PLINIO MINGHIN FREITAS FERREIRA

Moduladores alostéricos da enzima guanilato ciclase na terapia anti-plaquetária: estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2016

Plinio Minghin Freitas Ferreira

Moduladores alostéricos da enzima guanilato ciclase na terapia anti-plaquetária: estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Gilberto De Nucci

Versão original

São Paulo

2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ferreira, Plinio Minghin Freitas.

Moduladores alostéricos da enzima guanilato ciclase na terapia anti-plaquetária: estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* / Plinio Minghin Freitas Ferreira. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Novos tratamentos anti-plaquetários.

Versão do título para o inglês: Soluble guanylate cyclase allosteric modulators as anti-platelet therapy: *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* studies

1. Plaquetas sanguíneas 2. Trombose 3. Fármacos (sistema cardiovascular) 4. Farmacologia experimental I. Nucci, Prof. Dr. Gilberto de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0123/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Plinio Minghin Freitas Ferreira.

Título da Tese: Moduladores alostéricos da enzima guanilato ciclase na terapia anti-plaquetária: estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

Orientador(a): Prof. Dr. Gilberto de Nucci.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

FINAL R&D APPROVAL

Professor T D Warner
Centre for Cardiac, Vascular and Inflammation
Barts and The London,
Queen Mary's School of Medicine and Dentistry
John Vane Science Centre
Charterhouse Square
London
EC1M 6BQ

Joint Research and Development Office

24-26 Walden Street
Whitechapel
London
E1 2AN

Tel: 0207 882 7272

Fax: 0207 882 7277

Email: david.jackson@bartsandthelondon.nhs.uk

31 May 2007

Dear Professor Warner,

Re: A study to develop and validate a multiwell system to measure platelet aggregation (ENDO-2)

ReDA Reference: 004992

Thank you for sending confirmation of your approval from the ethics committee. I am now happy to inform you that the Joint R&D Office of Barts and The London NHS Trust and Queen Mary, University of London has arranged full indemnity cover for your study against any negligence that might occur during the course of your project.

Please note that all research with an NHS element is subject to the Research Governance Framework for Health and Social Care 2005. If you are unfamiliar with the standards contained in this document, or the BLT and QMUL policies that reinforce them, you can obtain details from the Joint R&D Office, tel 0207 882 7250 or go to <http://www.dh.gov.uk/PolicyAndGuidance/ResearchAndDevelopment/ResearchAndDevelopmentAZ/ResearchGovernance/fs/en>.

You must stay in touch with the Joint R&D Office during the course of the research project, particularly if/when:

- There is a change of Principal Investigator;
- The project finishes;
- Amendments are made, whether minor or substantial;
- Serious Adverse Events have occurred (must be reported within 24 hours of becoming aware of the event).

This is necessary to ensure that your indemnity cover is valid. Should any untoward events occur it is **essential** that you contact the Joint R&D Office immediately. If patients or staff are involved in an incident, you should also contact the Clinical Risk Manager on 0207 480 4132.

I hope the project goes well, and if you need any help or assistance during its course, please do not hesitate to contact the Office.

Yours sincerely,

Gerry Leonard

The Royal Hospital of St. Bartholomew. The Royal London Hospital.
The London Chest Hospital. The Queen Elizabeth Children's Service.

Head of Research Resources: Gerry Leonard

OFFICIAL - SENSITIVE

Home Office

No. PPL 70/8422

ANIMALS (SCIENTIFIC PROCEDURES) ACT 1986

PROJECT LICENCE

to carry out a programme of scientific procedures
on living animals

In pursuance of the powers vested in him by the above Act, the
Secretary of State hereby licences

Dr M J Paul-Clark
Department of Cardiothoracic
Pharmacology, National Heart & Lung Inst
Imperial College, Dovehouse Street
London
SW3 6LY

to carry out the programme of work specified in the Schedule subject to the restrictions and provisions contained in the Act and subject also to the limitations and conditions contained in this licence and to such other conditions as the Secretary of State may from time to time prescribe.

Under this project licence number PPL 70/8422 the Secretary of State grants authority only for the work specified on the Schedule. The procedures and animal types which may be used and the place or places at which the work may be carried out are specified in the Schedule. Authority is granted only for the severity limits attached to individual procedures specified in Part E of the schedule.

The Secretary of State has determined that a retrospective assessment of this licence is not required in accordance with Section 5B of the Act.

This licence, unless earlier revoked, shall be in force until 24 March 2020.

Home Office
2 Marsham Street
London SW1P 4DF

For the Secretary
of State

24 March 2015

NB. This licence does not authorise the project licence holder or any other person to carry out procedures on any animals unless he/she holds a personal licence issued under the Act which authorises him/her to carry out those procedures on the animals of those types.

INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: GDN 079/13 - Estudo duplo-cego de avaliação da integridade do trato gastrointestinal após administração diária de losartana 50 mg + ácido acetilsalicílico 81 mg versus losartana 50 mg diária + ácido acetilsalicílico 81 mg a cada 3 dias

Pesquisador: GILBERTO DE NUCCI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 26850514.1.0000.5467

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

Patrocinador Principal: BIOLAB SANUS FARMACEUTICA LTDA.

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final

Detalhe:

Justificativa: Estudo finalizado. Envio de relatório final.

Data do Envio: 04/02/2015

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 950.193

Data da Relatoria: 24/02/2015

Apresentação da Notificação:

Título da Pesquisa: GDN 079/13 - Estudo duplo-cego de avaliação da integridade do trato gastrointestinal após administração diária de losartana 50 mg + ácido acetilsalicílico 81 mg versus losartana 50 mg diária + ácido acetilsalicílico 81 mg a cada 3 dias

Pesquisador: GILBERTO DE NUCCI

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

Objetivo da Notificação:

Apresentação de relatório final.

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

Fax: (11)3091-8405

E-mail: cep@icb.usp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 950.193

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não eram previstos benefícios diretos; não ocorreram riscos acima dos previstos.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

O estudo conclui que a associação de losartana (administração diária) com ácido acetilsalicílico a cada 3 dias tem o mesmo efeito antiagregante plaquetário que o efeito observado quando o AAS foi administrado diariamente; contudo, a administração do AAS a cada 3 dias parece ser mais seguro para a mucosa gástrica por não alterar os níveis de PGE2.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 10 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
Regina Scivoletto
(Coordenador)

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

Fax: (11)3091-8405

E-mail: cep@icb.usp.br

AGRADECIMENTOS

Este período do meu doutorado foi, sem dúvidas, o melhor trabalho que eu tive na vida. Ter a oportunidade de estar em constante aprendizado, desenvolver o senso crítico, trabalhar em outro país, conhecer novas pessoas e culturas foram algumas das incríveis experiências que este trabalho me proporcionou. E, por isso, eu devo agradecer sempre o meu orientador Professor Gilberto De Nucci em que confiou em mim quando eu estava ainda na graduação me oferecendo a bolsa e, principalmente, dividindo seu tempo comigo para discussões e ensinamentos que foram determinantes na formação do meu caráter e forma de pensar. Tê-lo como mentor é um privilégio e, independente do caminho que eu seguir, serei eternamente grato por dividir um pouco da sua sabedoria comigo ao longo desses anos.

Devo também mencionar todos que me ajudaram durante a minha pesquisa no Brasil, principalmente o Dr. Thiago Gagliano, que me ofereceu sua casa várias vezes nos dias que eu tive que dormir em Campinas e com quem dividi as alegrias e angústias ao longo de todo o doutorado. Ao Dr. José Luiz Donato que me treinou nos primeiros meses, uma pessoa extremamente inteligente e paciente. Agradeço também à Profa. Fabíola Taufic e seu grupo de pesquisa que sempre me receberam muito bem durante o tempo em Campinas. Aos professores e mestres Dr. Frederico Magalhães e Dra. Miriam Trevisan, com os quais aprendi um pouco sobre gastroenterologia. À Marinalva Sampaio e toda equipe da clínica que me deram todo suporte durante os estudos realizados, deixando essas tarefas sempre muito mais fáceis de serem cumpridas. Muito obrigado!

Agradeço também ao Professor Timothy Warner, meu orientador em Londres, que confiou em mim desde o início e me apoiou irrestritamente durante o período na Inglaterra. Sua clareza na forma de pensar e a forma de conduzir um grupo de pesquisa são ensinamentos que levarei para sempre. Espero que voltemos a pedalar juntos! À doce Ivana Vojnovic, minha amiga e confidente durante o tempo em Londres, a qual sou eternamente grato por ter lhe conhecido. Muito obrigado por confiar em mim e pelas conversas que dividimos e ainda vamos dividir. A Profa. Jane Mitchell e todos os colegas do grupo do Prof. Timothy Waner com os quais eu tive o prazer de conviver por

16 meses, especialmente: Dra. Melissa Chan, Dr. Paul Armstrong, Dra. Francesca Rauzi, Dr. Thomas Hoefer, Dr. Nicholas Kirkby, Melissa Hayman, Harriet Allan e principalmente a minha amiga e parceira Dra. Rebecca Knowles, com a qual tive momentos especiais no trabalho e de diversão.

Devo mencionar também meus amigos do Brasil e de Londres que sempre acreditaram em mim e estiveram do meu lado ao longo desses 3 anos e meio.

Dedico este trabalho aos meus pais, Nancy e Gerson, que apoiaram de forma irrestrita todas as minhas decisões. A presença de vocês foi determinante para que eu conseguisse concluir essa etapa e estar motivado para as próximas. Tenho muita sorte de tê-los por perto. Amo vocês.

RESUMO

FERREIRA, P. M. **Moduladores alostéricos da enzima guanilato ciclase na terapia anti-plaquetária: estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo***. 2016. 121 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Desordens no sistema cardiovascular correspondem a principal causa de morte nos Estados Unidos. Um em cada 3 norte-americanos tem um ou mais tipos de doenças cardiovasculares totalizando aproximadamente 85.6 milhões de pessoas afetadas, culminando em 30.8% de todas as mortes naquele país. As plaquetas, se ativadas inapropriadamente, tem papel determinante em várias doenças cardiovasculares e podem causar complicações fatais como infarto do miocárdio e acidentes cerebrovasculares.

A terapia dupla antiplaquetária, composta de ácido acetilsalicílico (AAS) e um inibidor do receptor purinérgico $P2Y_{12}$ (clopidogrel, prasugrel, ticagrelor), é recomendada para prevenção secundária de eventos aterotrombóticos em pacientes com síndromes agudas coronarianas ou pacientes recentemente submetidos a uma intervenção coronária percutânea. Embora estes pacientes tenham uma melhora no prognóstico, eles ainda sofrem eventos trombóticos. Frequentemente, relaciona-se o nível de inibição plaquetária destes pacientes à ineficácia do tratamento.

A reatividade plaquetária de pacientes em terapia com inibidor do receptor purinérgico $P2Y_{12}$ somente ou em combinação com AAS é uma função do nível do bloqueio do receptor $P2Y_{12}$ e dos níveis de óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI_2), importantes mediadores derivados do endotélio, os quais agem em sinergia tripla aumentando o nível dos nucleotídeos cíclicos intraplaquetários mantendo a plaqueta em estado quiescente. Pacientes com disfunção endotelial têm menor disponibilidade destes mediadores e, conseqüentemente, menor inibição plaquetária *in vivo*, mesmo que esta aparente ser suficiente nos testes *ex vivo*, os quais não consideram o ambiente em que as plaquetas residem *in vivo*.

Sendo assim, propõe-se nova abordagem para terapia antitrombótica visando aumento da disponibilidade dos nucleotídeos cíclicos através de ferramentas farmacológicas. Encaixam-se neste perfil os fármacos moduladores alostéricos da enzima guanilato ciclase (GC) independentes de NO e os inibidores da enzima fosfodiesterase (PDE), enzima esta responsável pela quebra dos nucleotídeos cíclicos intracelulares.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a combinação tripla composta de um inibidor do receptor purinérgico P2Y₁₂, um ativador da GC e um inibidor da PDE plaquetária, tem potencial para ser usada como uma estratégia terapêutica antitrombótica. Ao administrar estes fármacos em baixa dose, pode-se proporcionar um forte efeito antiplaquetário localizado e menor efeito em outros locais que a GC está presente, como nas células do músculo liso vascular. Além disso, a maior afinidade dos ativadores da GC em situações em que a enzima está na sua forma desacoplada pressupõe seletividade para tecidos em que há maior formação de espécies reativas de oxigênio, ou seja, tecidos doentes, conferindo proteção cardiovascular e minimizando possíveis efeitos adversos.

Palavras chave: Plaquetas sanguíneas. Trombose. Fármacos (sistema cardiovascular). Farmacologia experimental.

ABSTRACT

FERREIRA, P. M. **Soluble guanylate cyclase allosteric modulators as anti-platelet therapy: in vitro, ex vivo and in vivo studies.** 2016. 121 p. Ph. D. Thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Disorders on the cardiovascular system are the main cause of death in the United States of America. One every 3 north Americans have one or more type of cardiovascular diseases resulting in approximately 85.6 millions of people affected, representing 30.8% of all deaths in the country. Central to many diseases of the cardiovascular system are platelets, which, when inappropriately activated, can cause complications such as myocardial infarction and stroke.

Dual anti-platelet therapy (DAPT), composed of acetylsalicylic acid and a P2Y₁₂ receptor blocker (clopidogrel, prasugrel, ticagrelor) is recommended for the secondary prevention of atherothrombotic events in patients with acute coronary syndromes or following percutaneous coronary intervention. Whilst DAPT is associated with an improvement in patient outcomes, thrombotic events do still occur. An often explored hypothesis is that the risk of experiencing a thrombotic event is associated with the level of platelet blockade.

Platelet reactivity of patients under a P2Y₁₂ receptor blocker therapy alone or in combination with acetylsalicylic acid is a function of the level of P2Y₁₂ receptor blockade and the levels of nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI₂), two important endothelium-derived autacoids, that synergize increasing the levels of intraplatelet cyclic nucleotides keeping the platelet in a resting state. Patients with endothelial dysfunction tend to have less availability of these mediators and, consequently, less platelet inhibition *in vivo*. Even *if ex vivo* platelet function testing shows sufficient inhibition they do not consider the environment in which platelets reside *in vivo*.

Therefore, a new antithrombotic therapy is proposed aimed to increase the availability of cyclic nucleotides through pharmacological tools such as the soluble

guanylate cyclase (sGC) allosteric modulators independent of NO and phosphodiesterase (PDE) inhibitors, which avoid cyclic nucleotide breakdown.

Based on the results observed, the combination of a sGC activator and a PDE inhibitor given at low doses, in the presence of P2Y₁₂ receptor blocker, could produce enhanced and localized platelet inhibition with reduced effects in other sites of action such as the vascular smooth muscle. The highest affinity from the sGC activators to the heme-free enzyme favors selectivity to pathophysiological conditions, where there is increased formation of oxygen reactive species, granting cardiovascular protection and minimizing undesirable adverse effects.

Keywords: Platelets. Thrombosis. Drugs (Cardiovascular System). Experimental Pharmacology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 – Desenho feito por Bizzozero.....	24
Figura 1.2 – Trombócitos de répteis.....	25
Figura 1.3 – Uma plaqueta em diferentes estágios de ativação.....	26
Figura 1.4 – Cascata de coagulação: vias intrínseca e extrínseca.....	29
Figura 1.5 – Vias de formação dos prostanóides.....	37
Figura 3.1 – Diagrama observado no citômetro de fluxo após marcação de plaquetas individuais.....	62
Figura 3.2 – Câmara de fluxo usada nos experimentos de adesão plaquetária.....	63
Figura 4.1 – Curvas concentração-resposta ao NO em plaquetas tratadas com PAM, BAY 60-2770 e PGI ₂ , estimuladas com TRAP-6.....	68
Figura 4.2 – Curvas concentração-resposta ao NO em plaquetas tratadas com PAM, BAY 41-2272 e PGI ₂ , estimuladas com TRAP-6.....	69
Figura 4.3 – Concentração de AMPc plaquetário em resposta a concentrações crescentes de PGI ₂ + NO em PRP pré-tratado com PAM e moduladores alostéricos.....	70
Figura 4.4 – Resposta plaquetária ao TRAP-6 em sangue total tratado com veículo e/ou moduladores alostéricos e/ou PAM.....	71
Figura 4.5 – Curvas dose-resposta ao BAY 60-2770 em sangue total estimulado com TRAP-6 e previamente tratado com veículo ou PAM.....	72
Figura 4.6 – Curvas dose-resposta ao BAY 60-2770 em PRP estimulado com TRAP-6 e previamente tratado com veículo e/ou PAM e/ou ODQ.....	73

Figura 4.7 – Imagens representativas de plaquetas aderidas a segmentos da câmara de fluxo. Sangue total previamente tratado com veículo, PAM e/ou BAY 60-2770.....	74
Figura 4.8 – Porcentagem da área coberta por plaquetas em uma câmara de fluxo revestida por colágeno. Sangue total previamente tratado com veículo, PAM e/ou BAY 60-2770.....	75
Figura 4.9 – Curvas concentração-resposta a diferentes moduladores alostéricos da GC em plaquetas estimuladas por TRAP-6. Sangue total previamente tratado com PAM ou veículo.....	76
Figura 4.10 – Resposta plaquetária ao TRAP-6 em sangue total tratado com veículo, PAM e/ou cinaciguat.....	77
Figura 4.11 – Imagens representativas de plaquetas aderidas a segmentos da câmara de fluxo. Sangue total previamente tratado com veículo, PAM e/ou cinaciguat.....	78
Figura 4.12 – Porcentagem da área coberta por plaquetas em uma câmara de fluxo revestida por colágeno. Sangue total previamente tratado com veículo, PAM e/ou cinaciguat.....	79
Figura 4.13 – Resposta plaquetária ao TRAP-6 em sangue total tratado com veículo, TAM e/ou cinaciguat e/ou dipiridamol.....	80
Figura 4.14 – Resposta plaquetária ao colágeno em sangue total tratado com veículo, TAM e/ou cinaciguat e/ou dipiridamol.....	81
Figura 4.15 – Resposta plaquetária ao TRAP-6 e ao colágeno em PRP tratado com veículo, TAM, cinaciguat e dipiridamol em diferentes combinações.....	82
Figura 4.16 – Imagens representativas de plaquetas aderidas a segmentos da câmara de fluxo. Sangue total previamente tratado com veículo, TAM, cinaciguat + dipiridamol e TAM + cinaciguat + dipiridamol.....	83

