e tempo dependente. Seus resultados mostram que a extensão e velocidade da desagregação promovida pelo antagonista diminuem conforme aumenta o tempo em que ele é adicionado. Em seus experimentos, quando o antagonista foi adicionado 1 minuto após o agonista (ADP 18 µM), foi observado 90% de desagregação, e quando o antagonista foi adicionado 5 minutos após, a desagregação foi de 40%. Em trabalho mais recente, Moser e cols. (2003) demonstraram a desagregação promovida pelos antagonistas da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ abciximabe, tirofibano e eptifibatide, adicionados quando era observada 50% da agregação máxima esperada.

Os derivados *N*-acilidrazônicos furânicos apresentaram comportamento semelhante ao dos antagonistas de integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, o que pode indicar que o mecanismo de desagregação envolva o desligamento do fibrinogênio com a

integrina, possível somente antes da ocorrência da reação de secreção plaquetária, que pode ocorrer por mecanismos distintos, não apenas pelo antagonismo do receptor. Segundo Haskel & Abdschein (1989) essa fase da agregação pode ser revertida por EDTA, que desloca o fibrinogênio da integrina, mas não pode ser revertida pelos inibidores de ciclooxigenase, corroborando a idéia de que a inibição da cascata do ácido araquidônico não é o único mecanismo de ação envolvido nas propriedades inibitórias de LASSBio-1215 sobre a plaqueta.

Não se pode deixar de considerar uma possível ação de LASSBio-1215 sobre o íon Ca^{2+}, uma vez que Todeschini e cols. (1996) e Ormelli (1999) demonstraram que os derivados furânicos LASSBio-2 e LASSBio-160 (Figura 29) apresentam efeito quelante sobre esse íon. Esse poderia ser um possível mecanismo de ação desagregante para LASSBio-1215, semelhante ao que se observa para o EDTA.

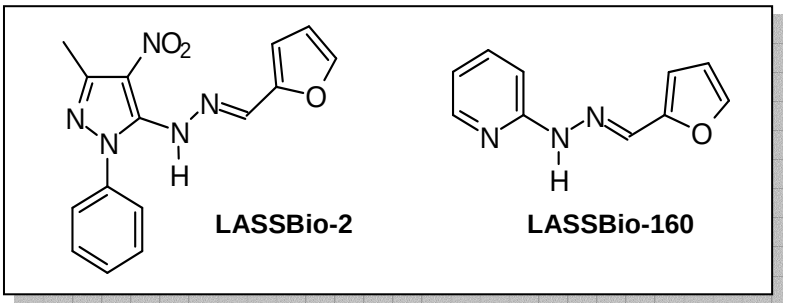


Figura 28 Compostos furilidrazônicos com atividade quelante de Ca^{2+}

Por outro lado, Maayani e cols. (2001a) postulam a hipótese de que agregação e desagregação são dois processos ativos concorrentes, exemplificados pela resposta da plaqueta ao ADP. Esses autores propõem que a ocupação dos receptores de ADP, $P2Y_1$ e $P2Y_{12}$, rege a cinética da resposta plaquetária *in vitro* através de um ajuste no balanço entre agregação e desagregação, sendo a desagregação um processo atenuado pela ocupação dos receptores $P2Y_{12}$. Em outro trabalho, seu grupo mostra que, tanto a ticlopidina quanto o clopidogrel são

capazes de acelerar a reversão da resposta agregante plaquetária frente ao ADP em indivíduos tratados (MAAYANI *et al.*, 2001b).

Agentes que aumentam os níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos como a prostaciclina, a milrinona (inibidor de PDE3) e o nitroprussiato (doador de óxido nítrico) também são capazes de promover a desagregação plaquetária.

Brito (2005) demonstrou em sua tese de doutorado que os derivados tienilacilidrazônicos promovem o aumento dos níveis de GMPc e modulam a produção de nucleotídeos cíclicos intraplaquetários. Tais resultados suscitaram a realização de um estudo qualitativo sobre a participação destes nucleotídeos nas atividades antiagregante e desagregante plaquetárias do derivado LASSBio-1215.

4.6.3 Estudo do efeito de LASSBio-1215 no balanço de nucleotídeos cíclicos

4.6.3.1 Efeito da dideoxiadenosina (DDA) [100 μM] na inibição da agregação plaquetária promovida por LASSBio-1215 (100 μM) na AP induzida por induzida por colágeno 5 μg/ml em PRP citratado de coelho.

Foi utilizado um inibidor de adenilato ciclase, a DDA, para avaliar se o efeito de LASSBio-1215 sobre a plaqueta seria dependente da formação de AMPc pela ativação da enzima adenilato ciclase, como ocorre com os agonistas inibitórios PGD_2, PGI_2 e com a adenosina ao interagir com seu receptor A_{2A}, acoplado à proteína G_s. O efeito inibitório observado pela ação desse último no seu receptor é abolido na presença do inibidor da adenilato ciclase (Figura 30 B) [JANG *et al*., 2002).