Figura 4.17 – Porcentagem da área coberta por plaquetas em uma câmara de fluxo revestida por colágeno. Sangue total previamente tratado com veículo, TAM, cinaciguat + dipiridamol e TAM + cinaciguat + dipiridamol.....	84
Figura 4.18 – Relação dose-efeito de prasugrel em modelo de trombose induzida em camundongos.....	86
Figura 4.19 – Efeito do tratamento com veículo, cinaciguat e/ou prasugrel em modelo de trombose induzida em camundongos.....	87
Figura 4.20 – Efeito do tratamento com veículo, prasugrel, cinaciguat + dipiridamol e prasugrel + cinaciguat + dipiridamol em modelo de trombose induzida de camundongos.....	88
Figura 4.21 – Resposta plaquetária a AA, colágeno e AYPGKF em sangue total de camundongos pré-tratados com veículo, prasugrel, cinaciguat + dipiridamol e prasugrel + cinaciguat + dipiridamol.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	ácido araquidônico
AAS	ácido acetilsalicílico
AC	adenilato ciclase
ADP	difosfato de adenosina
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
AVC	acidente vascular cerebral
COX	ciclooxigenase
DMSO	dimetilsulfóxido
DVP	doença vascular periférica
FvW	fator von Willebrand
GC	guanilato ciclase
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
GP	glicoproteína
GTP	guanosina trifosfato
IAM	infarto agudo do miocárdio
IBMX	isobutilmetilxantina
IP ₃	trifosfato de inositol
LDL	lipoproteína de baixa densidade
NO	óxido nítrico
PAM	metabólito ativo do prasugrel
PBS	tampão fosfato-salino
PDE	fosfodiesterase

PG	prostaglandina
PGI ₂	prostaciclina
PKC	proteinoquinase C
PLC	fosfolipase C
PPP	plasma pobre em plaquetas
PRP	plasma rico em plaquetas
TAM	metabólito ativo do ticagrelor
TRAP	peptídeo ativador do receptor de trombina
TX	tromboxano
TxS	tromboxano sintase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 O sistema cardiovascular.....	22
1.2 A plaqueta.....	23
<u>1.2.1 Histórico.....</u>	23
<u>1.2.2 Estruturas semelhantes em outros animais.....</u>	24
<u>1.2.3 Morfologia plaquetária.....</u>	25
1.3 O papel das plaquetas hemostase.....	27
<u>1.3.1 Hemostase primária: agregação plaquetária e formação do trombo.....</u>	27
<u>1.3.2 Hemostase secundária: coagulação.....</u>	28
1.4 Agonistas plaquetários.....	29
1.5 O papel das plaquetas nas doenças cardiovasculares.....	32
<u>1.5.1 Mecanismos e manifestações clínicas da doença arterial coronariana.....</u>	32
<u>1.5.2 Tromboembolismo venoso.....</u>	34
1.6 Tratamentos antiplaquetários.....	36
<u>1.6.1 Ácido acetilsalicílico.....</u>	36
<u>1.6.2 Inibidores da via do tromboxano.....</u>	39
<u>1.6.3 Antagonistas do receptor purinérgico P2Y₁₂.....</u>	41
1.6.3.1 <i>Ticlopidina.....</i>	42
1.6.3.2 <i>Clopidogrel.....</i>	42
1.6.3.3 <i>Prasugrel.....</i>	43
1.6.3.4 <i>Ticagrelor.....</i>	44
1.6.3.5 <i>Terapia dupla antiplaquetária: aspirina + antagonista do receptor P2Y₁₂.....</i>	45
<u>1.6.4 O endotélio como fator determinante para inibição plaquetária.....</u>	46
<u>1.6.5 A enzima guanilato ciclase como alvo na terapia antitrombótica.....</u>	47
1.6.5.1 <i>Estimuladores da guanilato ciclase.....</i>	48
1.6.5.2 <i>Ativadores da guanilato ciclase.....</i>	49

1.6.6 Inibidores da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$	51
1.6.7 Antagonistas do receptor PAR-1.....	53
1.6.8 Inibidores da fosfodiesterase.....	54
2 OBJETIVOS.....	56
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
3.1 Coleta de sangue de voluntários sadios.....	57
3.2 Preparação do plasma rico em plaquetas (PRP) e do plasma pobre em plaquetas (PPP).....	57
3.3 Preparação dos agonistas plaquetários.....	57
3.4 Preparação dos mediadores endoteliais.....	58
3.5 Preparação dos inibidores e tratamento do sangue total e PRP.....	58
3.6 Agregometria por transmissão de luz.....	59
3.7 Agregometria por transmissão de luz na placa de 96 poços.....	59
3.8 Agregometria em sangue total por separação de células ativadas por fluorescência (citometria de fluxo).....	61
3.9 Quantificação de nucleotídeos cíclicos.....	62
3.10 Ensaio de adesão plaquetária em fluxo.....	63
3.11 Análise de deposição dos trombos.....	64
3.12 Modelo de trombose em camundongos.....	65
3.13 Avaliação ex vivo da função plaquetária de camundongos pré-tratados.....	65
3.14 Análise estatística.....	66
4.1 Estudos <i>in vitro</i> utilizando sangue de voluntários saudáveis.....	67
4.1.1 A sinergia entre a inibição purinérgica com o metabólito ativo do prasugrel e moduladores alostéricos da guanilato ciclase.....	67
4.1.2 Estudos <i>in vitro</i> da função plaquetária de sangue de voluntários sadios utilizando o metabólito ativo do ticagrelor (TAM) como inibidor do receptor purinérgico P2Y ₁₂ em associação a cinaciguat e dipiridamol.....	79
4.2 Estudos <i>in vivo</i> utilizando camundongos pré-tratados com antiplaquetários – modelo de trombose induzida por FeCl ₃	84

4.3 Estudos <i>ex vivo</i> com sangue de camundongos pré-tratados com os antiplaquetários para avaliação da reatividade plaquetária.....	89
5 DISCUSSÃO.....	91
6 CONCLUSÃO.....	95
REFERÊNCIAS.....	96
APÊNDICE.....	114
<p>A - FERREIRA, P. M. et al. Acetylsalicylic Acid Daily vs Acetylsalicylic Acid Every 3 Days in Healthy Volunteers: Effect on Platelet Aggregation, Gastric Mucosa, and Prostaglandin E2 Synthesis. Journal of Clinical Pharmacology, v. 56, n. 7, p. 862-868, 2016.</p>	

1 INTRODUÇÃO

1.1 O sistema cardiovascular

O sistema cardiovascular – composto pelo coração, vasos sanguíneos e sangue – tem como função principal transportar oxigênio, nutrientes, proteínas, hormônios, células e produtos para excreção entre os tecidos. Esse processo é viabilizado pelo coração, responsável por bombear o sangue através de artérias, veias e capilares, os quais conectam órgãos como o intestino, rins e pulmões. Este sistema necessita manutenção constante, feita principalmente por leucócitos e plaquetas¹.

Um aspecto importante para manutenção deste sistema é a hemostase. Trata-se de uma rede complexa de mecanismos responsável por interromper o sangramento após injúria vascular, mantendo o sangue dentro dos vasos. Para tal, o sangue se transforma do estado líquido para o estado gelatinoso no local do sangramento através do processo de coagulação, e mantém-se no estado líquido em todos os outros locais em que está presente. A hemostase é um mecanismo fundamental para manutenção da vida.

Desordens nesse sistema correspondem a principal causa de morte nos Estados Unidos. Um em cada 3 norte-americanos tem um ou mais tipos de doenças cardiovasculares, totalizando aproximadamente 85.6 milhões de pessoas afetadas, sendo que 30.8% de todas as mortes naquele país são atribuídas a uma desordem do sistema cardiovascular². As plaquetas tem papel determinante em várias doenças cardiovasculares e podem causar complicações fatais como infarto do miocárdio e acidentes cerebrovasculares, se ativadas inapropriadamente.

No Reino Unido, 98% dos pacientes diagnosticados com doença coronariana recebem alguma terapia anti-plaquetária. Entre os anos de 2012 e 2013, foram emitidas 38.6 milhões de prescrições somente na Inglaterra³. Há um grande corpo de evidência clínica sustentando o sucesso de tais tratamentos⁴⁻⁷, seja com o ácido acetilsalicílico (AAS) ou inibidores do receptor P2Y₁₂. Mesmo com o alto número de pacientes com o tratamento farmacológico recomendado, as doenças cardiovasculares isquêmicas se

mantêm como líder de morbidade e mortalidade, enfatizando a necessidade de tratamentos alternativos ou mais refinados⁸.

Um dos principais desafios para a melhora da terapia anti-plaquetária corresponde encontrar o balanço ideal entre o risco de sangramento e o potencial antitrombótico⁹. Para tal, necessita-se maior precisão ao usar as terapias existentes e ao desenvolver novas estratégias. Ter melhor entendimento sobre os processos que ocorrem durante a ativação plaquetária e porque as plaquetas de diferentes indivíduos reagem diferentemente a lesões nos vasos sanguíneos ou a terapias anti-plaquetárias são alguns dos pontos cruciais para prevenção de eventos cardiovasculares¹⁰.

1.2 A plaqueta

1.2.1 Histórico

As plaquetas foram inicialmente descritas por Osler em seus trabalhos publicados em 1873 e 1874. Ele reconheceu que estes elementos circulavam somente no sangue, descreveu sua estrutura discoide e a capacidade rápida de formação de agregados quando removidas do vaso sanguíneo. Entretanto, ele não estava certo se as plaquetas eram elementos normais do sangue ou exógenos^{11,12}. Após 7 anos, através de experimentos de microscopia intravital em artérias mesentéricas de porcos-da-índia, Bizzozero descreveu a estrutura anatômica da plaqueta, bem como sua capacidade de adesão em locais de injúria nos vasos acompanhado do recrutamento de leucócitos nos agregados plaquetários, definindo assim o papel destes elementos na hemostase e na formação de trombos (**Figura 1.1**)^{13,14}. Desde esse marco importante na pesquisa cardiovascular, o conhecimento sobre estas células aumentou consideravelmente cobrindo aspectos do seu processo de formação, maturação e remoção, além do seu papel em processos fisiológicos, principalmente na hemostase.

Figura 1.1 – Desenho feito por Bizzozero.

Representação de uma imagem de microscopia intravital onde se observa deposição de plaquetas e leucócitos após injúria na artéria mesentérica de um porco-da-índia¹⁴.

1.2.2 Estruturas semelhantes em outros animais

Somente um tipo de célula circula no sangue ou hemolinfa da maioria dos invertebrados. Este tipo único celular está envolvido com os mecanismos de defesa do animal, inclusive na hemostase. Estas células são capazes de agregar e vedar feridas. Trata-se provavelmente do processo mais primitivo relacionado à função hemostática¹⁵.

As células sanguíneas envolvidas na hemostase e coagulação de todos os outros vertebrados, com exceção dos mamíferos, são nucleadas e chamadas de trombócitos. Observa-se na **Figura 1.2**, 3 fotografias de trombócitos de répteis. No Painel A os trombócitos estão na sua forma inativa. No Painel B, pode-se observar um agregado de trombócitos e no Painel C, observam-se trombócitos binucleados.

Figura 1.2 – Trombócitos de répteis.

(A) Trombócitos inativos de uma Tartaruga de Herman (*Testudo hermanni boettgeri*). Aumento de aproximadamente 1000 vezes (B) Agregado de trombócitos ativados de *Iguana iguana*. Aumento de aproximadamente 400 vezes. (C) Trombócito binucleado de uma Tartaruga Marginata (*Testudo marginata*). Corante Hemacolor (Merck). Aumento de aproximadamente 1000 vezes¹⁶.

1.2.3 Morfologia plaquetária

A plaqueta dos mamíferos é derivada de estruturas que lembram pseudópodos no citoplasma dos megacariócitos, as pró-plaquetas. São estruturas intermediárias entre a transição megacariócito e plaqueta. Os megacariócitos são o único tipo celular poliploide presente na medula óssea, a qual se desenvolve de células-tronco hematopoiéticas após estimulação de trombopoietina. Somente os mamíferos possuem megacariócitos poliploides e plaquetas anucleadas. Existem aproximadamente um trilhão de plaquetas circulantes no sangue e a taxa de renovação destas células é de 7 a 10 dias. O corpo humano produz 100 bilhões de plaquetas por dia, sendo que cada megacariócito, sob estimulação de trombopoietina, é capaz de produzir 100-200 plaquetas durante um período de 4 horas¹⁷.

As plaquetas são as menores células circulantes no sangue medindo aproximadamente 2.0 a 5.0 μm de diâmetro e 0.5 μm de espessura, com um volume médio de 6 a 10 fentolitros. Para manter seu formato original discoide, as plaquetas tem um citoesqueleto altamente consistente e organizado, o qual se reorganiza após ativação mudando sua forma inicial discoide para uma estrutura intermediária com

pseudópodos e, subsequentemente, para uma forma irregular que aumenta sua área de superfície (**Figura 1.3**)¹⁸.

Figura 1.3 – Uma plaqueta em diferentes estágios de ativação.

Imagens captadas por microscopia eletrônica de alta resolução. Aumento de 10000-13000x¹⁹.

As plaquetas contêm várias organelas, as quais são cruciais para atividade metabólica. Destacam-se as mitocôndrias, as quais são altamente funcionais e estão envolvidas na regulação de eventos pró-trombóticos. As plaquetas também possuem glicossomos e lisossomos^{20,21}.

As plaquetas também liberam grânulos para facilitar importantes reações hemostáticas, além de outros processos incluindo inflamação e angiogênese. Existem dois tipos de grânulos secretórios: os grânulos-alfa, que contém proteínas como fibrinogênio, fator von Willebrand (FvW), fatores de crescimento, P-selectina e quimiocinas^{22,23}; e os grânulos densos que contém Ca^{2+} , adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), guanosina trifosfato (GTP), serotonina e histamina²⁴⁻²⁶. As plaquetas também possuem um sistema canalicular interconectado caracterizado por invaginações na superfície da membrana que facilitam a liberação dos grânulos²⁷.

Na superfície plaquetária estão expressos vários receptores acoplados à proteína G e também as integrinas.

As integrinas são formados por 2 subunidades: uma grande - subunidade α - e uma menor - subunidade β , as quais mantêm-se em uma conformação de baixa afinidade pelos seus ligantes quando as plaquetas estão em seu estado quiescente. Em

situações de estímulo provocado por um mediador externo, as subunidades mudam para uma conformação de maior afinidade para seus ligantes favorecendo cascatas de sinalização que levam a ativação plaquetária. Este processo é conhecido como sinalização de fora para dentro e a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ é um exemplo^{28,29}.

1.3 O papel das plaquetas na hemostase.

A hemostase pode ser definida como o mecanismo de defesa que impede perda do sangue devido a um rompimento em um vaso devido a um trauma. As plaquetas desempenham papel fundamental neste processo.

Após dano vascular, há exposição de proteínas pró-hemostáticas que permitem a captura das plaquetas no local, levando a ativação plaquetária e geração de trombina. Com isso, há recrutamento de novas plaquetas e inicia-se a cascata de coagulação. Estes eventos levam a estase sanguínea local e iniciam o processo de cicatrização. Abaixo serão detalhados os mecanismos moleculares descritos desde a adesão plaquetária no local do dano vascular até a formação do trombo.

1.3.1 Hemostase primária: agregação plaquetária e formação do trombo

Em locais de dano vascular, as plaquetas aderem a matriz subendotelial através de interação entre o FvW, presente no endotélio exposto, e o complexo GPIb-V-IX, o receptor plaquetário³⁰. As primeiras plaquetas aderentes são estabilizadas e ativadas pela ligação de GPVI e a integrina $\alpha_2\beta_1$ às moléculas de colágeno expostas³¹. Após essa deposição inicial, novas plaquetas são recrutadas no local de formação do trombo e ancoradas por meio de ligações mediadas pela integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ ³². Uma vez ancoradas, as plaquetas defrontam-se com uma miríade de agonistas que são gerados ou secretados pelas plaquetas ativadas (exemplo: tromboxano- A_2)^{33,34}, liberados após degranulação plaquetária (exemplo: ADP)³⁵ ou sintetizados na superfície plaquetária no local de formação do trombo (exemplo: trombina)³⁶. A cascata de sinalização intracelular após ativação plaquetária leva a mobilização de cálcio (que estava tanto

armazenado em compartimentos intracelulares e no espaço extracelular) para o citoplasma, mudança de conformação da plaqueta, degranulação e aumento da afinidade da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ pelo FvW e fibrinogênio³⁷. A ligação do fibrinogênio a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ em plaquetas diferentes auxilia na agregação e formação do trombo³⁸, e estimula as plaquetas através da ativação de outras integrinas^{39,40}.

Outras cadeias de sinalização evitam que as plaquetas sejam ativadas inapropriadamente, sendo o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI_2) os mediadores mais potentes liberados no sangue pelo endotélio arterial saudável. Estes mediadores serão examinados com maior profundidade no decorrer deste trabalho.

Esta resposta coordenada permite que as plaquetas reajam rapidamente em caso de dano vascular e, na maioria das circunstâncias, resultando na formação de um trombo estável prevenindo o extravasamento de sangue em excesso sem bloquear o fluxo sanguíneo que passa pelo local do dano. Alterações na contagem de plaquetas ou na capacidade de resposta alteram a dinâmica desta resposta, consequentemente aumentando o risco de sangramento ou oclusão vascular e doenças trombóticas¹⁰.