A DDA não interferiu no efeito antiagregante plaquetário do composto LASSBio-1215 (100 µM) (Figura 30 A), o que sugere que a sua ação plaquetária não está associada ao aumento de AMPc via estimulação de adenilato ciclase.

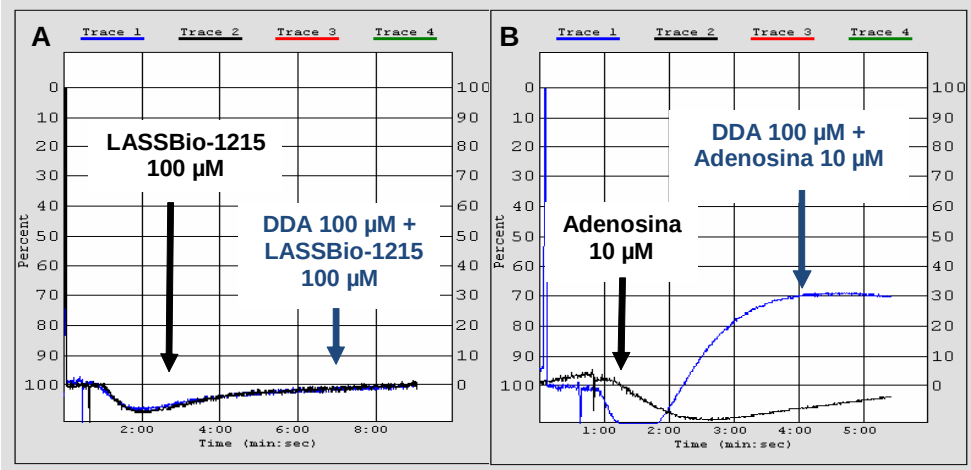


Figura 29 Efeito da inibição da formação de AMPc pelo DDA (100 µM) na inibição da agregação plaquetária promovida por LASSBio-1215. Ação inibitória de LASSBio-1215 (100 µM) na presença de DDA (**A**). Ação inibitória da adenosina (10 µM) na presença de DDA (**B**)

4.6.3.2 Efeito do KT-5720 (5 µM) na inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno 5 µg/ml promovida por LASSBio-1215 (100 µM) em PRP citratado de coelho e humano.

Foi utilizado o composto KT-5720, um inibidor seletivo de proteína cinase A (PKA), para avaliar a relevância dessa via de sinalização sobre os efeitos antiagregante e desagregante plaquetários observados em LASSBio-1215. O composto KT-5720 não foi capaz de reverter a inibição da agregação plaquetária produzida por LASSBio-1215 (100 µM) tanto em plaquetas de coelho quanto em plaquetas humanas.

O papel da PKA, efetora da sinalização celular mediada por AMPc, na agregação plaquetária envolve a inibição tanto da sinalização do Ca^{2+} quanto da ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (CAVALLINI *et al.,* 1996; SMITH & SCOTT, 2006). Caso o efeito inibitório do composto envolvesse o aumento dos níveis intracelulares de AMPc, o efeito inibitório seria revertido na presença do inibidor, o que não foi observado.

O conjunto desses resultados sugere que a ação desagregante plaquetária promovida por LASSBio-1215 não envolve o aumento da concentração intracelular de AMPc.

4.6.3.3 Avaliação do efeito do ODQ (10 μM) na inibição da agregação plaquetária promovida por LASSBio-1215 (100 μM) na AP induzida por colágeno 5 μg/ml em PRP citratado de coelho e humano

O composto ODQ, um inibidor de guanilato ciclase sensível ao NO, foi utilizado a fim de avaliar se o efeito de LASSBio-1215 sobre a plaqueta seria dependente da formação de GMPc.

O SNP é um doador de NO que estimula a guanilato ciclase, levando a um aumento dos níveis intracelulares de GMPc (DUNKERN & HATZELMANN, 2005). Seu efeito inibitório sobre a agregação plaquetária foi revertido na presença de ODQ.

Curiosamente, na presença de ODQ, o efeito inibitório de LASSBio-1215 foi potencializado, em vez de revertido (Figura 31 B). O mesmo resultado foi obtido em PRP humano (Figura 31 A).

É importante ressaltar que, nesses experimentos, observamos também que o efeito desagregante tanto do SNP quanto o de LASSBio-1215 (Figura 31 A e B) foi inibido na presença de ODQ, sugerindo que, em ambos casos, o efeito desagregante parece ser mediado pelo aumento dos níveis de GMPc intracelulares.