1.3.2 Hemostase secundária: coagulação

A coagulação descreve uma rede complexa de mecanismos que resultam na conversão de fibrinogênio solúvel em uma rede de fibrina culminando na mudança do sangue do estado líquido para um aspecto de gel, também chamado de coágulo. A descrição clássica do sistema de coagulação envolve um modelo de cascata que consiste de 2 vias distintas: a via intrínseca e a via extrínseca, representadas em detalhe na **Figura 1.4**.

Algumas proteínas da coagulação estão presentes no interior da plaqueta, como o fator Va. Uma vez liberado pelos grânulos α , o fator Va serve de receptor de membrana para o fator Xa, formando o complexo Va/Xa na membrana plaquetária, que vai ativar a protrombina (fator II), transformando-a em trombina. Com a formação de trombina, há maior estímulo à conversão do fator V em Va, favorecendo maior geração de trombina no local. A ativação do fator Xa na membrana das plaquetas é uma etapa importante no início da coagulação, que ainda exige a ação do fator IXa, fator VIIIa e dos íons Ca^{2+} . A

liberação de ADP pelas plaquetas ativadas leva a ativação do fator XIIa (fator contato), em presença do fator XI. As plaquetas também atuam na fase de estabilização do coágulo, mediante presença do fator XIII – fator estabilizador da fibrina – o qual contribui para formação de uma rede de fibrina estável após a formação do plug ou tampão plaquetário⁴¹.

Figura 1.4 – Cascata de coagulação: vias intrínseca e extrínseca⁴¹.

(HMWK = cininogênio de alto peso molecular, α indica o fator de coagulação ativado; T = pontos de atuação da trombina).

1.4 Agonistas plaquetários

Os testes de função plaquetária realizados em ambiente laboratorial utilizam agonistas plaquetários conhecidos na quantificação dos processos de adesão, agregação e secreção. Abaixo serão descritos os agonistas mais usados e o mecanismo de ação de ativação plaquetária de cada um deles.

O ácido araquidônico está presente na membrana plaquetária e é liberado no citosol após ativação plaquetária e convertido em endoperóxidos intermediários prostaglandina- G_2 (PGG_2) e prostaglandina- H_2 (PGH_2) pela enzima ciclooxygenase (COX). PGH_2 é convertido em tromboxano- A_2 (TXA_2) através da ação da enzima tromboxano sintase⁴². O TXA_2 se liga ao receptor TP, acoplado à proteína G, facilitando a ligação das proteínas G_q e G_{13} . A ligação de TXA_2 ao seu receptor plaquetário ativa a fosfolipase C (PLC) e, consequentemente, a formação de trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol. Esta ativação causa aumento no influxo intracelular de cálcio e ativação da proteinoquinase C (PKC) facilitando a mudança de conformação e posterior agregação e adesão a outras plaquetas. O TXA_2 não é armazenado dentro das plaquetas e também tem ação amplificadora na segunda onda de agregação⁴³.

O U46619 age como agonista do receptor de TXA_2 , ligando-se ao receptor TP causando a liberação de grânulos densos contendo ADP e cálcio. A secreção destes compostos facilita a mudança de conformação, recrutamento de outras plaquetas, agregação e adesão⁴⁴.

O ADP é um agonista forte, responsável tanto pela primeira quanto pela segunda onda de agregação, funcionando também como amplificador da agregação. O ADP se liga tanto aos receptores $P2Y_{12}$ e $P2Y_1$, causando ativação plaquetária e recrutamento de plaquetas no sítio de dano vascular⁴⁵. Os receptores $P2Y_{12}$ e $P2Y_1$ são acoplados à proteína G e após ativação, facilita-se o influxo de cálcio levando a mudança de conformação da plaqueta⁴⁶. De forma secundária, a ativação plaquetária pelo ADP causa secreção dos grânulos densos, que como já mencionado, potenciam a ativação e estabilização do agregado plaquetário.

A ristocetina era originalmente usada como antibiótico e hoje é usada como aglutinante plaquetário. A primeira observação de que este composto tinha efeito nas plaquetas data de 1971. Seu mecanismo de ação se dá através da estimulação da ligação do FvW ao seu receptor GPIb, levando a ativação plaquetária e a cascata de agregação subsequente⁴⁷.

A trombina é uma serinoprotease que ativa a cascata de coagulação em locais de dano vascular. A trombina tem várias funções que contribuem para ativação plaquetária. Ela age diretamente nas plaquetas promovendo mudança de conformação e liberação dos grânulos densos e grânulos α . Além disso, age convertendo fibrinogênio em monômeros de fibrina que podem induzir polimerização formando uma rede de fibrina facilitando a coagulação sanguínea⁴⁸.

A trombina age como um agonista plaquetário através da clivagem proteolítica do seu receptor de membrana (PAR). Essa clivagem expõe o peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP) o qual se liga a PAR. A trombina pode clivar tanto PAR-1 quanto PAR-4, ambos constituintes da membrana de plaquetas humanas. A clivagem e subsequente ativação de PAR-1 é mais eficiente comparado a PAR-4. A ativação dos PARs pela trombina causa acoplamento a G_q e $G_{12/13}$ levando a ativação pela PLC, causando mobilização de cálcio e reorganização das fibras de actina através de rho quinases facilitando a mudança de conformação da plaqueta. A geração de trombina e as ações consequentes levam a uma retroalimentação negativa limitando sua produção. Os receptores PAR-1 e PAR-4 são internalizados e degradados através dos lisossomos após a sinalização induzida por trombina⁴⁹.

O peptídeo ativador do receptor de trombina TRAP-6 é um peptídeo sintético que ativa o receptor PAR-1 sem a clivagem prévia. Este peptídeo mimetiza os efeitos da trombina resultando em aumento do influxo de cálcio e diminuição dos níveis de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), resultando em agregação plaquetária⁵⁰. O AYPGKF age como agonista do receptor PAR-4 e é utilizado para experimentos com roedores, pois estes não expressam PAR-1. Os receptores plaquetários para trombina em roedores são PAR-3 e PAR-4⁵¹.

O colágeno tem papel importante tanto no processo de adesão quanto de agregação de plaquetas circulantes. O dano vascular expõe o colágeno subendotelial permitindo adesão plaquetária na parede do vaso. Estas interações são predominantemente mediadas através da integrina $\alpha_2\beta_1$ e GPVI. A estimulação destes receptores plaquetários levam ativação de PLC e elevação em IP_3 e diacilglicerol. O IP_3 então estimula a liberação de cálcio dos túbulos densos intracelulares e também o

influxo de cálcio para o meio intracelular. O diacilglicerol ativa PKC e, junto com o cálcio, induz mudança de conformação da plaqueta e secreção de grânulos⁵².

A adrenalina ativa os receptores adrenérgicos do tipo α_2 nas plaquetas. Estes receptores são acoplados a proteína G e sua ativação leva a inibição da enzima adenilato ciclase, diminuindo os níveis de AMPc. A ativação destes receptores também permite aumento do influxo de cálcio e induz mudança de conformação plaquetária⁵³.

1.5 O papel das plaquetas nas doenças cardiovasculares

Conforme descrito previamente, o principal papel das plaquetas na circulação está relacionado à formação do trombo. Desta forma, as plaquetas estão envolvidas em situações fisiopatológicas em que o trombo oclui vasos de pequeno calibre levando a eventos agudos, tais como infarto agudo do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais. A seguir, serão examinadas as principais moléstias em que o tratamento antiplaquetário é indicado.

1.5.1 Mecanismos e manifestações clínicas da doença arterial coronariana

A aterosclerose é uma doença inflamatória progressiva da vasculatura arterial que se desenvolve ao longo de anos. A evolução da doença é influenciada por vários fatores de risco, principalmente: tabagismo, gênero e idade, inatividade física, alterações nos níveis de colesterol, diabetes, obesidade e hipertensão, além de predisposição genética⁵⁴.

Os mecanismos celulares e moleculares que compõe a aterosclerose são estudados extensivamente visando encontrar novos alvos terapêuticos. Sugere-se que a disfunção endotelial, gerada em resposta a exposição prolongada aos fatores de risco, seja determinante para progressão da doença⁵⁵.

A tensão de cisalhamento provocada pelo fluxo sanguíneo nos vasos também tem papel central no desenvolvimento das placas ateroscleróticas. Em locais de ramificações ou curvaturas de vasos de médio a grande calibre, as forças de

cisalhamento são menores e o fluxo é turbulento ao invés de laminar resultando em desorganização do alinhamento das células endoteliais e favorecendo a expressão de moléculas de adesão, tais como, VCAM-1, P-selectina, E-selectina e ICAM-1. Tal ambiente favorece a adesão de monócitos e linfócitos, seguido de migração para a camada íntima do vaso⁵⁶.

Plaquetas também participam deste estágio inicial da doença e tal processo também é regido pelo fluxo sanguíneo turbulento. A ligação das plaquetas ao endotélio parece ser crítica para a iniciação da lesão aterosclerótica *in vivo*, mesmo em situações de ausência de denudação das células endoteliais. Ao inibir a adesão plaquetária ao endotélio, há menor recrutamento de leucócitos na parede dos vasos resultando em menor extensão da lesão aterosclerótica⁵⁷.

Dentro da camada íntima, os monócitos passam pelo processo de maturação e se transformam em macrófagos. As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) acumuladas na parede do vaso são captadas pelo macrófago resultando na formação das células espumosas⁵⁸. O recrutamento e proliferação de linfócitos e macrófagos são mantidos através da liberação local de quimiocinas. A liberação de marcadores inflamatórios dentro da placa pelos leucócitos leva a apoptose dos macrófagos contribuindo para a formação de um centro necrótico⁵⁹. Este ambiente proliferativo dentro da placa promove migração de células musculares lisas e aumento da lesão, gerando uma matriz extracelular e uma capa fibrosa que permitem expansão da placa para o lúmen do vaso. Em um modelo de camundongo deficiente em apolipoproteína-E, houve interação entre as plaquetas ativadas e agregados de plaquetas e leucócitos com as lesões ateroscleróticas desenvolvidas. Tais interações também promovem liberação de quimiocinas derivadas da plaqueta no endotélio das artérias que contém tais placas. Com o aumento da inflamação local e, principalmente, devido ao aumento de pressão no fluxo sanguíneo, a capa fibrosa se torna instável podendo acarretar em uma possível ruptura da placa^{60,61}.

Com a ruptura há liberação de fatores pró-trombóticos no lúmen do vaso e subsequente recrutamento e ativação das plaquetas circulantes. A partir deste momento, são iniciados os mesmos mecanismos de agregação plaquetária discutidos

anteriormente que levam a formação do trombo. Este trombo pode se desprender e viajar na corrente sanguínea até ocluir um vaso de calibre menor impedindo a passagem do sangue, colocando em risco a vida deste indivíduo.

Se este vaso estiver localizado no coração, por exemplo, haverá bloqueio do fluxo sanguíneo para uma parte do miocárdio resultando em necrose. Este tipo de evento é chamado de infarto agudo do miocárdio (IAM). Se há oclusão de uma artéria cerebral haverá impedimento da passagem do sangue para uma região do cérebro resultando em morte neuronal. Este tipo de evento é chamado de acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico.

Tais manifestações ateroscleróticas também podem ocorrer em regiões das extremidades inferiores, impedindo o fluxo sanguíneo normal. Conforme descrito acima, há maior predisposição para formação do ateroma em regiões em que há bifurcações e dobras no leito vascular e tal padrão anatômico é observado principalmente nas artérias e veias das pernas, sendo bem caracterizado nas bifurcações aórticas e ilíacas, no canal adutor da artéria superficial femoral e na trifurcação da artéria poplítea. Esta situação fisiopatológica é chamada de doença vascular periférica (DVP) ou doença arterial periférica. Os sintomas incluem: dor muscular, câimbras e dor ao caminhar. Estima-se que no período de 5 anos após a manifestação da doença, pelo menos 15% dos pacientes precisam de alguma intervenção cirúrgica ou perda do membro, e possuem 30% de chance em apresentar um evento cardiovascular maior ou morte^{62,63}.

1.5.2 Tromboembolismo venoso

A formação de coágulos em veias e em artérias é visto há muito tempo como dois mecanismos fisiopatológicos distintos. Argumentos recaem sobre as diferentes características anatômicas e tensão de cisalhamento do fluxo sanguíneo, além de apresentarem manifestações clínicas distintas. As principais manifestações clínicas do tromboembolismo venoso são a trombose venosa profunda e a fibrilação atrial.

De forma simplista, atribui-se o fenômeno de trombose arterial à ativação plaquetária pelos mecanismos previamente descritos, enquanto a trombose venosa é

relacionada à ativação do sistema de coagulação devido a menor tensão de cisalhamento do fluxo sanguíneo favorecendo a estase sanguínea, ativando a cascata de coagulação. Entretanto, existem evidências que os mecanismos fisiopatológicos da trombose arterial e do tromboembolismo venoso possam ter características etiológicas comuns entre si⁶⁴.

Apesar de considerável progresso no diagnóstico e tratamento do tromboembolismo venoso, ainda existem muitas questões sobre a patogênese desta condição. Os fatores de risco clássicos são: câncer, cirurgias, imobilização, fraturas, paralisia, gravidez e uso de estrógenos. Tais condições não só predis põem indivíduos normais a episódios trombóticos, mas também em pacientes com tendências pró-trombóticas. Mesmo que algum destes fatores de risco seja identificável na maioria dos pacientes, a causa da doença não tem explicação em aproximadamente 30% dos casos⁶⁵.

Em um estudo caso-controle observou-se maior prevalência de placas ateroscleróticas carotídeas em pacientes assintomáticos para doença arterial coronária, mas que apresentaram um evento tromboembólico venoso de etiologia desconhecida, se comparados com o grupo controle. Não houve diferença entre o número de placas carotídeas entre o grupo de pacientes que apresentaram um evento tromboembólico secundário, isto é, de etiologia conhecida, comparado ao grupo controle⁶⁴.

Pacientes que apresentaram um evento tromboembólico venoso de origem primária e de origem secundária foram monitorados por 4 anos em um estudo prospectivo. A meta primária do estudo foi investigar o número de eventos cardiovasculares de origem arterial: IAM fatal e não fatal, DVP, cardiopatias, entre outros. Houve maior prevalência significativa de eventos no grupo que apresentou um evento tromboembólico venoso primário comparado aos indivíduos que apresentaram um evento tromboembólico secundário e ao grupo controle⁶⁶.

O estudo PEP mostrou que o tratamento de curta duração com aspirina reduz a incidência de embolia pulmonar fatal e trombose venosa profunda ou embolia pulmonar em pacientes com fratura do quadril. Tais resultados suplantam estudos prévios⁶⁷. Além

disso, há redução do risco de recorrência de tromboembolismo venoso primário em um terço dos pacientes que se submetem ao tratamento contínuo com aspirina em baixa dose, após descontinuação de um anticoagulante oral⁶⁸.

Tais evidências clínicas indicam que haja uma possível associação entre aterosclerose e tromboembolismo venoso e que podem ter uma origem comum devido à anormalidade em algum componente do sangue, entretanto, a natureza desta associação não tem seu mecanismo fisiopatológico elucidado.

1.6 Tratamentos antiplaquetários

1.6.1 Ácido acetilsalicílico

O ácido acetilsalicílico (AAS) ou aspirina é um composto sintético derivado do produto natural ácido salicílico. O ácido salicílico é encontrado na casca de algumas árvores, por exemplo, o salgueiro, e tem sido usado para fins terapêuticos há mais de 2000 anos. No final do século XIX, este composto de característica altamente irritante foi levado para dentro do laboratório e sua acetilação produziu uma forma menos tóxica: o AAS.

O AAS é comercialmente produzido pela Bayer desde 1899⁶⁹. Desde então, milhões de pacientes beneficiaram-se de suas propriedades: analgésica, antitérmica, anti-inflamatória e antitrombótica. Todos estes efeitos são resultantes da inibição da produção de prostanóides⁷⁰.

Seu mecanismo de ação foi descrito há mais de 40 anos atrás e envolve a inibição irreversível da COX⁷¹. Mais recentemente, mais detalhes da interação entre o AAS e a COX foram descritos: acetilação do resíduo de serina 529, bloqueio do sítio catalítico do AA, levando a inibição da geração de PGH₂ que é substrato para várias enzimas que formarão os prostanóides. Cada um desses prostanóides tem ação específica em cada tecido. São eles: PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ e TXA^{72,73}. As vias de formação destes prostanóides estão representadas na **Figura 1.5**.

Figura 1.5 – Vias de formação dos prostanóides.

Através de uma reação de 2 etapas, o ácido araquidônico proveniente da fosfolipase A2 é convertido em PGG_2 e posteriormente em PGH_2 . A PGH_2 é o substrato para várias enzimas que formarão os prostanóides. A quantidade e expressão destas enzimas variam entre os tecidos. As plaquetas, por exemplo, possuem grande quantidade de TXA_2 sintase, enquanto as células endoteliais possuem PGI_2 sintase. COX = ciclooxigenase. Adaptado de [74].

O AAS se mantém como a principal terapia antitrombótica há pelo menos 50 anos. A dosagem comumente prescrita para prevenção do infarto do miocárdio, acidentes cerebrovasculares e morte por pacientes em alto risco cardiovascular está estabelecida entre 75 e 325 mg/dia, dependendo da prática clínica no país^{75,76}.

Em uma meta-análise composta de 16 estudos ($n = 17000$ indivíduos) que somente incluiu dados de pacientes que já tinham apresentado algum evento cardiovascular, ou seja, na prevenção secundária, a aspirina em baixa dose (75-100 mg/dia) se mostrou eficiente em prevenir aproximadamente 25% de complicações vasculares devido a eventos aterotrombóticos (IAM não-fatal, AVCs não-fatais ou morte por causa cardiovascular) correspondendo a uma redução absoluta de 10-20 eventos não-fatais por 1000 pacientes⁷⁷.

O efeito benéfico do AAS nas doenças cardiovasculares é explicado pela inibição da produção de TXA_2 , o qual é liberado após ativação plaquetária e, por conta desta propriedade, é definido como mediador secundário da agregação. A inibição da liberação de TXA_2 bloqueia a amplificação de uma cadeia de eventos pró-trombóticos, bem como a vasoconstrição. Os efeitos de TXA_2 são contrabalanceados pela PGI_2 , a qual é sintetizada pela COX-1 nas células endoteliais e liberada na circulação promovendo vasodilatação e manutenção das plaquetas em estado quiescente⁷⁸.

A inibição da formação de PGI_2 pelo AAS potencialmente aumentaria o risco trombótico. Entretanto, ao administrar doses baixas de AAS (menores que 100 mg) proporciona-se efeito inibitório da plaqueta por todo seu ciclo de vida enquanto a COX endotelial, necessária para formação de PGI_2 , é regenerada logo após a dose de AAS⁷⁹.

Entretanto, se administrado diariamente, mesmo em sua dose mais baixa, o AAS produz dano gastrointestinal e está associado com aumento no risco de desenvolvimento de úlcera duodenal e possíveis complicações hemorrágicas fatais⁸⁰. A inibição da COX nas células da mucosa gástrica pelo AAS causa diminuição da produção de prostaglandinas protetoras, como a PGE_2 e PGI_2 ^{81,82}. A secreção de PGE_2 endógena está diretamente relacionada à recuperação de lesões gastrointestinais e tem papel importante na manutenção da integridade do trato gastrointestinal^{83,84} e na aceleração da cicatrização⁸⁵. A recuperação completa da atividade da COX mucosal em voluntários recebendo AAS 81 mg/dia se dá apenas após 5 dias da descontinuação do AAS⁸⁶. Desta forma, usuários crônicos tem a atividade da COX gástrica permanentemente reduzida.

Para a prevenção secundária, o risco para apresentar complicações relacionadas a sangramento é de 20-50 vezes menor que um evento trombótico e, desta forma, o uso de aspirina é justificado. Já na prevenção primária de eventos cardiovasculares, isto é, em indivíduos que nunca apresentaram um evento cardiovascular, o uso diário de aspirina em baixa dose também se mostrou eficiente na prevenção de eventos trombóticos, porém o risco de apresentar um acidente vascular cerebral hemorrágico ou

sangramento gastrointestinal é superior e, desta forma, o uso de aspirina não é recomendado nestas situações⁸⁷.

Na primeira parte do meu doutorado, foram realizados 2 estudos clínicos. No primeiro investigou-se a duração da proteção plaquetária provida por uma dose única de AAS + losartana em voluntários saudáveis, a qual foi suficiente por até 72 horas. Este estudo também foi acompanhado de uma avaliação farmacocinética onde foi determinada a biodisponibilidade das formulações usadas⁸⁸.

Em um estudo subsequente⁸⁹, foram avaliados os efeitos antiplaquetários e gastrointestinais em dois grupos de tratamento: um recebeu a terapia combinada de losartana diária + AAS 81 mg a cada 3 dias e o outro a terapia dupla diária, ambas por 30 dias. Os voluntários que administraram AAS a cada 3 dias + losartana diária mantiveram os níveis de PGE_2 no antro ao fim do tratamento enquanto apresentaram inibição plaquetária completa. O grupo que recebeu a terapia dupla diária teve redução de 51.3% da síntese de PGE_2 no antro ao fim do tratamento. Devido a PGE_2 ser um importante prostanóide protetor do trato gastrointestinal, a terapia combinada com losartana e AAS a cada 3 dias mostra-se como uma estratégia interessante e segura principalmente para pacientes que necessitam da proteção antitrombótica e são propensos a apresentar sangramento gastrointestinal. Essa estratégia pode ter aplicação também na prevenção de doenças cardiovasculares de pacientes de alto risco, que não apresentaram um evento cardiovascular, mas que o julgamento médico for favorável para a terapia antitrombótica. Este estudo foi publicado em 2016 (Anexo A).

1.6.2 Inibidores da via do tromboxano

A via do tromboxano também é alvo para as terapias anti-plaquetárias. Vários compostos já foram sintetizados e testados clinicamente visando a diminuição da produção de tromboxano por mecanismos alternativos à clássica inibição da COX, característico do AAS. Estes fármacos podem ser divididos em duas classes: os

inibidores da enzima tromboxano sintase (TxS) e os antagonistas do receptor de tromboxano.

O ozagrel é um inibidor da TxS e o único medicamento desta classe que está em comercialização. Foi registrado inicialmente no Japão e está indicado no tratamento do AVC não-cardioembólico⁹⁰. Uma meta-análise recente compilou dados de 3000 pacientes e mostrou que pacientes que administram ozagrel, em comparação ao controle, tiveram melhora significativa no escore MESSS (Modified Edinburgh-Scandinavian Stroke Scale) que avalia a melhora neurológica, mas não houve benefício no número absoluto de mortes⁹¹.

A inibição farmacológica da TxS pode induzir um acúmulo de precursores do TXA₂, tais como PGG₂ e PGH₂, levando a um possível aumento de PGI₂ pelas células endoteliais e, desta forma, tendo um efeito duplamente benéfico⁹².

Os antagonistas do receptor de tromboxano merecem atenção especial, uma vez que bloqueiam os efeitos de todos os ligantes que agem neste receptor: isoprostanos, HETEs, e endoperóxidos. O receptor de tromboxano está expresso em vários tipos celulares relacionados a doenças cardiovasculares, tais como as plaquetas, parede vascular e células envolvidas na formação da placa aterosclerótica. Sendo assim, além destes fármacos apresentarem efeito antiplaquetário, podem também ter impacto na função endotelial e formação do ateroma. Há uma boa quantidade de dados pré-clínicos e alguns fármacos foram testados em estudos clínicos até fase III na prevenção de doenças cardiovasculares⁹⁰.

O terutroban é um antagonista competitivo do receptor de tromboxano que mostrou um perfil farmacocinético seguro e preditível e houve relação entre as concentrações plasmáticas e grau de inibição plaquetária em voluntários sadios nos estudos fase I⁹³. O estudo TAIPAD, foi um estudo fase II que comparou a efetividade de terutroban em comparação à aspirina e placebo em pacientes com doença vascular periférica. Ao todo, 435 pacientes foram randomizados e o terutroban mostrou efetividade ao menos semelhante à aspirina, mantendo a inibição da agregação plaquetária por até 24 horas após administração⁹³. O fármaco foi bem tolerado e,

baseado nos dados dos estudos pré-clínicos⁹⁴, foi realizado o estudo de superioridade fase III PERFORM comparando terutroban 30 mg uma vez ao dia versus aspirina, na prevenção secundária de eventos cardiovasculares. O estudo foi interrompido pelo patrocinador pois o grupo que recebeu terutroban estava apresentando mais eventos de sangramento, enquanto não demonstrava superioridade à aspirina^{90,95}.

O ridogrel é um fármaco que tanto inibe a enzima TxS e age como antagonista do receptor de tromboxano. O tratamento com ridogrel em pacientes que passaram por um tratamento trombolítico após IAM. Foram recrutados 907 pacientes, porém não houve benefício do ridogrel sobre o tratamento com aspirina (escore TIMI semelhante) e também não houve maior número de eventos de sangramento, conforme observado com o terutroban. Cogitou-se que a dose de ridogrel usada não foi suficiente para inibição significativa do receptor TP⁹⁶.

A picotamida é outro inibidor da TxS e do receptor de tromboxano. É comercializado na Itália para o tratamento da doença vascular periférica. No estudo DAVID, o grupo que recebeu o tratamento com picotamida teve 45% de redução no desfecho de mortalidade por qualquer causa, comparado ao grupo que recebeu aspirina. Entretanto estes dados precisam ser confirmados em uma população maior antes de substituir o tratamento convencional com aspirina neste grupo de pacientes⁹⁷.

1.6.3 Antagonistas do receptor purinérgico P2Y₁₂

O ADP é um mediador secundário liberado pelos grânulos densos de plaquetas ativadas que age através de dois receptores acoplados à proteína G encontrados nas plaquetas: P2Y₁ e P2Y₁₂. A sinalização do ADP através do receptor P2Y₁, acoplado à proteína G_q, leva a uma resposta rápida de curta duração, causando mobilização de cálcio intracelular e mudança de conformação, culminando em agregação transiente. Já a sinalização pela via do receptor P2Y₁₂, acoplado à proteína G_i, leva a inibição da enzima adenilato ciclase e consequente supressão dos níveis de AMPc⁹⁸. Tal efeito resulta em agregação plaquetária e, principalmente, amplifica e sustenta a agregação por outro agonista⁹⁹. Destaca-se a importância da via do ADP pelo receptor P2Y₁₂ devido ao uso de inibidores do receptor P2Y₁₂, medicamentos usualmente

recomendados na terapia antitrombótica. Os fármacos inibidores do receptor $P2Y_{12}$ agem inibindo a agregação plaquetária pelos seguintes mecanismos:

a) antagonismo direto (tienopiridinas) e alostérico (cangrelor, ticagrelor) do receptor,

b) inibição da ativação da via do TXA_2 ¹⁰⁰,

c) potencialização dos efeitos do NO e PGI_2 através de um mecanismo sinérgico¹⁰¹.

1.6.3.1 Ticlopidina

A ticlopidina é um pró-fármaco de administração oral que requer metabolização através dos citocromos P450 para ser convertido no seu metabólito ativo. Age inibindo irreversivelmente o receptor $P2Y_{12}$. Foi o primeiro fármaco da classe das tienopiridinas utilizado na terapêutica. Entretanto, foi retirado de comercialização devido a sua alta toxicidade resultando em eventos adversos graves e frequentes como púrpura trombocitopênica trombótica, sendo substituído pelo clopidogrel¹⁰².

1.6.3.2 Clopidogrel

O clopidogrel também é um pró-fármaco metabolizado no fígado através do complexo enzimático citocromo P450. O metabólito ativo age de forma de dose-dependente inibindo de forma irreversível somente o receptor $P2Y_{12}$ enquanto são mantidas a mudança de conformação e a agregação transiente, sinalizadas através do receptor $P2Y_1$ ¹⁰³.

Ao ser introduzido na terapêutica, o estudo CAPRIE comparou clopidogrel à aspirina na prevenção secundária de eventos cardiovasculares. Foram recrutados mais de 1900 pacientes com histórico recente de IAM, acidente cerebrovascular ou doença vascular periférica sintomática. Clopidogrel demonstrou superioridade na redução de risco de eventos cardiovasculares e teve menor incidência de sangramento¹⁰⁴.

Desde então, foram realizados vários estudos visando melhora da terapia antitrombótica em pacientes com alto risco cardiovascular. Os estudos CHARISMA e

CURE demonstraram benefício para a terapia composta de aspirina e clopidogrel na prevenção secundária de eventos cardiovasculares¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. As doses mais efetivas e seguras foram determinadas através dos estudos CURRENT-OASIS 7 e CREDO¹⁰⁸.

Também se demonstrou benefício na manutenção prolongada da terapia antiplaquetária dupla após intervenção coronária percutânea em pacientes sem risco de sangramento comparado a interrupção após 30 dias do procedimento¹⁰⁹. Atualmente, é consenso na prática clínica a recomendação de uma dose de ataque de 600 mg seguida de 75 mg/dia de manutenção a longo prazo para indivíduos que passaram por uma intervenção coronária percutânea ou apresentaram uma síndrome coronariana aguda.

Há uma grande proporção de pacientes que apresentam resistência ou metabolização ineficiente ao tratamento com clopidogrel. Vários estudos relacionam tal padrão à diminuição de biodisponibilidade devido a mutações no gene CYP2C19, responsável pela transcrição do citocromo P450 subtipo 2C19, envolvido na metabolização do clopidogrel. Indivíduos com mutações neste complexo enzimático apresentam maior ou menor nível plasmático do metabólito ativo do clopidogrel comparado a indivíduos normais, resultando em significativas diferenças inter-individuais na eficácia do tratamento^{110,111}. Entretanto, recentemente esses estudos foram criticados devido às metodologias usadas. Uma nova análise concluiu que o clopidogrel é um substrato enzimático do complexo CYP3A4/5, sendo este responsável pela maior parte da metabolização. A inibição deste complexo com suco de toranja (grapefruit) causou uma redução 6 vezes na área sobre a curva de metabolização do clopidogrel. Segundo esta análise, o complexo CYP2C19 também contribui, mas tem menor participação na metabolização¹¹².

1.6.3.3 Prasugrel

Devido à variabilidade na metabolização do clopidogrel na população, foram desenvolvidos novos fármacos inibidores do receptor P2Y₁₂. O prasugrel é uma tienopiridina de 3ª geração que também é um pró-fármaco e seu metabólito ativo tem ação irreversível no receptor. Sua metabolização depende menos da ação do complexo

do citocromo P450 e é feita em maior parte por estearases, proporcionando menor variação inter-individual¹¹³. O metabólito ativo do prasugrel é mais potente e o seu tempo de ação é mais rápido comparado ao do clopidogrel, promovendo uma inibição mais consistente do receptor P2Y₁₂¹¹⁴. O estudo TRITON TIMI-38 comparou prasugrel a clopidogrel, ambos associados à aspirina, em pacientes após intervenção coronária percutânea. O grupo que recebeu prasugrel teve 19% de redução no risco relativo dos desfechos primários (morte cardiovascular, IAM não fatal e AVCs não fatais), acompanhado de maior número de eventos de sangramento maior e fatal¹¹⁵.

O FDA recomenda que pacientes com menos de 60 kg recebam prasugrel 5 mg como dose de manutenção, visando evitar os riscos de sangramento, entretanto não há estudos prospectivos à respeito da efetividade e a segurança desta dose. Recomenda-se não iniciar o tratamento com prasugrel em pacientes que necessitam cirurgia cardíaca urgente e, caso o paciente esteja em terapia com prasugrel, indica-se descontinuação 7 dias antes da cirurgia¹¹⁶.

1.6.3.4 Ticagrelor

Ticagrelor é um fármaco de ação reversível, seletiva, de ação direta no receptor P2Y₁₂ e administrado por via oral. É metabolizado no fígado pelo complexo CYP3A4/5 e seu metabólito direto também tem ação equipotente no receptor P2Y₁₂. O mecanismo de ação envolve a ligação do fármaco em um sítio alostérico de receptor P2Y₁₂ e, desta forma, não previne a ligação de ADP no seu sítio ativo, diferentemente das tienopiridinas. A ligação de ticagrelor no receptor produz mudança de conformação do receptor P2Y₁₂ e ativação da proteína G, mantendo o receptor em estado inativo. O receptor volta a sua conformação ativa após desvinculação do ticagrelor. Ticagrelor foi aprovado em 2011 pelo FDA¹¹⁷.

O estudo PLATO (fase III, multicêntrico, randomizado, duplo-cego) comparou a terapia associada de ticagrelor e aspirina à clopidogrel e aspirina na prevenção de eventos cardiovasculares e morte em pacientes com síndrome coronariana aguda. Ticagrelor mostrou-se vantajoso à clopidogrel após 30 dias e manteve-se por 12 meses com uma redução de risco relativo de 16% nos desfechos primários¹¹⁸. Também

demonstrou diminuição na recorrência de eventos cardiovasculares primários e recorrentes em comparação a clopidogrel¹¹⁹. Não houve diferença entre os grupos de tratamento no número de eventos de sangramento maior, estabelecido como desfecho primário de segurança.

O estudo SOCRATES comparou a terapia com ticagrelor versus aspirina por 90 dias em pacientes que apresentaram uma isquemia cerebral aguda, na prevenção de novos eventos cardiovasculares: AVCs, IAM e morte. Houve ligeira redução de eventos no grupo que recebeu ticagrelor, mas não houve significância estatística e, desta forma, conclui-se que a terapia com ticagrelor não foi superior à aspirina nesta coorte de pacientes¹²⁰.

1.6.3.5 Terapia dupla antiplaquetária: aspirina + antagonista do receptor P2Y₁₂

A terapia dupla antiplaquetária, composta de AAS e um inibidor do receptor purinérgico P2Y₁₂ (clopidogrel, prasugrel, ticagrelor), é recomendada para prevenção secundária de eventos aterotrombóticos em pacientes com síndromes agudas coronarianas ou pacientes recentemente submetidos a uma intervenção coronária percutânea^{107,109}.

A duração da terapia antiplaquetária ainda é motivo de discussão e não está bem determinada. As recomendações atuais das diretrizes de cardiologia são baseadas nos grandes estudos clínicos e nos estudos observacionais. Resultados recentes de pequenos estudos randomizados e meta-análises que incluíram pacientes que receberam stents coronários de nova geração indicaram que o tratamento de curta duração com a terapia dupla tem a mesma eficácia clínica comparado ao tratamento convencional de 1 ano. Entretanto, tais estudos foram considerados de pouca força ou poder e não alteraram o consenso clínico vigente¹²¹.

Os resultados dos estudos DAPT e PEGASUS, grandes estudos que avaliaram a duração da terapia dupla antiplaquetária além de 1 ano após o evento, sugerem que a terapia prolongada para mais de 1 ano sem interrupção com inibidores mais potentes do receptor P2Y₁₂ pode ser vantajosa em pacientes com alto risco de eventos isquêmicos e pouco risco de sangramento. Entretanto, a estratificação destes pacientes

de alto risco pode ser diferente conforme os consensos e a interpretação clínica de cada país ou região do mundo¹²².

Em contrapartida, os investigadores do estudo ARCTIC concluíram que não houve benefício aparente ao prolongar a terapia dupla antiplaquetária para além de 1 ano após implantação do stent farmacológico. Os resultados mostraram que há uma tendência para exacerbação dos riscos ao utilizar tal prática¹²³.

Embora pacientes em terapia dupla antiplaquetária tenham uma melhora no prognóstico de uma forma geral, eles ainda sofrem eventos trombóticos. Uma hipótese largamente explorada relaciona o risco de um novo evento ao nível de inibição plaquetária destes pacientes. Isto é, a proteção prevista pelo AAS e, principalmente, pelo antagonista purinérgico não é suficiente e, por isso, estes pacientes continuam em risco. Entretanto, não houve nenhum benefício na monitorização da função plaquetária *ex vivo* e, conseqüentemente, individualização do tratamento para pacientes em terapia dupla antiplaquetária¹²⁴⁻¹²⁷. Possivelmente tal fracasso se dá, pois os testes *ex vivo* comumente usados não consideram o ambiente em que as plaquetas residem *in vivo*.