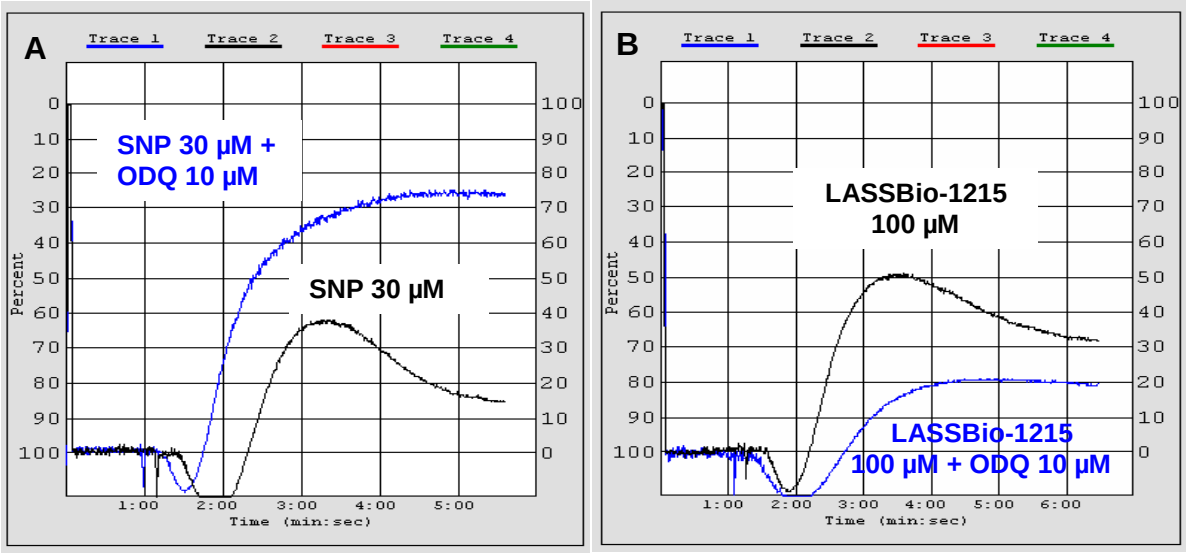


Figura 30 Efeito da inibição da formação de GMPc pelo ODQ (10 µM) na inibição da agregação plaquetária promovida por LASSBio-1215 em PRP de humano. Ação inibitória do SNP (30 µM) na presença de ODQ (**A**). Ação inibitória de LASSBio-1215 (100 µM) na presença de ODQ (**B**).

Para confirmar esta hipótese, realizamos o ensaio de desagregação do composto LASSBio-1215 sozinho e na presença de ODQ. Na presença do inibidor de guanilato ciclase, o efeito desagregante foi abolido (Figura 32).

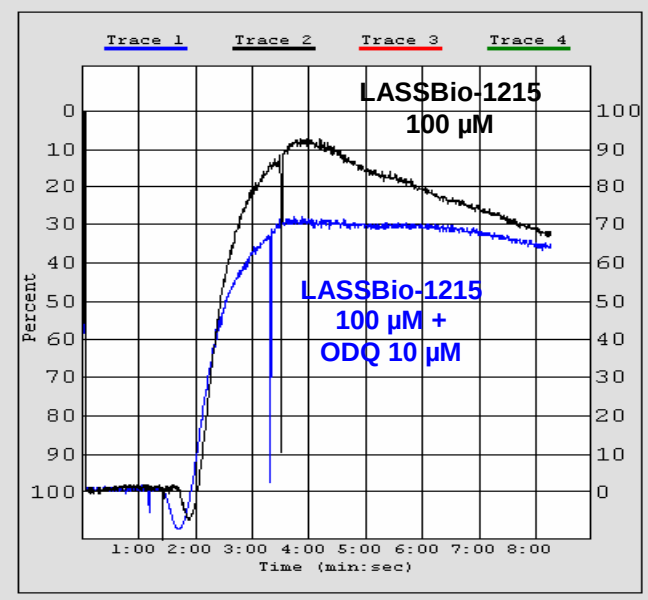


Figura 31 Efeito desagregante de LASSBio-1215 na presença de ODQ

4.6.3.4 Avaliação indireta da atividade inibidora de fosfodiesterases em plaqueta humana lavada

Tendo em vista os resultados obtidos com o ODQ, demonstrando que, em baixas concentrações de GMPc, o composto LASSBio-1215 teve seu efeito inibitório potencializado, e considerando que a enzima PDE3 é ativada por baixas concentrações desse nucleotídeo cíclico, foi iniciado o estudo qualitativo da atividade inibidora de PDE3, conforme protocolo descrito por DICKINSON *et al.*(1997).

Essa atividade foi avaliada indiretamente utilizando plaqueta humana lavada estimulada por trombina (0,5 UI/ml) na presença ou ausência do nitroprussiato de sódio (SNP), doador de NO, e milrinona (inibidor de PDE3), e monitorada através do método turbidimétrico descrito na seção 3.3.1.