1.6.4 O endotélio como fator determinante para inibição plaquetária

O NO e a PGI₂ são autacóides derivados do endotélio constantemente liberados na circulação, reduzindo a reatividade plaquetária e prevenindo ativação plaquetária inapropriada^{128,129}.

O NO difunde-se nas plaquetas ativando a enzima guanilato ciclase (GC), aumentando os níveis de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)¹³⁰, enquanto a PGI₂ se liga aos receptores IP ativando a enzima adenilato ciclase (AC) aumentando os níveis intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc)¹³¹. O aumento nos níveis intracelulares destes nucleotídeos cíclicos individuais promove inibição da função plaquetária¹³² e as duas vias em sinergia produzem robusta inibição plaquetária¹²⁹. Óxido nítrico e PGI₂ individualmente também entram em sinergia com antagonistas purinérgicos resultando em inibição generalizada dos efeitos de agregação plaquetária^{101,133}.

Desta forma, entende-se que a reatividade plaquetária de pacientes em terapia com um antagonista purinérgico somente ou em combinação com AAS é uma função do nível do bloqueio do receptor $P2Y_{12}$ e dos níveis de NO e PGI_2 derivados do endotélio. Com isso, explicam-se os diferentes desfechos de eventos trombóticos em pacientes com nível similar de inibição plaquetária, isto é, pacientes com diferentes níveis de função endotelial, ou em disfunção endotelial, teriam diferentes níveis de inibição plaquetária *in vivo*, mesmo apresentando o mesmo nível de inibição plaquetária determinada por testes *ex vivo*¹³⁴.

Sendo assim, uma nova abordagem para terapia antitrombótica constituiria do aumento da disponibilidade e/ou atividade dos nucleotídeos cíclicos através de ferramentas farmacológicas. Encaixam-se neste perfil os fármacos moduladores alostéricos da GC independentes de NO e os inibidores da enzima fosfodiesterase (PDE), enzima esta responsável pela quebra dos nucleotídeos cíclicos intracelulares.

1.6.5 A enzima guanilato ciclase como alvo na terapia antitrombótica

O sistema de transdução de sinal NO/GC/GMPc está presente em quase todos os órgãos e, conseqüentemente, está envolvido em uma miríade de funções fisiológicas. Tal fato está bem caracterizado no sistema cardiovascular onde a produção de GMPc acionada pelo NO tem função citoprotetora e anti-aterogênica, incluindo vasodilatação, inibição da produção de células musculares lisas, bloqueio de recrutamento de leucócitos e ação antiplaquetária. Da mesma forma, a sinalização disfuncional mediada pela GC é fundamental para etiologia de várias patologias, tais como hipertensão, aterosclerose e sepse¹³⁵.

Os moduladores alostéricos da GC independentes de NO foram desenvolvidos como uma importante ferramenta para elucidar a fisiopatologia da via de sinalização NO-GMPc. Tais fármacos foram fundamentais para a elucidação do mecanismo de regulação redox da enzima, sendo o possível elo para a patogênese de várias doenças cardiovasculares.

Estão divididos em 2 classes: os estimuladores da GC, os quais requerem a presença do grupo heme reduzido (Fe^{2+}) acoplado a GC para ativação da enzima e os ativadores da GC, os quais induzem a ativação quando o grupo heme está em seu estado oxidado (Fe^{3+}) ou, preferencialmente, quando está desacoplado¹³⁶⁻¹⁴⁰.

1.6.5.1 Estimuladores da guanilato ciclase

Dentre os estimuladores destacam-se os compostos BAY 41-2272 e BAY 63-2521 (riociguat). Houve diminuição da pressão arterial e aumento no tempo de sobrevivência de ratos hipertensivos em tratamento com estes fármacos^{141,142}. O BAY 41-2272 também reverteu complicações cardiovasculares associadas à hipertensão (hipertrofia cardíaca e fibrose) em modelos murinos^{141,143,144}. A estimulação farmacológica da GC também se mostrou promissora para pacientes com hipertensão pulmonar que não tiveram resposta à terapia com sildenafil, indicando que a produção endógena destes pacientes é reduzida a tal nível que a inibição da degradação de GMPc não apresenta nenhum benefício clínico¹⁴⁵. A estimulação da guanilato ciclase solúvel promoveu vasodilatação pulmonar, aumentou a resposta ao NO inalado e atenuou a hipertrofia do ventrículo direito em modelos ovinos e caninos de hipertensão pulmonar¹⁴⁶⁻¹⁴⁹.

O BAY 41-2272 também promoveu vasodilatação em um modelo canino de embolia pulmonar. O uso destas ferramentas farmacológicas mostrou-se favorável não só a reversão das mudanças hemodinâmicas na vasculatura pulmonar, mas também impedindo o remodelamento vascular que ocorre na hipertensão pulmonar^{150,151}. Este fármaco também demonstrou atividade antiplaquetária in vitro, além de uma possível sinergia com doadores de óxido nítrico e prostaciclina, porém falhou em inibir a formação do trombo em um modelo de trombose induzida em camundongos¹⁵².

O riociguat apresenta um perfil de segurança favorável e foi bem tolerado por voluntários saudáveis¹⁵³. Demonstrou-se maior eficácia terapêutica em um estudo de prova de conceito em pacientes com hipertensão arterial pulmonar. Posteriormente, a terapia oral com riociguat diminuiu a resistência vascular pulmonar e aumentou o débito cardíaco a um nível significativamente maior quando comparado a NO inalado¹⁵⁴. Nos estudos subsequentes o riociguat demonstrou resultados favoráveis em estudos fase II

e II e recentemente foi aprovado pelo FDA para o tratamento de hipertensão pulmonar tromboembólica crônica e hipertensão pulmonar arterial.

Investigou-se recentemente uma possível propriedade anti-plaquetária do riociguat através de um estudo clínico randomizado, aberto, cruzado no qual 18 indivíduos saudáveis do sexo masculino receberam aspirina 500 mg, riociguat 2.5 mg e aspirina 500 mg + riociguat 2.5 mg. O estudo visava estabelecer possíveis interações farmacodinâmicas e farmacocinéticas entre os 2 fármacos. Riociguat por si só não alterou o tempo de sangramento, agregação plaquetária e níveis de TXB_2 sérico, produto de degradação do TXA_2 . Além disso, a administração concomitante de riociguat não alterou os efeitos da aspirina em tais parâmetros. Nenhum evento adverso sério foi registrado durante o estudo. Desta forma, conclui-se que nesta dose, o riociguat não apresenta nenhum efeito na função plaquetária, seja sozinho ou em associação a aspirina¹⁵⁵.

1.6.5.2 Ativadores da guanilato ciclase

Os ativadores da GC são representados pelo BAY 60-2770 e BAY 58-2667 (cinaciguat). Em modelos caninos e ovinos de hipertensão pulmonar, a administração de cinaciguat por via oral e inalatória produziu vasodilatação sem efeito significativo na pressão arterial média^{146,149}. O tratamento com cinaciguat também demonstrou potencial terapêutico para o tratamento de insuficiência cardíaca em estudos pré-clínicos. O uso de fármacos estimuladores da formação de GMPc no tratamento de insuficiência cardíaca tem sido usado há mais de um século e os nitratos doadores de NO compõe o principal tratamento para angina de peito¹⁵⁶.

Dois estudos clínicos fase I avaliaram a segurança, tolerabilidade e farmacocinética do cinaciguat administrado por via intravenosa. Em um estudo foram avaliados indivíduos saudáveis e, no outro, indivíduos com a função hepática prejudicada. O cinaciguat foi bem tolerado e teve um perfil de segurança favorável em ambos os estudos. Dentre algumas propriedades observadas, constatou-se efeito dose-dependente na pressão sanguínea diastólica, pressão arterial média e frequência sanguínea e diminuição da pré-carga e pós-carga^{157,158}.

Em um primeiro estudo fase II, não-randomizado, aberto e multicêntrico avaliaram-se doses diferentes de cinaciguat intravenoso em pacientes com insuficiência cardíaca aguda descompensada. A infusão contínua foi bem tolerada e induziu potente dilatação arterial e venosa melhorando o índice cardiotorácico. O tratamento com cinaciguat resultou em reduções no valor basal na pressão capilar pulmonar, pressão do átrio direito e na resistência vascular pulmonar e sistêmica, além de aumento no débito cardíaco. Além disso, a proporção de pacientes que responderam à terapia foi de 90% e não houve evidência de taquifilaxia¹⁵⁹.

O programa COMPOSE investigou a eficácia e segurança de doses baixas e fixas de cinaciguat intravenoso associado a terapia convencional em 84 pacientes adultos hospitalizados com síndrome agudas decorrentes de insuficiência cardíaca. O tratamento com cinaciguat reduziu a pressão capilar pulmonar comparado ao placebo, mas não alterou significativamente o índice cardiotorácico. Não houve diferença substancial no escore de dispneia entre os pacientes que receberam placebo ou cinaciguat. O programa COMPOSE foi encerrado prematuramente devido a um excesso de eventos de hipotensão não fatal e dificuldades no recrutamento de pacientes¹⁶⁰.

Avaliou-se o tratamento com cinaciguat em outro estudo randomizado, placebo-controlado, onde foram randomizados 148 pacientes com insuficiência cardíaca aguda descompensada. Noventa e sete pacientes receberam cinaciguat enquanto 51 receberam placebo. O estudo alcançou o desfecho primário clínico e medidas hemodinâmicas exploratórias secundárias revelaram redução na pressão capilar pulmonar. Houve diminuição substancial da pressão do átrio direito sugerindo que cinaciguat causou vasodilatação arterial e venosa. Entretanto, houve alta incidência de eventos hipotensivos que requereram tratamento em todas as doses estudadas, exceto 50-100 µg/h. É possível que tenha ocorrido um efeito sinérgico ou aditivo devido ao uso concomitante de diuréticos e outros hipotensores. Nota-se também que tais episódios ocorreram mesmo que o protocolo permitia mudanças na terapia concomitante. Não houve diferença no escore de dispneia entre os tratamentos¹⁶¹.

1.6.6 Inibidores da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$

A integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ é um receptor plaquetário específico, identificado como um alvo terapêutico na prevenção de doenças cardiovascular isquêmicas devido ao seu papel crucial na formação do trombo, sendo um elemento comum em várias cascatas de sinalização que levam a agregação plaquetária conforme previamente descrito¹⁶². A inibição deste receptor reduz a formação de trombina devido ao menor número de plaquetas presentes no trombo e, conseqüentemente, menor grau de ativação plaquetária e liberação de FVa^{163,164}. Pacientes que possuem trombastenia de Glanzmann apresentam alguma mutação genética seja na unidade α_{IIb} ou β_3 do receptor resultando em agregação plaquetária extremamente reduzida ou ausente¹⁶⁵.

Três fármacos antagonistas da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ foram aprovados pelo FDA até o momento: abciximab, eptifibatide e tirofiban. Todos os 3 são administrados por via intravenosa.

O abciximab é um anticorpo monoclonal quimérico humano/camundongo que bloqueia irreversivelmente todo receptor da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ com grande afinidade (1-5 nM), inibindo a ligação do fibrinogênio com a plaqueta. Ele tem uma meia-vida curta (30 minutos) e grande afinidade pelo receptor tanto na forma ativa quanto inativa, resultando em longa ação farmacodinâmica¹⁶³.

Através dos estudos EPIC e EPILOG, observou-se benefício em pacientes de alto risco que seriam submetidos à intervenção coronária percutânea e administraram abciximab em bolus, em associação a heparina de baixa dose e aspirina. Para desfecho composto (morte, IAM e evento isquêmico recorrente), houve 35% de redução do risco para o grupo que recebeu abciximab + heparina, comparado a heparina somente, e 56% de redução do risco no grupo que recebeu abciximab + aspirina, em comparação a aspirina somente. Houve maior prevalência significativa do número de sangramentos no estudo EPIC no grupo que recebeu abciximab, entretanto este padrão não foi observado no estudo EPILOG¹⁶⁶.

No estudo CAPTURE, houve benefício no tratamento com abciximab comparado a placebo no desfecho composto de morte, IAM e revascularização secundária, em pacientes com angina refratária que foram submetidos à intervenção coronária

percutânea. Esse benefício foi observado apenas nos primeiros 30 dias após a intervenção. Após 6 meses, o risco foi o mesmo para ambos os tratamentos¹⁶⁷.

Subsequentemente foram desenvolvidos outros fármacos com ação sobre integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$: o heptapeptídeo eptifibatide, um fármaco relacionado a barburina – composto encontrado no veneno de cobra – que age como um inibidor competitivo da integrina pois possui uma sequência peptídica semelhante ao do fibrinogênio; e o tirofiban, um não-peptídeo desenhado para inibir seletivamente a integrina. Estes fármacos são moléculas menores que têm menor afinidade de ligação e efeito biológico mais curto (2-4h), com excreção renal predominante¹⁶⁸.

No contexto de uma síndrome aguda coronariana, o benefício de uma reperfusão com a intervenção coronária percutânea é contrabalaceando com o risco de trombose coronária e microembolização distal. No final dos anos 90 e início do anos 2000, as evidências com a introdução dos inibidores da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ indicavam redução no risco de complicação isquêmica e benefício claro na intervenção coronária percutânea no infarto com elevação do segmento ST^{167,169} ou não¹⁷⁰⁻¹⁷³.

Após uma década da introdução destes fármacos e com a disseminação do uso de tienopiridinas antes da intervenção coronária percutânea, a eficácia dos inibidores da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ não é tão evidente, sendo demonstrada claramente somente em cenários de alto-risco³. As diretrizes atuais para intervenção coronária percutânea em ambos os tipos de infarto recomendam o uso destes fármacos somente em situações de complicações trombóticas, como estratégia de resgate, e ainda classificam tal prática como nível C de evidência, ou seja, ausente de estudo clínico randomizado que confirme tal benefício¹⁷⁴.

O rebaixamento da recomendação destes fármacos em situações de IAM foi sustentado pelos resultados do estudo FINESSE¹⁷⁵ no qual pacientes que seriam submetidos a uma intervenção coronária percutânea primária foram randomizados a 3 estratégias: abciximab iniciado no serviço de emergência (“upstream”), abciximab iniciado no laboratório de cateterismo (“downstream”) e uma terapia combinada composta de abciximab e meia dose de reteplase (“combo”). Apesar de um braço de

ICP puro não ter sido incluído, os resultados mostraram maiores taxas de sangramento tanto na estratégia upstream e combo, comparado a downstream, enquanto não houve nenhuma evidência clínica que sustentasse a administração prematura ou tratamento antitrombótico agressivo.

O estudo BRAVE-3¹⁷⁶ também mostrou que a administração prematura de abciximab não diminui o tamanho do infarto em pacientes com IAM com elevação do segmento ST que receberam 600 mg de clopidogrel. Entretanto, o estudo On-TIME 2 que avaliou o uso de tirofiban pré-hospitalar, mostrou melhora na resolução do supradesnivelamento do segmento ST após 1 hora da ICP ao comparar com um grupo que recebeu placebo.

Teorias conflitantes ainda questionam se a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ é um bom alvo para a terapia antiplaquetária. Uma vez que estes fármacos podem se ligar à integrina na sua forma inativa, isto poderia levar a uma mudança de conformação culminando em uma sinalização de fora para dentro resultando em ativação e liberação dos grânulos plaquetários. Atualmente, visa-se a descoberta por novas moléculas que atuem como inibidores alostéricos, evitando o desencadeamento da sinalização de fora pra dentro¹⁷⁷.

1.6.7 Antagonistas do receptor PAR-1

As plaquetas humanas apresentam dois receptores para trombina, PAR-1 e PAR-4, os quais tem afinidade diferente pela trombina e estão envolvidos em diferentes em cascatas celulares de sinalização. A ativação de PAR-1 por trombina, mesmo em baixas concentrações, leva a uma forte ativação plaquetária. Em contrapartida, a afinidade de trombina por PAR-4 é de 150 a 300 vezes menor¹⁷⁸. Sendo assim, o receptor PAR-1 é um interessante alvo para a terapia anti-plaquetária, evitando a agregação plaquetária mediada por trombina. O vorapaxar e o atopaxar são representantes desta classe.

Para o estudo TRA 2°P-TIMI 50, foram recrutados pacientes que tinham histórico de IAM, AVCI ou doença vascular periférica. Estes foram randomizados para receber

vorapaxar ou placebo e acompanhados por uma média de 30 meses. Dentre esses pacientes, mais de 80% estava em tratamento concomitante com aspirina, sendo que no grupo que teve um IAM prévio mais de 80% também estava em tratamento com uma tienopiridina (majoritariamente clopidogrel). Nos subgrupos que tinham IAM prévio e doença vascular periférica como histórico houve benefício na terapia com vorapaxar em adição ao tratamento convencional, comparado a placebo. Entretanto houve um significativo aumento de sangramentos e a terapia foi interrompida após 2 anos no subgrupo que teve um AVC prévio ao estudo, devido a eventos de sangramento intracraniano^{179,180}.

Baseado nestes resultados favoráveis, o vorapaxar foi o primeiro antagonista PAR-1 aprovado pelo FDA e é indicado na prevenção secundária de eventos cardiovasculares em pacientes tiveram um IAM ou DVP prévia, associado à aspirina ou clopidogrel.

1.6.8 Inibidores da fosfodiesterase

Os inibidores de fosfodiesterases estão disponíveis comercialmente desde os anos 60, mas não como terapia antiplaquetária desde então. Fosfodiesterases estão expressas em vários tecidos, inclusive nas plaquetas e, desta forma, estes fármacos tem amplo espectro de ação¹⁸¹.