Nesse modelo, inibidores de PDE3 que inibem completamente a agregação plaquetária perdem seu efeito inibitório na presença de baixas concentrações de

SNP. Tal efeito é explicado pelo fato de que o aumento de GMPc intraplaquetário promovido por concentrações sub-ótimas de NO, gerado por concentrações de SNP insuficientes para promover inibição completa da agregação plaquetária, levam à inibição da PDE3 e à ativação de PDE2, ocorrendo um balanço e controle fino dos níveis destes nucleotídeos. Sendo assim, inibidores de PDE3 que sozinhos inibem completamente a agregação plaquetária induzida por trombina, como a milrinona, na presença de SNP são incapazes de promover esse efeito (Figura 33). A reversão da inibição produzida por um inibidor de PDE3 neste caso se dá pela ativação da PDE2. Por outro lado, a ativação de PDE2 faz com que inibidores dessa enzima, como o EHNA [eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina], normalmente incapazes de inibir a agregação plaquetária, passem a exibir essa propriedade na presença do doador de NO em baixas concentrações (Figura 34).

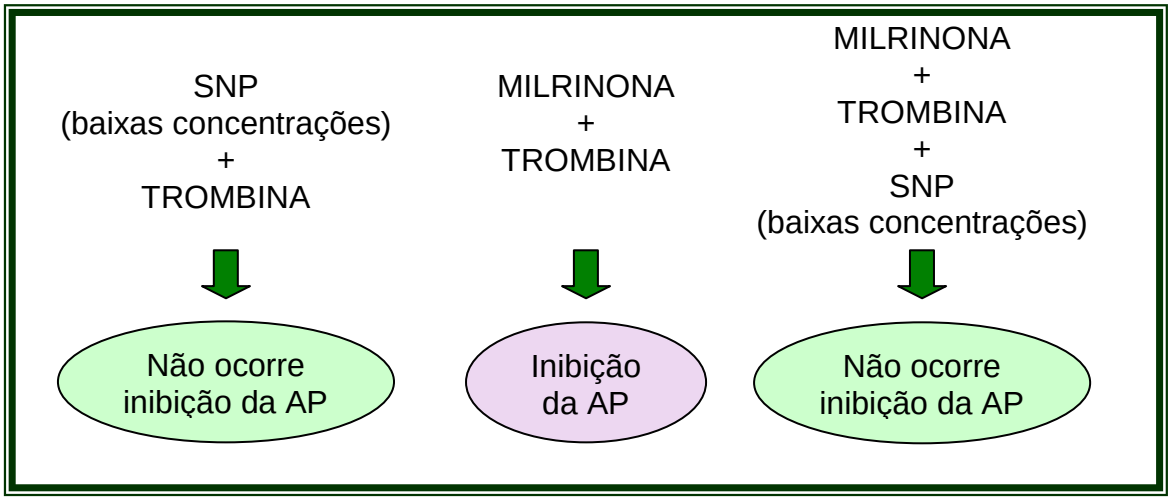


Figura 32 Resposta plaquetária no estudo indireto da atividade inibidora de PDE3

O mesmo protocolo foi realizado para a avaliação do efeito antiplaquetário de LASSBio-1215 na presença e na ausência de SNP. A ação inibitória de LASSBio-1215 não foi alterada pela presença de SNP, indicando que, provavelmente, seu

mecanismo de ação não envolva a inibição de PDE3, sem contudo descartarmos a possibilidade de uma ação em PDE2, que deverá ser investigada.

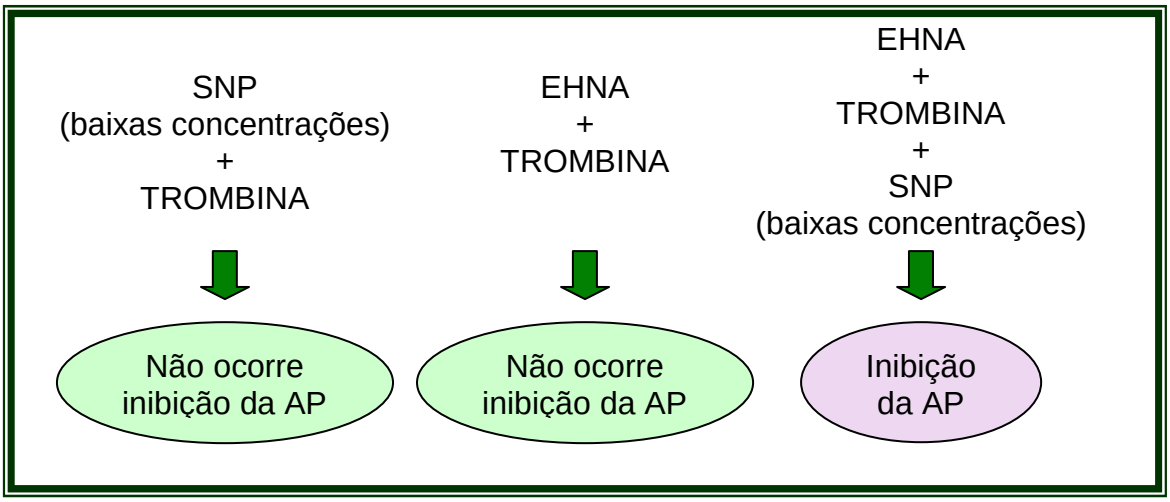


Figura 33 Resposta plaquetária no estudo indireto da atividade inibidora de PDE2

Tais resultados combinados aos obtidos com o estudo do envolvimento de AMPc, somam evidências de que a atividade de LASSBio-1215 está mais possivelmente relacionada com a modificação dos níveis de GMPc intraplaquetários.

Para confirmar essa possibilidade, observamos o comportamento do composto frente ao zaprinast, inibidor de PDE5, enzima específica para esse nucleotídeo cíclico (HASLAM *et al.,* 1999).

4.6.3.5 Efeito de LASSBio-1215 na presença de zaprinast na agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) em PRP humano citratado.

Foi observado o efeito de LASSBio-1215 na presença de zaprinast, um inibidor de PDE5, sobre agregação plaquetária induzida por colágeno 5 µg/ml em PRP humano. Os inibidores de PDE5 sozinhos não afetam a agregação plaquetária *in vitro*, mas potencializam os efeitos inibitórios do óxido nítrico (DUNKERN & HATZELMANN, 2005).

O zaprinast (100 µM) sozinho não foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno 5 µg/ml em PRP humano. No entanto, foi capaz de potencializar o efeito inibitório de LASSBio-1215 sobre a agregação plaquetária (Tabela 14).

Tabela 14 – Efeito de LASSBio-1215 sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno (5 µg/ml) na presença de zaprinast (100 µM) em PRP humano

Composto	***n***	***%agregação***	***% Inibição***
DMSO	4	110	-
Zaprinast (100 µM)	4	112	0
LASSBio-1215 (100 µM)	4	98,3	21,9
Zaprinast (100 µM)+ LASSBio-1215(100 µM)	4	32	70,9*

Tais resultados sugerem que o mecanismo de ação do composto LASSBio-1215 envolve a formação de GMPc. Essa hipótese pode ser confirmada através da dosagem do GMPc formado. Os possíveis mecanismos evolvidos incluem: a ativação da guanilato ciclase, possivelmente através do aumento da disponibilidade de NO intracelular, o que poderá ser investigado indiretamente através da dosagem de nitrito formado e/ou utilizando ferramentas farmacológicas, como o seqüestrador

de NO, PTIO (fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido); e a inibição das PDEs 2 e/ou 5, uma vez que descartamos, pelo ensaio qualitativo, uma possível ação sobre PDE3.

A busca por novos fármacos que possam agregar potência e eficácia aos diversos distúrbios cardiovasculares é de grande interesse e muitos grupos de pesquisa empenham esforços nesse sentido. A demonstração da atividade farmacológica dos derivados *N*-acilidrazônicos furânicos e sua possível ação em mais de um alvo na plaqueta, a inibição do metabolismo de AA e a modulação dos nucleotídeos cíclicos, confirmam esses derivados como potenciais agentes antiplaquetários.

5 CONCLUSÕES

- O presente estudo permitiu identificar os derivados *N*-acilidrazônicos furânicos como potentes inibidores da agregação plaquetária.
- Os derivados LASSBio-1003, LASSBio-1215, LASSBio-1222 e LASSBio-1223 se mostraram como os mais promissores pois foram capazes de inibir a agregação induzida por mais de um agonista de relevância fisiológica, sendo LASSBio-1215 e LASSBio-1003 os mais potentes da série frente aos agonistas AA e colágeno.
- Os compostos LASSBio-1003, LASSBio-1215 e LASSBio-1223 foram ativos em plaquetas humanas, indicando um potencial antitrombótico.
- O efeito antiplaquetário de LASSBio-1003 e LASSBio-1215 envolve, em parte, o bloqueio da produção de metabólitos da cascata do AA , isto é, TXA_2
- LASSBio-1215, além de inibir a agregação plaquetária, apresentou efeito desagregante. Esses efeitos parecem ser dependentes dos níveis de GMPc intracelulares sem aparentemente dependerem dos níveis de AMPc.
- Os estudos de SAR mostraram que A *N*-metilação dos compostos *N*-acilidrazônicos se mostrou favorável para a atividade antiagregante plaquetária; que o substituinte bromo representa um incremento de atividade tão importante quanto a *N*-metilação e que a propriedade desagregante plaquetária de LASSBio-1215 se deve à introdução do substituinte nitro.
- O conjunto de resultados mostra que as modificações estruturais introduzidas no composto protótipo LASSBio-129 levou à obtenção de novos compostos com perfil antiplaquetário otimizado.

6 PERSPECTIVAS

- Investigar ação sobre PDE2 através de ensaio qualitativo indireto.
- Realizar ensaio de dosagem de GMPc intraplaquetário na plaqueta inibida por LASSBio 1215, na presença ou não do doador de NO.
- Investigar o envolvimento do NO na elevação dos níveis de GMPc intraplaquetários.
- Realizar ensaio na presença de um inibidor de PKG, a fim de avaliar a importância dessa via de sinalização celular para os efeitos antiagregantes e desagregantes plaquetários de LASSBio 1215.
- Avaliação do potencial antitrombótico *in vivo* – modelos de tempo de sangramento e trombose.
- Realizar ensaio de toxicidade celular.