As plaquetas humanas expressam PDE-2, PDE-3 e PDE-5¹⁸² e dois inibidores das PDEs já foram usados na clínica, seja em monoterapia ou em combinação com outros agentes anti-plaquetários: cilostazol, o qual inibe especificamente a PDE-3 (AMPc específica) e o dipiridamol, que inibe a PDE-3 e a PDE-5 (GMPc específica)¹⁸³.

Em estudos clínicos, o tratamento com cilostazol demonstrou eficácia na prevenção da recorrência de eventos trombóticos sem aumento do risco de sangramento¹⁸⁴. Além disso, a combinação de cilostazol, clopidogrel e AAS reduziu a taxa de restenose após intervenção coronária percutânea em comparação a placebo^{185,186}.

Uma análise incluindo 27 estudos clínicos concluiu que dipiridamol sozinho ou em combinação com outros fármacos antiplaquetários reduziu o risco de eventos isquêmicos transientes, principalmente em pacientes com histórico de AVC, mas não diminuiu o risco de morte por causa vascular¹⁸⁷.

Em comparação a AAS somente, a combinação de dipiridamol e AAS demonstrou menor risco relativo na prevenção de AVCs (estudos ESPS2, ESPRIT)^{188,189}. A combinação de AAS e dipiridamol também foi testada na prevenção da recorrência de AVC, em um estudo de não inferioridade (PRoFESS). O grupo que recebeu dipiridamol + AAS não alcançou o critério predefinido para a não inferioridade, mas teve resultados similares ao grupo randomizado para clopidogrel¹⁹⁰.

Atualmente, dipiridamol é recomendado para prevenção secundária de pacientes que tiveram um evento isquêmico transiente e que tem intolerância ou alguma contraindicação aos antagonistas purinérgicos.

Entretanto, pacientes em terapia com inibidores da PDE frequentemente apresentam náusea e dor de cabeça devido aos efeitos de vasodilatação promovido por estes fármacos. Devido à distribuição sistêmica das vias do GMPc/AMPc/PDE, podem ocorrer eventos adversos ao tentar modulá-la em tecidos específicos, assim como descrito acima nos estudos com estimuladores e ativadores da GC. Tais eventos podem comprometer a aderência à terapia.

Desta forma, supõe-se que na presença de um antagonista purinérgico, os moduladores da GC administrados em baixas doses, com ou sem um inibidor da PDE também em baixa dose, podem produzir efeitos localizados e pronunciados de inibição plaquetária devido a sinergia já comprovada entre a inibição do receptor P2Y₁₂ e as vias de formação do GMPc e AMPc, minimizando assim a ocorrência de eventos adversos indesejáveis.

2 OBJETIVOS

- Examinar uma possível sinergia entre fármacos moduladores da enzima guanilato ciclase na presença ou ausência de um inibidor da fosfodiesterase, associados a antagonistas purinérgicos e em concentrações subótimas, como inibidores da função plaquetária. Foram realizados experimentos *in vitro* com sangue de voluntários sadios utilizando as técnicas de agregometria por transmissão de luz, agregometria na placa de 96 poços, agregometria de sangue total por separação de células ativadas por fluorescência, quantificação de nucleotídeos cíclicos e adesão plaquetária sob fluxo.
- Confirmar se esta sinergia também ocorre em um ambiente *in vivo*. Avaliar as novas abordagens terapêuticas propostas através do modelo de indução de trombose com FeCl_3 em camundongo e testes de função plaquetária *ex vivo* em camundongos pré-tratados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de sangue de voluntários sadios

A coleta de sangue foi aprovada pelo Comitê de Ética do Hospital St. Thomas (Londres/Reino Unido), número de referência 004992. Os voluntários se apresentaram ao laboratório e assinaram um termo de consentimento. Posteriormente, passaram por uma triagem que incluía um questionário médico e um exame físico com medida de pressão arterial, frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura corpórea. Voluntários fumantes e que administraram alguma medicação que poderia afetar a função plaquetária eram automaticamente excluídos. Foram recrutados voluntários considerados sadios, de ambos os sexos e com idade acima de 18 anos e até 40 anos.

Até 100 ml de sangue foi retirado de cada voluntário com uma seringa de plástico 50 ml contendo 10 ml de citrato de sódio 3.2% usando uma agulha borboleta pela veia cubital média. A concentração final de citrato de sódio no sangue foi de 0.32%.

3.2 Preparação do plasma rico em plaquetas (PRP) e do plasma pobre em plaquetas (PPP)

O sangue total contendo citrato foi transferido para tubos falcon de 15 ml e centrifugado a 175 g por 15 minutos em temperatura ambiente. Visando prevenir que o PRP se misture a fração vermelha depositada no fundo do tubo, a desaceleração da centrífuga era lenta. O PRP foi aspirado e transferido para um novo tubo. O PPP foi obtido por centrifugação da fração vermelha a 1300 g por 2 minutos. A fração superior translúcida constitui-se do PPP e foi transferida para um novo tubo.

3.3 Preparação dos agonistas plaquetários.

Adenosina difosfato (ADP), peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP-6), o agonista do receptor PAR-4 AYPGKF e o peptídeo mimético de tromboxano U46619 foram todos diluídos em tampão fosfato e armazenados a -20 °C em concentração 1

mM. Colágeno tipo I (Horm collagen) foi fornecido em concentração 1 mg/ml e diluído em glicose isotônica na concentração desejada. Ácido araquidônico foi diluído em etanol 100% para 100 mM e armazenado a -20 °C. Posteriormente foi diluído em tampão fosfato contendo 0.1% de ácido ascórbico para a concentração desejada. Todos os agonistas foram preparados pelo menos 10 e no máximo 100 vezes mais concentrados que a concentração final requerida no protocolo experimental.

3.4 Preparação dos mediadores endoteliais.

O doador de óxido nítrico dietilamina NONOato (DEA/NONOato) e o análogo estável de PGI₂ epoprostanol foram usados visando investigar a sinergia com os inibidores do receptor purinérgico P2Y₁₂ e os moduladores da GC. O DEA/NONOato foi mantido em estoque a 100 mM em tampão fosfato e diluído em NaOH 0.01 M para a concentração desejada. O epoprostanol foi diluído em etanol 100% e mantido em estoque a 1 mg/ml. Posteriormente foi diluído em NaOH 0.01 M para a concentração desejada.

3.5 Preparação dos inibidores e tratamento do sangue total e PRP.

Para inibição do receptor purinérgico P2Y₁₂ plaquetário foram utilizados o metabólito ativo do prasugrel (PAM) e o metabólito ativo do ticagrelor (TAM). Estes foram mantidos em alíquotas a -80 °C, em concentração 10 mM, diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). Para o tratamento de sangue total e PRP, diluía-se esta alíquota para uma concentração pelo menos 200 vezes maior que a desejada, visando não extrapolar a concentração de 0.5% de DMSO, e o volume de PRP ou sangue total foram incubados por 20 minutos e 37 °C, antes do experimento.

Os moduladores da enzima guanilato ciclase BAY 41-2272, BAY 60-2770 e BAY 58-2667 (cinaciguat) foram diluídos em DMSO e mantidos em alíquotas a -20 °C em concentração 10 mM. Estas alíquotas foram diluídas em água destilada e o sangue total ou PRP foi tratado por 10 minutos e 37 °C.

Dipiridamol foi diluído inicialmente em DMSO a 10 mM e posteriormente em tampão fosfato-salino (PBS). Foi adicionado ao sangue total ou PRP e mantido a 37 °C por 10 minutos.

3.6 Agregometria por transmissão de luz.

A agregometria por transmissão de luz é usada há mais de 50 anos e é a principal ferramenta para medida de testes de agregação plaquetária. Foi desenvolvida por Gustav Born nos anos 60 e se fundamenta na diferença da densidade óptica em resposta a um estímulo, após agregação plaquetária em uma suspensão turva rica em plaquetas. Caso haja agregação após o estímulo, mais luz passará por aquela suspensão plaquetária¹⁹¹.

Os testes de agregação plaquetária foram realizados utilizando um agregômetro de 8 canais PAP-8E (Bio/Data Corporation). Antes de cada medida de resposta plaquetária, cada canal foi calibrado com 225 µL do PPP + 25 µL de PBS. Para medida da agregação, 225 µL de PRP foi transferido para cuvetas de vidro contendo um agitador magnético siliconizado e mantido por 2 minutos a 37 °C para estabilização da temperatura. Posteriormente, 25 µL do agonista (10 x mais concentrado) é adicionado e a resposta plaquetária foi medida por 7 minutos, em agitação constante a 1200 rpm e 37 °C. Mudanças na densidade óptica foram gravadas e o valor final de agregação foi usado para criar gráficos e tabelas.

3.7 Agregometria por transmissão de luz na placa de 96 poços.

O método de agregometria por transmissão de luz em 96 poços é uma modificação ao método tradicional. A principal vantagem é que se utiliza menor volume de PRP e menor volume de agonistas/inibidores para cada experimento. Assim como na agregometria tradicional, estimula-se um volume de PRP com um agonista e a porcentagem de agregação é medida através da transmitância de luz para cada poço após 5 minutos em agitação a 1200 rpm e 37 °C. O agitador da placa utilizado foi o Bioshaker IQ e a leitura de absorbância é feita em um leitor Tecan Sunrise (Tecan Trading AG, Switzerland) a 595 nm.

O agregômetro em que foi desenvolvido este trabalho tem 8 canais. Com isso, é possível fazer 8 testes para cada rodada, variando a concentração e/ou o tipo de inibidores e agonistas. Na placa de 96 poços pode-se fazer até 94 combinações diferentes, pois pelo menos um poço deve ser usado para controle do PRP (0% agregação/mínima transmitância) e outra para o PPP (100% agregação/máxima transmitância) – valores utilizados para cálculo da porcentagem de agregação final. No agregômetro, este cálculo de referência é feito automaticamente⁸⁴.

Em experimentos utilizando somente agonistas e inibidores, adiciona-se previamente o agonista de escolha ou veículo e o PRP pré-tratado com um inibidor ou seu veículo correspondente é adicionado com uma pipeta multicanal. Pelo menos 2 poços de reação são utilizados para o controle de máximo e mínimo de agregação, isto é para experimentos com volume final de 100 μ L, são adicionados 90 μ L de PPP ou PRP mais 10 μ L do veículo correspondente ao agonista de escolha.

Nos experimentos utilizando os mediadores endoteliais, estes são adicionados previamente na placa em concentração 20 vezes maior que a desejada (5 μ L para um volume final de 100 μ L). Então, é adicionado o PRP (90 μ L) e a placa é mantida em agitação por 1 minuto. Posteriormente adiciona-se 5 μ L do agonista 20 vezes mais concentrado.

3.8 Agregometria em sangue total por separação de células ativadas por fluorescência (citometria de fluxo).

Um novo método foi utilizado para medida de agregação plaquetária em sangue total¹⁹². Este consiste basicamente na contagem de plaquetas individuais (não-agregadas) em amostras pré e pós-estímulo.

Em uma placa de 96 poços, adiciona-se 5 μ L do agonista em concentração 10 vezes maior que a desejada. Posteriormente, 45 μ L é adicionado no poço. Varia-se a concentração do agonista e dos inibidores assim como nos outros ensaios de agregação plaquetária. Para referência mínima de agregação plaquetária (0%), adiciona-se 5 μ L de PBS em 45 μ L de sangue em um poço da placa.

A placa é mantida em agitação por 5 minutos a 1000 rpm e 37 °C. Imediatamente após, adiciona-se 150 μ L de uma solução contendo ácido cítrico e dextrose (ACD -

citrato trissódico 6.8 mM, ácido cítrico 3.8 mM, dextrose 5 mM em água destilada) para parar a reação e manter a integridade das células do sangue.

Adiciona-se 10 μ L do anticorpo monoclonal anti-CD61 APC (eBioscience, Hatfield, UK) em concentração 1:25 em solução salina em tubos de acrílico para citometria de fluxo. Este anticorpo liga-se a integrina β_3 e a GPIIIa, a qual tem papel importante na ativação plaquetária e agregação. Caso as plaquetas estejam agregadas, esta glicoproteína estará associada à GPIIb e, neste caso, não se ligará ao anticorpo. Com isso, pode-se determinar a porcentagem de agregação plaquetária naquela amostra de sangue após incubação prévia com inibidor ou veículo e estimulado pelo agonista na concentração de escolha.

Posteriormente, 10 μ L da amostra testada em cada poço são adicionados em cada tubo já contendo o anticorpo e mantido por 20 minutos a 4 °C. Após a incubação, adiciona-se 960 μ L de uma solução fixadora (0,1% dextrose, 0,2% albumina sérica bovina, 0,1% formalina em solução salina) em cada tubo. As amostras foram mantidas a 4 °C até o momento da leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, Oxford, UK). Imediatamente antes da leitura, adicionou-se 20 μ L microesferas de poliestireno (10^4 - Count Bright™ beads), as quais servirão de controle volumétrico para a citometria de fluxo. Realiza-se o cálculo da porcentagem agregação plaquetária em cada poço com base na razão entre o número de hemácias e a quantidade de plaquetas positivas para CD-61.

Figura 3.1 – Diagrama observado no citômetro de fluxo após marcação de plaquetas individuais.

Exemplo de diagrama observado após extração dos dados de citometria de fluxo em uma amostra não estimulada. Nota-se a grande quantidade de plaquetas CD-61 positivas destacadas, ou seja, plaquetas não agregadas.

3.9 Quantificação de nucleotídeos cíclicos

A agregação plaquetária na placa de 96-poços foi realizada normalmente com as combinações de escolha. Após 5 minutos de agitação da placa, as plaquetas foram lisadas com Triton X-100 em concentração final 0,625% e tratadas com isobutilmetilxantina (IBMX) 10 mM visando inibição do grupo de enzimas da família das fosfodiesterases, responsáveis pela degradação dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc.

As concentrações de AMPc e GMPc foram determinadas usando um kit de fluorescência homogênea de tempo determinado (Cisbio International). Trata-se de um imunoensaio que se baseia na competição entre os nucleotídeos cíclicos presentes na amostra e os providenciados pelo fabricante, os quais foram previamente marcados. Ambos competem por um anticorpo marcado por criptato que tem um número limite de sítios de ligação. Se o anticorpo liga-se ao AMPc ou GMPc marcado, este conjugado

emite luz. Como consequência direta, quanto maior a concentração de AMPc ou GMPc presentes na amostra, menor a fluorescência emitida.

3.10 Ensaio de adesão plaquetária em fluxo

O fenômeno de adesão em locais de lesão vascular é fundamental para a função hemostática plaquetária. Esta situação pode ser simulada utilizando câmaras que permitem fluxo sanguíneo dentro de capilares pré-revestidos com substâncias envolvidas no processo de adesão, tais como colágeno, fator von Willebrand e fibrinogênio. Modelando a velocidade do fluxo de sangue, é possível recriar um ambiente que remete a uma veia ou artéria e analisar a deposição plaquetária sob esta superfície adesiva¹⁹³.

Figura 3.2 – Câmara de fluxo usada nos experimentos de adesão plaquetária.

O conector superior está ligado a um tubo Tygon que tem a amostra de sangue na sua ponta. O outro conector está ligado a bomba Harvard na qual se determina a velocidade do fluxo sanguíneo. Usando esta câmara de fluxo pode-se utilizar até 6 combinações diferentes.

No dia anterior ao experimento, a câmara de fluxo (Ibidi μ -slide V10.1) foi pré-injetada com 100 μ l de colágeno 100 μ g/ml em glicose isotônica, utilizando uma seringa de 1 ml e incubada a 37 °C. No dia do experimento, foi perfundido 200 μ l de uma

solução 4% de albumina sérica bovina em cada capilar e a câmara foi mantida a 37 °C por mais 2 horas.

As câmaras de fluxo foram presas à bandeja de um microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TE-2000S. Na saída superior do capilar, conectou-se um tubo Tygon a um reservatório contendo tampão fosfato. Na outra saída, conectou-se um tubo Tygon a uma seringa de 20 ml, a qual estava acoplada a uma bomba Harvard (Harvard Apparatus Ltd, UK). O microscópio foi conectado a uma câmera RT slider CCD (Diagnostic Instruments Inc, USA) que foi controlado em um computador através do software SPOT Advanced (Diagnostic Instruments Inc, USA), o qual também foi utilizado para captura de imagens.

As plaquetas no sangue total foram marcadas usando rodamina ou mepacrina em concentração final 10 μM , diluição 1:100. Após adição do corante, o sangue foi mantido no escuro por 10 minutos antes do início do experimento.

Inicialmente, cada canal foi perfundido com tampão fosfato em uma taxa de cisalhamento de 1000 s^{-1} por 3 minutos para remoção da albumina sérica bovina e eventuais fibrilas de colágeno remanescentes. Posteriormente, o tubo Tygon imerso no tampão fosfato foi removido e imerso no tubo de microcentrifuga contendo a amostra de sangue. Evitou-se formação de bolhas de ar durante essa troca. O sangue foi perfundido por 1000 s^{-1} por 5 minutos. Oito fotos de diferentes áreas do capilar foram tiradas após o término da perfusão.

3.11 Análise de deposição dos trombos

Utilizando o software ImageJ (NIH, USA) quantificou-se o tamanho dos agregados nas imagens captadas pós-perfusão. Para cada corrida no capilar, ou seja, para cada combinação de fármacos ou veículo utilizada, as imagens foram compiladas e equalizadas a um limite de aproximadamente 95% do sinal de base produzido pelas amostras não tratadas. Posteriormente, o tamanho médio dos agregados foi determinado.