7 REFERÊNCIAS

ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Platelet physiology and thrombosis. **Thrombosis Research**, v. 114, p. 447-453, 2004.

AUSTRALIAN CENTER FOR BLOOD DISEASES. Thrombosis Research Unit, 2008. Disponível em: http://www.acbd.monash.org/research/thrombosis-research**.** Acesso em 03/09/2008.

AUTHI, K. S. Ca^{2+} Homeostasis and Intracellular pools in Human Platelets. In: **Mechanisms of Platelet Activation and Control**, Kalwnant S. Authi, Steve P. Watson and Vijay V. Kakkar, New York, Plenum Press, p. 83, 1993.

BHATT, D. L.; TOPOL, E. J. Scientific and Therapeutic advances in antiplatelet therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 15-28, 2003.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 out. 2008. Seção 1, p.1-2.

BORN, G. V. R., CROSS, M. J. The aggregation of blood platelets. **J. Physiol.,** v. 168, p. 178, 1963.

BRITO, F. C. F. de. Estudo da atividade antiagregante plaquetária e mecanismo de ação de compostos tienilacilidrazônicos análogos ao LASSBio-294. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

CARDINAL, D.C. & FLOWER, R. J. The Electronic Aggregometer: a Novel device for assessing platelet behaviour in blood. **J. Pharmacol. Methods.**, v.3, p. 135-138, 1980.

CATTANEO, M. ; GACHET, C. The platelet ADP receptors. **Haematologica**, v. 86, p. 346-348, 2001.

CAVALLINI, L.; COASSIN, M.; BOREAN, A.; ALEXANDRE, A. Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5- trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 5545-5551, 1996.

CAZENAVE, J. P., HEMMENDINGER, S., BERETZ, A., SUTTER-BAY, A., LAUNAY, J. Platelet Aggregation: a Tool for Clinical Investigation and Pharmacological Study. Methodology. **Ann. Biol. Clin.**, v.41, p.167-179, 1984.

DICKINSON, N. T.; JANG, E. K.; HASLAM, R. J. Activation of cGMP-stimulated phosphodiesterase by Nitoprusside limits cAMP accumulation in human platelets: effects on platelet aggregation. **Biochem. J.**, v. 323, p. 371-377, 1997.

DOMÍNGUEZ-JIMÉNEZ, C.; DÍAZ-GONZÁLEZ, F.; GONZÁLEZ-ÁLVARO, I.; CESAR, J. M.; SÁNCHEZ-MADRID, F. Prevention of $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation by non-steroidal antiinflammatory drugs. **FEBS Letters**, v. 446, p. 318-322, 1999.

DOPHEIDE, S. M.; YAO, C. L. and JACKSON, S. P. Dynamic aspects of platelet adhesion under flow. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, p. 355-363, 2001.

DUNKERN, T. R. & HATZELMANN, A. The effect of Sildenafil on human platelet secretory function is controlled by a complex interplay between phosphodiesterases 2, 3 and 5. **Cell signaling**, v. 17, p. 331-339, 2005.

FEIJGE, M. A.; ANSINKA, K.; VABSCHOONBEEK, K.; HEEMSKERK, J. W. M. Control of platelet activation by cyclic AMP turnover and cyclic nucleotide phosphodiesterase type-3. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 1559–1567, 2004.

FEINMAN, R. D.; LUBOWSKY, J.; CHARO, I.; ZABINSKI, M. P. The Lumi-Aggregometer: a new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation by platelets. **J. Lab. Clin. Med.** , v. 90, p. 125-129, 1977.

FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Medicinal chemistry of *N*-acylhydrazones: New lead-compounds of analgesic, anti-inflammatory and antithrombotic drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 167-198, 2006.

GACHET, C. ADP Receptors of platelets and their inhibition. **Thromb. haemost.**, v. 86, p. 222-232, 2001.

GAWAZ, M. Platelets in the onset of atherosclerosis. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 36, p. 206-210, 2006.

GRESELE P.; FALCINELLI, E.; MOMI, S. Potentiation and priming of platelet activation: a potential target for antiplatelet therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 7, p.352-360, 2008.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. Blood coagulationa and anticoagulant, thrombolytic and antiplatelet drugs. In: **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**, 11ª ed., p. 1481-1484, 2006.

HASKEL, E. J. & ABENDSCHEIN, D. R. Deaggregation of human platelets in vitro by an RGD analog antagonist of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors. **Thrombosis Research**, n. 56, p. 687-695, 1989.

HAMILTON, J. R. Protease-activated receptors as targets for antiplatelet therapy. **Blood Reviews**, doi:10.1016/j.blre.2006.06.002, 2008.

HAMPTON, K. K. & PRESTON, F. E. Bleeding disorders, thrombosis and anticoagulation. **British Med. J.** , n. 314, p. 1026.

HASLAM, R. J.; DICKINSON, N. T.; JANG, E. K. Cyclic nucleotides and phosphodiesterases in platelets. **Thromb. Haemost.**, v. 82, p.412-423, 1999.

HERD, C.; PAGE, C. P. Do platelets have a role as inflammatory cells? In: **Immunopharmacology of Platelets**, Michel Joseph, Academic Press, capítulo 1 p. 1-20, 1995.

HOURANI, S.M. O. & CUSACK, N. J. Pharmacological Receptors on Blood Platelets. **Phramacological Reviews**, v. 43, n. 3, p. 243-285, 1991.

ISENBERG, W. M.; McEVER, R. P; PHILLIPS, D. R.; SHUMAN, M. A.; BAINTON, D. F. The platelet fibrinogen receptor: An immunogold-surface replica study of agonist-induced ligand binding and receptor clustering. **J. Cell Biol.** , v. 104, p. 1655-1663, 1987.

ITALIANO, J. E. & SHIVDASANI, R.A. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.1, p. 1174–1182, 2003.

JANG, E. K.; AZZAM, J. E.; DICKINSON, N. T.; DAVIDSON, L. M. M. AND HASLAM, R. J. Roles for both cyclic GMP and cyclic AMP in the inhibition of collagen-induced platelet aggregation by nitroprusside. **British Journal of Haematology**, v. 117, p. 664–675, 2002.

JIN, J.; QUINTON, T. M.; ZHANG, J.; TIYYENHOUSE, S.E. AND KUNAPULI, S. P. Adenosine diphosphate (ADP)-induced thromboxane A_2 generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and ADP receptors. **Blood**, v. 99, p. 193-198, 2002.

KAHN, M.L.; ZHENG, Y.W.; HUANG, W. A dual thrombin receptor system for platelet activation. **Nature**, v. 394, p. 690-694, 1998.

KARNIGUIAN, A.; GRELAC, F.; LEVY-TOLEDANO, S.; LEGRAND, Y. J.; RENDU, F. Collagen-induced platelet activation mainly involves the protein kinase C pathway. **Biochemical Journal**, v. 268, n.2, p. 325-331, 1990.

KROLL, M. H.; SCHAFER, A.I. Analysis if kugabd-receptor interactions. In: **Immunopharmacology of Platelets**, Michel Joseph, Academic Press, capítulo 1 p. 31-33, 1995.

KÜMMERLE, A. E. Síntese de compostos cardioativos 1,3-benzodixolil-*N*-acilidrazônicos planejados por otimização estrutural do protótipo LASSBio-294. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

LI, Z.; XI, X.; GU, M. A stimulatory rolo for cGMP dependent protein kinase in platelet activation. **Cell**, v. 12, p. 77-86, 2003.

MAAYANI, S.; TAGLIENTE, T. M.; SCHWARZ, T.; MARTINELLI, G.; MARTINEZ, R.; SHORE-LESSERSON, L. The balance of concurrente aggregation and deaggregation processes in platelets is linked to differential occupancy of ADP receptor subtypes. **Platelets**, v. 12, p. 83-93, 2001a.

MAAYANI, S.; TAGLIENTE, T. M.; SCHWARZ, T.; CRADDOCK-ROYAL, B.; ALCALA, C.; MARRERO, G.; MARTINEZ, R. Deaggregation is an integral component of the response of platelets to ADP *in vitro*: kinetic studies of literature and original data. **Platelets,** v. 12, p. 279-291, 2001b.

MACKMAN, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. **Nature**, vol. 451, p. 914-918, 2008.

MICHELSON, A.D. P2Y12 Antagonism. Promises and Challenges. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 28, s33-s38, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Painel de Indicadores do SUS, 2006. Disponível em http://www.saude.gov.br/indicadores/estatísticas. Acesso em 30/08/08.

MIRANDA, A. L. P.; LIMA, P. C.; TRIBUTINO, J. L. M.; MELO, P. A.; FERNANDES, P. D.; CINTRA, W. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Anti-inflammatory, analgesic and anti-platelet properties of LASSBio-294, a new thienylacylhydrazone derivative. **Abstracts du 6ème Congrès Annuel de la Société Française de Pharmacologie**, P296; Rennes, França, 2002.

MONASH UNIVERSITY. Platelet and Leucocyte Biology Laboratory, 2008. Disponível em: http://www.med.monash.edu.au/medicine/boxhill/research/blood-platelet. Acesso em: 02/09/2008.

MOSER, M.; BERTRAM, U.; PETER, K.; BODE, C.; and RUEF, J. Abciximab, eptifibatide, and tirofiban exhibit dose-dependent potencies to dissolve platelet aggregates. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 41, p. 586-592, 2003.

NAKAHATA, N. Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 118, p. 18-35, 2008.

NIESWANDT, B. & WATSON, S. P. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? **Blood**, v. 102, p. 449-461, 2003.