3.12 Modelo de trombose em camundongos

Camundongos C57Bl/6 (selvagens) foram previamente tratados através de injeção intraperitoneal com veículo ou os fármacos na concentração de interesse. Após pelo menos 2 horas, os camundongos foram anestesiados com cetamina e xilazina. Através de uma incisão na pele exatamente em cima da região da artéria carótida, a fáscia do músculo foi dissecada e um segmento da artéria carótida foi exposto. Para simular a formação do processo de trombose *in vivo*, aplicou-se um papel de filtro saturado com uma solução de FeCl_3 (10%) por 3 minutos em contato com a superfície adventícia do vaso e depois removido. O fluxo sanguíneo foi medido utilizando uma sonda Doppler. Considerou-se que houve formação de um trombo oclusivo se houve interrupção do fluxo sanguíneo por 5 minutos e os tempos para oclusão entre os diferentes tratamentos aplicados foram comparados. O experimento foi terminado caso não houve oclusão em 30 minutos. Os experimentos com animais foram aprovados sob a licença PPL 70/8422 em 24 de março de 2015 - Home Office, UK.

3.13 Avaliação *ex vivo* da função plaquetária de camundongos pré-tratados

Camundongos C57Bl/6 (selvagens) foram previamente tratados com veículo, prasugrel (0,3 mg/kg), cinaciguat (0,3 mg/kg) + dipiridamol (2,0 mg/kg) e prasugrel (0,3 mg/kg) + cinaciguat (0,3 mg/kg) + dipiridamol (2,0 mg/kg). Após 2 horas, os animais foram anestesiados com cetamina + xilazina e o sangue foi cuidadosamente retirado com uma seringa contendo hirudina como anticoagulante.

Placas de 96 poços foram pré-preparadas com ácido araquidônico, PAR-4, U46619 e colágeno nas concentrações desejadas. Foram adicionados 40 μL de sangue total em cada um dos poços, além do poço controle que continha somente o veículo de cada agonista. A placa foi mantida em agitação a 1000 rpm por 5 minutos a 37 °C no agitador BioShake IQ. Imediatamente após, adicionou-se 150 μL de ACD para interromper a reação e conservação das células do sangue. A porcentagem de agregação foi determinada através do método de agregação plaquetária em sangue total através citometria de fluxo (descrito na Seção 2.3.8). Somente o anticorpo foi

mudado e, nesta série de experimentos foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-CD41 (eBioscience, Hatfield, UK), um marcador da glicoproteína IIb que identifica plaquetas não-agregadas de camundongo.

3.14 Análise estatística

As análises estatísticas e construção dos gráficos foram realizadas com o software Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, CA). Foram realizadas análises de variância (ANOVA) para comparações estatísticas. O nível de significância foi considerado como $p < 0.05$. Para estimativa da variabilidade entre as médias amostrais foram calculados o desvio padrão (DP) e o erro padrão (EP).

4 RESULTADOS

4.1 Estudos *in vitro* utilizando sangue de voluntários saudáveis

4.1.1 A sinergia entre a inibição purinérgica com o metabólito ativo do prasugrel e moduladores alostéricos da guanilato ciclase.

Através da primeira série de experimentos deste projeto investigou-se se baixas doses de NO e PGI₂, em combinação com os moduladores da GC e o bloqueio parcial do receptor purinérgico com PAM produziram uma efetiva inibição plaquetária (**Figuras 4.1 e 4.2**).

Figura 4.1 – Curvas concentração-resposta ao NO em plaquetas tratadas com PAM, BAY 60-2770 e PGI₂, estimuladas com TRAP-6.

Agregometria na placa de 96 poços. Tratou-se o PRP previamente com PAM 3 μ M ou veículo e/ou BAY 60-2770 10 μ M ou veículo. Na placa de 96 poços adicionaram-se os mediadores endoteliais: NO 30, 100, 300 nM e/ou PGI₂ 0.1, 0.3 1.0; ou veículo. Após isso, adicionou-se o PRP à placa e manteve-se agitação branda por 1 minuto a 37 °C. Posteriormente, adicionou-se TRAP-6 25 μ M e manteve-se agitação por 5 minutos, a 1200 rpm e 37 °C seguida da medida de absorbância. O primeiro ponto a esquerda de cada curva refere-se ao veículo do NO. O gráfico de barras é uma forma alternativa de observar as combinações em que as sinergias estão mais evidentes. Dados apresentados como a média $\pm$ EP dos resultados obtidos para 4 voluntários sadios.

Figura 4.2 – Curvas concentração-resposta ao NO em plaquetas tratadas com PAM, BAY 41-2272 e PGI₂, estimuladas com TRAP-6.

Agregometria na placa de 96 poços. Tratou-se o PRP previamente com PAM 3 μ M ou veículo e/ou BAY 41-2272 10 μ M ou veículo. Na placa de 96 poços adicionaram-se os mediadores endoteliais: NO 30, 100, 300 nM e/ou PGI₂ 0.1, 0.3 1.0; ou veículo. Após isso, adicionou-se o PRP à placa e manteve-se agitação branda por 1 minuto a 37 °C. Posteriormente, adicionou-se TRAP-6 25 μ M e manteve-se agitação por 5 minutos, a 1200 rpm e 37 °C seguida da medida de absorbância. O primeiro ponto a esquerda de cada curva refere-se ao veículo do NO. O gráfico de barras é uma forma alternativa de observar as combinações em que as sinergias estão mais evidentes. Dados apresentados como a média $\pm$ EP dos resultados obtidos para 4 voluntários sadios.

Ambos os moduladores da GC tem efeito antiplaquetário. O ativador BAY 60-2770 é mais potente e, quando em combinação com o antagonista purinérgico, há efeito antiplaquetário sinérgico. A adição de baixas concentrações dos mediadores endoteliais potencializa esta propriedade.

Estes experimentos também corroboram outros já realizados onde foi descrita a influência dos mediadores endoteliais na inibição do receptor purinérgico^{101,133}. *In vitro*, a PGI₂ tem maior potência que o NO na inibição da reatividade plaquetária.

Figura 4.3 – Concentração de AMPc plaquetário em resposta a concentrações crescentes de PGI₂ + NO em PRP pré-tratado com PAM e moduladores alostéricos.

Quantificação de AMPc em PRP pré-tratado com PAM 3 µM e os moduladores da GC (BAY 60-2770 e BAY 41-2272 10 µM) em resposta a TRAP-6 25 µM na presença concentrações crescentes de NO e PGI₂ em combinação. Cada ponto representa a média ± EP dos resultados obtidos para 4 voluntários. Combinações testadas: veículo, PGI₂ 0.1 nM + NO 30 nM, PGI₂ 0.1 nM + NO 100 nM, PGI₂ 0.3 nM + NO 30 nM, PGI₂ 0.3 nM + NO 100 nM, PGI₂ 1 nM + NO 30 nM e PGI₂ 1 nM + NO 100 nM.

Em plaquetas pré-tratadas com PAM, há aumento da liberação de AMPc à medida em que se aumentam as concentrações dos mediadores endoteliais. Tal processo ocorre de maneira dose-dependente.

O pré-tratamento com os moduladores da GC potencializa a liberação de AMPc e o aumento nas concentrações de PGI_2 e NO intensifica este efeito. Este experimento está em concordância com a série de experimentos funcionais previamente descritos onde se observou maior potência antiplaquetária pelo ativador BAY 60-2770 em comparação ao estimulador BAY 41-2272, representado aqui por um deslocamento para cima da curva vermelha em comparação com a verde.

Os resultados obtidos na quantificação da liberação plaquetária de GMPc ficaram abaixo da linha de detecção do kit, o que impossibilitou o uso dos mesmos.

Figura 4.4 – Resposta plaquetária ao TRAP-6 em sangue total tratado com veículo e/ou moduladores alostéricos e/ou PAM.

Porcentagem de agregação plaquetária em sangue total obtido através de um método de separação de células ativadas por fluorescência. O sangue total foi previamente tratado com PAM 3 μM , BAY 60-2270 10 μM e BAY 41-2272 10 μM sozinhos ou em combinação. A agregação plaquetária foi estimulada com TRAP-6 25 μM por 5 min, 37 °C e 1200 rpm. Dados representam a média $\pm$ EP dos resultados obtidos com 7 voluntários sadios. O asterisco representa $p < 0.05$ em comparação à PAM e BAY 60-2770 sozinho.

Figura 4.5 – Curvas dose-resposta ao BAY 60-2770 em sangue total estimulado com TRAP-6 e previamente tratado com veículo ou PAM.

Porcentagem de agregação plaquetária em sangue total utilizando o método de separação de células ativadas por fluorescência. O sangue total foi previamente tratado com PAM 3 μM e BAY 60-2270 (0.3, 1, 3, 10, 30 μM) sozinhos ou em combinação. A agregação plaquetária foi estimulada com TRAP-6 25 μM , por 5 minutos, 37 °C e 1200 rpm. Dados representam a média dos resultados obtidos com 2 voluntários saudáveis. A porcentagem de agregação plaquetária em sangue incubado com PAM 3 μM foi de 50% e, desta forma, foi colocada uma linha para referência entre as curvas dose-resposta.

Usando uma técnica que mede a agregação plaquetária por citometria de fluxo, investigou-se o efeito dos moduladores da GC, em combinação com o inibidor do receptor P2Y_{12} no sangue total.

Houve agregação plaquetária após forte estímulo com TRAP-6 em sangue total incubado com os moduladores da GC. O pré-tratamento com PAM e PAM + BAY 41-2272 também não provocou inibição da agregação plaquetária. Em contrapartida, há importante efeito antiplaquetário sinérgico e dose-dependente em sangue total tratado com o ativador da GC BAY 60-2770 e PAM.

Destes resultados, conclui-se que nas mesmas condições de estímulo e concentração de inibição, a combinação entre o ativador da GC e o antagonista purinérgico tem efeito antiplaquetário muito mais pronunciado em sangue total.

Os ativadores da GC são mais potentes em situações na qual o grupo prostético heme está desacoplado da enzima ou oxidado. Sendo assim, foi questionado se o

estado redox da enzima é diferente em PRP e em sangue total. Para tentar responder essa questão, foram feitas curvas dose-resposta do BAY 60-2770, em resposta a TRAP-6, em PRP previamente tratado com ODQ, um inibidor seletivo, irreversível, e que se liga ao sítio de ligação do NO causando oxidação do grupo heme¹⁹⁴.

Figura 4.6 – Curvas dose-resposta ao BAY 60-2770 em PRP estimulado com TRAP-6 e previamente tratado com veículo e/ou PAM e/ou ODQ.

Agregometria na placa de 96 poços. Curvas dose-resposta do BAY 60-2770 (0.1 a 30 μM) na agregação plaquetária em PRP previamente incubado com veículo ou ODQ 20 μM ou PAM 3 μM ou ODQ 20 μM + PAM 3 μM . A agregação plaquetária foi estimulada por TRAP-6 25 μM , por 5 minutos, 37 °C e 1200 rpm. Os dados foram obtidos pela técnica de agregometria em placa de 96 poços. Os pontos representam os valores obtidos em experimento piloto com sangue de um voluntário sadio.

A curva de concentração-resposta do BAY 60-2770 em PRP pré-tratado com ODQ + PAM é semelhante à observada em sangue total incubado com PAM. Em ambos os casos, a inibição da agregação plaquetária induzida por TRAP-6 se comporta de maneira dose-dependente e o BAY 60-2770 é mais potente no PRP tratado com ODQ, seja em combinação com o antagonista purinérgico ou não. Este experimento sustenta os dados previamente publicados mostrando que os ativadores da GC são mais potentes em situações de oxidação ou desacoplamento do grupo heme.

Figura 4.7 – Imagens representativas de plaquetas aderidas a segmentos da câmara de fluxo. Sangue total previamente tratado com veículo, PAM e/ou BAY 60-2770.

Adesão plaquetária em câmara de fluxo. As plaquetas previamente marcadas com mepacrina em sangue total ficam aderidas à câmara de fluxo após perfusão por 5 minutos a 1000 s^{-1} . Para cada tratamento foram capturadas 8 imagens, as quais foram compiladas, analisadas e quantificadas.

Figura 4.8 – Porcentagem da área coberta por plaquetas em uma câmara de fluxo revestida por colágeno. Sangue total previamente tratado com veículo, PAM e/ou BAY 60-2770.

Porcentagem da área coberta por plaquetas em uma câmara de fluxo revestida por colágeno 100 $\mu\text{g/ml}$ após perfusão de sangue total pré-incubado com veículo ou PAM 3 μM ou BAY 60-2770 10 μM ou PAM 3 μM + BAY 60-2770 10 μM . O sangue foi perfundido por 5 minutos a uma taxa de cisalhamento de 1000 s^{-1} . Os gráficos de barra representam a média $\pm$ EP de 4 voluntários saudáveis. O asterisco representa $p < 0.05$ em comparação a BAY 60-2770.

Há menor adesão plaquetária à câmara de fluxo para a amostra de sangue tratada a combinação PAM + BAY 60-2770. Os agregados tendem a ser menores e menos densos, conforme explicitado nas figuras representativas (**Figura 4.7**) e quantificado no gráfico de porcentagem de área coberta por plaquetas no capilar (**Figura 4.8**). Com isso, demonstra-se que a combinação de um ativador da GC e um antagonista purinérgico tem ação inibitória em ambos os processos que levam a formação do trombo: agregação e adesão.

Ao confirmar esta importante propriedade utilizando o BAY 60-2770, decidiu-se reproduzir estes experimentos usando o cinaciguat, o qual também é um ativador da GC desenvolvido pela Bayer e teve perfil de segurança comprovado em testes clínicos fase I, facilitando um possível seguimento destes estudos em humanos.

Figura 4.9 – Curvas concentração-resposta a diferentes moduladores alostéricos da GC em plaquetas estimuladas por TRAP-6. Sangue total previamente tratado com PAM ou veículo.

Porcentagem de agregação plaquetária em sangue total utilizando o método de separação de células ativadas por fluorescência. O sangue total foi previamente tratado com PAM 3 μM + BAY 60-2270 ou BAY 41-2272 ou cinaciguat em concentrações 0.3, 1, 3, 10, 30 μM . A linha preta serve de referência e representa a porcentagem de agregação plaquetária para o sangue total incubado com PAM 3 μM . Estimulou-se a agregação plaquetária com TRAP-6 10 μM , por 5 minutos, 37 °C e 1200 rpm. Os pontos representam os valores obtidos em experimento piloto com sangue de um voluntário sadio.

Figura 4.10 – Resposta plaquetária ao TRAP-6 em sangue total tratado com veículo, PAM e/ou cinaciguat.

Porcentagem de agregação plaquetária em sangue total utilizando o método de separação de células ativadas por fluorescência. O sangue total foi previamente tratado com veículo ou PAM 3 μM ou cinaciguat 10 μM ou PAM 3 μM + cinaciguat 10 μM . A agregação plaquetária foi estimulada com TRAP-6 25 μM , por 5 minutos, 37 °C e 1200 rpm. Dados apresentados como a média $\pm$ EP dos resultados obtidos para 4 voluntários saudáveis. O asterisco representa $p < 0.05$ em comparação a cinaciguat.

Cinaciguat tem potência similar ao BAY 60-2770 na inibição da agregação plaquetária em tratamento combinado com PAM. Assim como observado com BAY 60-2770, esta relação é dose-dependente e se intensifica à medida em que a concentração do cinaciguat aumenta. Não houve diferença na incubação do sangue total com concentrações crescentes do estimulador da GC BAY 41-2272 para PAM sozinho.

Figura 4.11 – Imagens representativas de plaquetas aderidas a segmentos da câmara de fluxo. Sangue total previamente tratado com veículo, PAM e/ou cinaciguat.

Adesão plaquetária em câmara de fluxo. As plaquetas previamente marcadas com mepacrina em sangue total ficam aderidas à câmara de fluxo após perfusão por 5 minutos a 1000 s^{-1} . Para cada tratamento foram capturadas 8 imagens, as quais foram compiladas, analisadas e quantificadas.

Assim como nos ensaios de agregação, o tratamento com cinaciguat + PAM apresenta o mesmo padrão de inibição da adesão já observado com BAY 60-2770 + PAM. Os agregados são menores e menos presentes comparado ao tratamento com veículo, PAM e cinaciguat somente.

Figura 4.12 – Porcentagem da área coberta por plaquetas em uma câmara de fluxo revestida por colágeno. Sangue total previamente tratado com veículo, PAM e/ou cinaciguat.

Porcentagem da área coberta por plaquetas em uma câmara de fluxo pré-revestida por colágeno 100 µg/ml após perfusão de sangue total pré-tratado com veículo ou PAM 3 µM ou cinaciguat 10 µM ou PAM 3 µM + cinaciguat 10 µM. O sangue foi perfundido por 5 minutos a uma taxa de cisalhamento de 1000s⁻¹. Os gráficos de barra representam a média ± EP de 4 voluntários saudáveis.

4.1.2 Estudos *in vitro* da função plaquetária de sangue de voluntários saudáveis utilizando o metabólito ativo do ticagrelor (TAM) como inibidor do receptor purinérgico P2Y₁₂ em associação a cinaciguat e dipiridamol.

A ligação do metabólito ativo do clopidogrel e do prasugrel ao receptor P2Y₁₂ é irreversível e mantém o receptor sem função enquanto aquela plaqueta estiver circulante. Ticagrelor se liga reversivelmente ao receptor P2Y₁₂ em um sítio distinto do local de ligação do ADP, inibindo a sinalização através de uma mudança conformacional do receptor, inativando-o. O receptor retoma sua função após dissociação da molécula do ticagrelor ou do seu metabólito ativo. O ADP ainda consegue se ligar a este sítio e o nível de inibição é dependente da concentração de ticagrelor¹⁹⁵.

Nesta série de experimentos, investigou-se se a sinergia prévia observada entre a inibição purinérgica com o metabólito ativo do prasugrel, ativação da GC e a inibição da PDE também ocorre ao utilizar o metabólito ativo do ticagrelor. Foram reproduzidos os

experimentos *in vitro* com sangue de voluntários saudáveis: agregação plaquetária em sangue total e PRP e adesão em fluxo.

Figura 4.13 – Resposta plaquetária ao TRAP-6 em sangue total tratado com veículo, TAM e/ou cinaciguat e/ou dipiridamol.

Porcentagem de agregação plaquetária final em sangue total obtida por separação de células ativadas por fluorescência. O sangue total foi previamente tratado com veículo, TAM 1 μ M, TAM 1 μ M + dipiridamol 30 μ M, TAM 1 μ M + cinaciguat 10 μ M e TAM 1 μ M + cinaciguat 10 μ M + dipiridamol 30 μ M. A agregação plaquetária foi estimulada com TRAP-6 20 μ M e colágeno 3 μ g/ml, por 5 minutos, 37 °C e 1200 rpm. Dados representam a média $\pm$ EP dos resultados obtidos com 5 voluntários sadios. O asterisco indica $p < 0.05$ em comparação a TAM e TAM + dipiridamol.

Figura 4.14 – Resposta plaquetária ao colágeno em sangue total tratado com veículo, TAM e/ou cinaciguat e/ou dipiridamol.

Porcentagem de agregação plaquetária final em sangue total obtida por separação de células ativadas por fluorescência. O sangue total foi previamente tratado com veículo, TAM 1 μ M, TAM 1 μ M + dipiridamol 30 μ M, TAM 1 μ M + cinaciguat 10 μ M e TAM 1 μ M + cinaciguat 10 μ M + dipiridamol 30 μ M. A agregação plaquetária foi estimulada com colágeno 3 μ g/ml, por 5 minutos, 37 °C e 1200 rpm. Dados representam a média $\pm$ EP dos resultados obtidos com 5 voluntários sadios. O asterisco indica $p < 0.05$.

Principalmente na estimulação com TRAP-6, a combinação de TAM + cinaciguat segue o mesmo padrão observado nos ensaios com PAM. A adição de dipiridamol potencializou a inibição da agregação plaquetária.

Figura 4.15 – Resposta plaquetária ao TRAP-6 e ao colágeno em PRP tratado com veículo, TAM, cinaciguat e dipiridamol em diferentes combinações.

Percentagens de agregação plaquetária final em PRP obtida por agregometria em placa de 96 poços. O PRP foi previamente tratado com veículo, TAM 1 μ M, TAM 1 μ M + dipiridamol 30 μ M, TAM 1 μ M + cinaciguat 10 μ M e TAM 1 μ M + cinaciguat 10 μ M + dipiridamol 30 μ M. A agregação plaquetária foi estimulada com TRAP-6 20 μ M e colágeno 3 μ g/ml, por 5 minutos, 37 °C e 1200 rpm. Dados representam a média $\pm$ EP dos resultados obtidos com 5 voluntários sadios. T = TAM, C = cinaciguat, D = dipiridamol. O asterisco indica $p < 0.05$ em comparação à TAM.

Assim como nos experimentos realizados com PAM, o efeito de inibição da agregação plaquetária em PRP é mais modesto, entretanto está presente. Na estimulação com colágeno, há efeito inibitório importante da combinação tripla.

Figura 4.16 – Imagens representativas de plaquetas aderidas a segmentos da câmara de fluxo. Sangue total previamente tratado com veículo, TAM, cinaciguat + dipiridamol e TAM + cinaciguat + dipiridamol.

Adesão plaquetária em câmara de fluxo. As plaquetas marcadas com rodamina em sangue total foram aderidas à câmara de fluxo após perfusão por 5 minutos a uma taxa de cisalhamento de 1000 s^{-1} . Para cada tratamento, foram capturadas 8 imagens as quais foram compiladas e analisadas e quantificadas no gráfico acima. Nestes experimentos utilizou-se rodamina como corante, pois dipiridamol tem espectro de emissão de fluorescência similar à mepacrina.

Veículo

TAM 1 μM

**cinaciguat 10 μM +
dipiridamol 30 μM**

**TAM 1 μM + cinaciguat 10 μM +
dipiridamol 30 μM**

Figura 4.17 – Porcentagem da área coberta por plaquetas em uma câmara de fluxo revestida por colágeno. Sangue total previamente tratado com veículo, TAM, cinaciguat + dipiridamol e TAM + cinaciguat + dipiridamol.

Porcentagem da área coberta por plaquetas em uma câmara de fluxo pré-revestida por colágeno 100 µg/ml após perfusão de sangue total pré-tratado com veículo, TAM 1 µM, cinaciguat 10 µM + dipiridamol 30 µM e TAM 1 µM + cinaciguat 10 µM + dipiridamol 30 µM. O sangue foi perfundido por 5 minutos a uma taxa de cisalhamento de 1000 s⁻¹. Os gráficos de barra representam a média ± EP de 4 voluntários sadios. O asterisco indica $p < 0.05$ em comparação a TAM.

A tripla combinação mostra um importante efeito anti-adesivo assim como observado com PAM + cinaciguat.

4.2 Estudos *in vivo* utilizando camundongos pré-tratados com antiplaquetários – modelo de trombose induzida por FeCl₃.

Com o objetivo de investigar se o efeito antiplaquetário previamente observado nos experimentos *in vitro* também se replicava *in vivo*, foram realizados experimentos com camundongos. O uso do FeCl₃ como indutor de trombose desde 1940 e este método foi adaptado para o estudo na carótida em 1990. Desde então, este método foi usado em vários estudos devido a sua simplicidade e reprodutibilidade¹⁹⁶. Esta parte do projeto foi realizada com o Dr. Paul Armstrong, responsável por manipular os animais. A contribuição do aluno nessa série de experimentos foi no desenho e preparo dos experimentos, trabalho com o sangue após a retirada e análise dos dados. Para

determinação da dose de prasugrel que seria usada em combinação com cinaciguat no modelo de trombose induzida por FeCl_3 e, posteriormente, nos experimentos com sangue de animais pré-tratados, realizou-se inicialmente um escalonamento de dose do prasugrel usando o modelo de trombose.

Assim como nos experimentos *in vitro*, procurou-se encontrar uma dose que não produzisse inibição trombótica completa, mas que fosse próximo da efetiva, de forma a possibilitar interação com o ativador da GC, caso presente. Portanto, foram realizadas séries de pelo menos 4 animais por dia de experimento, que receberam veículo ou 0.1 mg/kg ou 0.5 mg/kg ou 1 mg/kg de prasugrel.

Figura 4.18 – Relação dose-efeito de prasugrel em modelo de trombose induzida em camundongos.

Camundongos foram tratados com veículo ou prasugrel em diferentes concentrações (0.1, 0.5 e 1 mg/kg) e a artéria carótida de cada animal foi exposta. A aplicação de um papel de filtro saturado com FeCl_3 10% induz a formação de um trombo no local. O fluxo sanguíneo foi monitorado e o tempo para oclusão do vaso foi determinado. O experimento foi terminado caso não houve oclusão em 30 minutos. $N \geq 5$ para cada tratamento.

	Veículo	0.1	0.5	1.0
Média	385.7	555.0	692.5	1650.0
Desvio padrão	136.0	161.6	383.8	335.4
Erro padrão	51.41	72.25	156.7	150.0

Houve oclusão completa em todos os camundongos que receberam veículo e inibição completa com 1.0 mg/kg. Com isso, concluiu-se que o modelo estava funcionando e as injeções sendo efetivas. Não houve inibição da formação do trombo com 0.1 mg/kg e com 0.5 mg/kg observou-se inibição substancial em pelo menos 2 camundongos de 5 testados. Desta forma, determinou-se 0.3 mg/kg como a dose de trabalho.

Figura 4.19 – Efeito do tratamento com veículo, cinaciguat e/ou prasugrel em modelo de trombose induzida em camundongos.

Camundongos foram tratados com veículo ou cinaciguat 0.3 mg/kg ou prasugrel 0.3 mg/kg ou prasugrel 0.3 mg/kg + cinaciguat 0.3 mg/kg e a artéria carótida de cada animal foi exposta. A aplicação de um papel de filtro saturado com FeCl_3 10% induz a formação de um trombo no local. O fluxo sanguíneo foi monitorado e o tempo para oclusão do vaso foi determinado. N > 2 para veículo, cinaciguat e cinaciguat + prasugrel, n = 1 para prasugrel.

	Veículo	Cinaciguat	Prasugrel	Cinaciguat + prasugrel
Média	497.5	450.0	570.0	367.5
Desvio padrão	88.4	84.9	0	53.0
Erro padrão	62.5	60.0	0	37.5

Não houve inibição da formação do trombo tanto com cinaciguat sozinho ou em combinação com prasugrel. Para a próxima série de experimentos, dipiridamol foi

adicionado à combinação, visando evitar a quebra dos nucleotídeos cíclicos pela enzima PDE.

Figura 4.20 – Efeito do tratamento com veículo, prasugrel, cinaciguat + dipiridamol e prasugrel + cinaciguat + dipiridamol em modelo de trombose induzida de camundongos.

Camundongos foram tratados com veículo ou prasugrel 0.3 mg/kg ou cinaciguat 0.3 mg/kg + dipiridamol 2.0 mg/kg ou prasugrel 0.3 mg/kg + cinaciguat 0.3 mg/kg + dipiridamol 2.0 mg/kg e a artéria carótida de cada animal foi exposta. A aplicação de um papel de filtro saturado com FeCl_3 10% induz a formação de um trombo no local. O fluxo sanguíneo foi monitorado e o tempo para oclusão do vaso foi determinado. O experimento foi terminado caso não houve oclusão em 30 minutos. $N \geq 6$ para cada tratamento. O asterisco representa $p < 0.05$ em comparação a prasugrel e dipiridamol + cinaciguat.

	Veículo	Prasugrel	Dipiridamol + cinaciguat	Prasugrel + dipiridamol + cinaciguat
Média	432.5	438.3	482.5	1472.0
Desvio padrão	122.7	212.4	270.1	514.8
Desvio padrão da média	50.1	86.7	110.3	210.1

Conforme descrito anteriormente, os camundongos tratados com veículo e prasugrel 0.3 mg/kg apresentaram oclusão rápida e completa da artéria carótida após indução por FeCl_3 . A combinação de dipiridamol e cinaciguat também não apresentou efeito antitrombótico nesta concentração usada. Entretanto ao combinar prasugrel, cinaciguat e dipiridamol, observamos inibição completa da formação do trombo em 4 de 6 animais testados e 2 obtiveram oclusão parcial tardia.

4.3 Estudos *ex vivo* com sangue de camundongos pré-tratados com os antiplaquetários para avaliação da reatividade plaquetária

Posteriormente, realizou-se um estudo *ex vivo* para avaliação da reatividade plaquetária em sangue total de camundongos que receberam os mesmos tratamentos, nas mesmas concentrações, usadas na série do modelo de indução de trombose com FeCl_3 : veículo, prasugrel, cinaciguat + dipiridamol, prasugrel + cinaciguat + dipiridamol.

As plaquetas foram estimuladas com diferentes agonistas visando abranger diferentes formas de sinalização. Para medir a porcentagem de agregação plaquetária de cada combinação de tratamento, para cada agonista, utilizou-se o método de separação de células ativadas por fluorescências, nas mesmas condições em que foram realizados os experimentos *in vitro* com sangue humano.

Figura 4.21 – Resposta plaquetária a AA, colágeno e AYPGKF em sangue total de camundongos pré-tratados com veículo, prasugrel, cinaciguat + dipiridamol e prasugrel + cinaciguat + dipiridamol.

Resposta plaquetária em sangue total de camundongos tratados com veículo ou prasugrel 0.3 mg/kg ou cinaciguat 0.3 mg/kg + dipiridamol 2.0 mg/kg ou prasugrel 0.3 mg/kg + cinaciguat 0.3 mg/kg + dipiridamol 2.0 mg/kg. A agregação plaquetária foi estimulada com AA 1 mM, colágeno 3 µg/ml e AYPGKF 30 µM, por 5 minutos, 37 °C e 1200 rpm. As plaquetas individuais foram marcadas com o anticorpo monoclonal anti-CD41 (GPIIb, marcador de plaquetas individuais de camundongos) e a porcentagem de agregação final foi determinada através do método de separação de células ativadas por fluorescência. N = 4 para cada tratamento.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que a enzima GC pode ser um alvo na inibição da função plaquetária, tendo consequências diretas para pacientes de alto risco com condições de disfunção endotelial.

Na presença de um antagonista purinérgico, a ativação alostérica da GC nas plaquetas em PRP provoca inibição da agregação plaquetária, sendo o ativador mais potente que o estimulador. Este fenômeno é causado pelo aumento da liberação dos nucleotídeos cíclicos e intensificado de maneira dose-dependente à medida que se aumenta a concentração dos mediadores endoteliais. Estes experimentos corroboram a tese de que a inibição do receptor $P2Y_{12}$ é uma função da liberação dos mediadores endoteliais e a inibição plaquetária se dá através do aumento da concentração de nucleotídeos cíclicos intra-plaquetários^{101,133}.

Conforme previamente descrito, os efeitos de inibição plaquetária promovido pelos moduladores alostéricos da guanilato ciclase e pela ativação com NO são mediados pelo GMPc. O método utilizado para quantificação de nucleotídeos cíclicos na plaqueta não foi sensível para detecção de GMPc, entretanto, foi possível quantificar o AMPc. Observou-se uma relação dose-dependente proporcional à concentração dos mediadores endoteliais e houve maior concentração de AMPc após incubação com o ativador da guanilato ciclase e PAM, combinação de inibidores que também foi mais efetiva nos experimentos de agregação plaquetária, comparado ao ativador e o controle.

Sabe-se que há uma comunicação entre os dois sistemas de formação de nucleotídeos cíclicos e foi sugerido que a formação de GMPc inibe a enzima PDE3, responsável pela degradação de AMPc. Entretanto, todos os experimentos realizados nesta parte do trabalho foram feitos com incubação prévia de IBMX em alta concentração, um inibidor inespecífico da família das fosfodiesterases, visando justamente evitar a quebra desses mediadores para melhor quantificação. Ao todo, existem pelo menos 12 tipos de PDEs descritas e, por ser um inibidor inespecífico, o IBMX tem variação de afinidade para as PDEs. O IC_{50} para inibição da PDE-3 pelo

IBMX é de $15 \mu\text{M}$ ¹⁹⁷, concentração quase 1000x menor do que a usada nos experimentos, e desta forma suficiente para inibição.

Ao comparar os resultados dos experimentos de agregação plaquetária realizados em PRP e em sangue total, sob as mesmas condições de estímulo (tempo de incubação com o inibidor, concentração do agonista, velocidade de agitação e temperatura), notou-se que a combinação de inibidores é muito mais potente em sangue total. Este fenômeno ocorre ao utilizar PAM ou TAM como inibidor do receptor purinérgico e BAY 60-2770 ou cinaciguat como ativador da GC.

A oxidação do grupo heme prostético da GC leva a uma conformação mais favorável para ligação dos ativadores da GC em seu sítio de ligação¹⁹⁸. Os resultados obtidos nos experimentos com ODQ sugerem que pode haver diferença no estado redox da enzima em sangue total e em PRP.

Uma possível explicação para este fenômeno seria devido à formação de espécies reativas de oxigênio por fontes presentes no sangue total que não estariam em PRP. Como o sangue está fora da circulação não há reciclagem destas moléculas, as quais promoveriam oxidação da enzima. Consequentemente, no PRP haveria maior proporção da enzima com o grupamento heme reduzido, uma vez que toda a fração vermelha foi retirada após centrifugação do sangue total. Nesta condição, os ativadores da GC teriam menor potência, conforme observado.

O stress oxidativo é um fator de risco importante no desenvolvimento das doenças cardiovasculares. As espécies reativas de oxigênio agem desacoplando a enzima óxido nítrico sintase resultando na produção do íon superóxido, o qual tem alta afinidade por NO e, consequentemente, limita sua biodisponibilidade. Além disso, o stress oxidativo interfere na sensibilidade da GC pelo NO desacoplando as unidades α e β da enzima, as quais são necessárias estarem juntas para formação do GMPc, de conhecidas propriedades órgão-protetoras. A enzima na sua forma desacoplada se mantém ativa, mas está suscetível a degradação ativa através da via da ubiquitina-proteossoma¹⁹⁹⁻²⁰².

Conforme previamente descrito e também demonstrado nos experimentos com ODQ, a seletividade do cinaciguat em situações em que há fração majoritária da enzima

em sua forma desacoplada pode ser duplamente benéfica: selecionando órgãos doentes ou situações patológicas agudas e limitando a ação do fármaco em locais saudáveis onde a enzima encontra-se em perfeito funcionamento, diminuindo possíveis eventos adversos.

Desta forma, o potencial de aplicação clínica para a combinação de fármacos proposta neste trabalho beneficiaria pacientes em que a condição fisiopatológica implica em disfunção endotelial, stress oxidativo e, conseqüentemente, desacoplamento da enzima. Pacientes com doença arterial coronariana e doença vascular periférica geralmente apresentam disfunção endotelial. A relação entre tal condição e aumento da reatividade plaquetária é bem conhecida^{132,203} e, como mencionado acima, a terapia antitrombótica é recomendada na prevenção secundária de eventos isquêmicos. Sendo assim, tais indivíduos podem ser diretamente beneficiados por esta estratégia farmacológica localizada, visando diminuição da reatividade plaquetária e poucos efeitos sistêmicos.

A hemoglobina tem alta afinidade pelo óxido nítrico e desta forma age inibindo a ligação de óxido nítrico ao seu sítio de ligação na GC²⁰⁴. Com isso, no sangue total, a ativação alostérica provocada pelo cinaciguat seria facilitada e, desta forma, inibiria a ativação plaquetária de forma mais eficiente. Entretanto, para produção do PRP é necessário centrifugar os tubos contendo o sangue e este processo leva em média 20 minutos, sendo tempo suficiente para sequestrar todo NO presente.

A combinação de prasugrel e cinaciguat produziu forte inibição da função plaquetária nos experimentos *in vitro*, principalmente na agregação em sangue total e adesão em fluxo, porém não foi suficiente para inibição da formação do trombo no modelo de trombose em camundongos. As doses dos fármacos empregadas podem ter sido insuficientes para replicar os achados dos experimentos *in vitro*.

Outra possível explicação seria que a família das fosfodiesterases está constantemente reciclando os nucleotídeos cíclicos formados e, por alguma razão, sua atividade