O'BRIEN, J. J.; RAY, D. M.; SPINELLI, S. L.; BLUMBERG, N.; TAUBMAN, M. B.; FRANCIS. C. W.; WITTLIN, S. D.; PHIPPS, R. P. The platelet as a therapeutic target for treating vascular diseases and the role of eicosanoid and synthetic PPARγ ligands. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v. 82, p. 68-76, 2007.

ORMELLI, C. B. Estudo do mecanismo de ação da atividade antiagregante plaquetária de derivados heterocíclicos arilidrazônicos, acilidrazônicos e sulfonilarilidrazônicos. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

PLATELET RESEARCH. Electron microscopy of platelet, 2005. Disponível em: http://www.platelet-research.org. Acesso em 03/09/2008.

RENDU, F.; BROHARD-BOHN, B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. **Platelets**, v. 12, p. 261–273, 2001.

RODRIGUES, A. P. C. Otimização Estrutural do Protótipo 2-furanil-1,3-benzodioxolil-*N*-Acilidrazônico LASSBio-129. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

RUGGERI, Z. M. Plateles in atherothrombosis. **Nature Medicine**, v. 8, p. 1227-1234, 2002.

SANTOS-MARTÍNEZ , M. J.; MEDINA, C.; JURASZ, P.; RADOMSKI, M. W. Role of metalloproteinases in platelet function. **Thrombosis Research**, v. 121, p. 535-542, 2008.

SAVAGE, B.; CATTANEO, M.; RUGGERI, Z. M. Mechanism of platelet aggregation. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 8, p.270-276, 2001.

SCHWARTZ, U. R.; WALTER, U.; EIGENTHALER, M. Taming platelet with cyclic nucleotides. **Biochem. Pharmacol.** , v. 62, p. 1153-1161, 2001.

SCRUTTON, M. C. The Platelet as a Ca^{2+}-driven cell: mechanisms which may modulate Ca^{2+}-driven responses. In: **Mechanisms of Platelet Activation and Control**, Kalwnant S. Authi, Steve P. Watson and Vijay V. Kakkar, New York, Plenum Press, p. 2, 1993.

SIESS, W.; GRÜNBERG, B.; LUBER, K. Functional Relationship between cyclic AMP-depndent protein phosphorylation and platelet inhibition. In: **Mechanisms of Platelet Activation and Control**, Kalwnant S. Authi, Steve P. Watson and Vijay V. Kakkar, New York, Plenum Press, p. 229, 231, 1993.

SILVA, G. A.; ZAPATA-SUDO, G.; KÜMMERLE, A. E.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J.; SUDO, R. T. Synthesis and vasodilatory activity of new *N*-acylhydrazones derivatives designed as LASSBio-294 analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 3431-3437, 2005.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacological Reviews,** v. 56, p. 387-437, 2004.

SIMS, P. J.; GINSBERG, M. H.; PLOW, E. F.; SHATIL, S. J. Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 7345-7352, 1991.

SMITH, F. D. & SCOTT, J. D. Anchored cAMP signaling: Onward and upward – A short history of compartmentalized cAMP signal transduction. **European Journal of Cell Biology**, v. 85, p. 585-592, 2006.

STROKECENTER. Platelet thrombus formation. Disponível em: http://www.strokecenter.org. Acesso em 02/09/2008.

SURIN, W. R.; BARTHWAL, M. K.; DIKSHIT, M. Platelet collagen receptors, signalling and antagonism: Emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. **Thrombosis Research**, doi: 10.1016/j.thromres.2007.10.005 (2007)

TODESCHINI, A. R.; MIRANDA, A. L. P.; BACHA, C. M.; BARREIRO, E. J. 2-Pyrudylarylhydrazone derivatives, a new class of platelet aggregation inhibitors. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 389, 1996.

WAGNER, D. D.; BURGER, P. C. Platelets in Inflammation and Thrombosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.,** v. 23, p. 2131-2137, 2003.

WALTER, U. EIGENTHALER,M. GEIGER, J. and REINHARD, M. Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets. In: **Mechanisms of Platelet Activation and Control**, Kalwnant S. Authi, Steve P. Watson and Vijay V. Kakkar, New York, Plenum Press, p. 237-240, 1993.

WARD, A.; CHAFFMAN, M. O.; SORKIN, E. M. Dantrolene - a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in malignant hyperthermia, the neuroleptic malignant syndrome and an update of its use in muscle spasticity. **Drugs**, v. 32, p. 130-168, 1986.

WEBER, C. Platelets and Chemokines in Atherosclerosis. Partners in Crime. **Circ. Res.**, v. 96, p. 612-616, 2005.

ZAPATA-SUDO, G.; SUDO, R. T.; MARONAS, P. A.; SILVA, G.; MOREIRA, º R.; AGUIAR, M. I. S.; BARREIRA, E. J. Thienylhydrazone derivative increases sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in mammalian skeletal muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 470, p. 79-85, 2003.

ZARBOCK, A.; POLANOWSKA-GRABOWSKA, R. K.; LEY, K. Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation. **Blood Reviews,** v. 21, n. 2, p. 99-111, 2007.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo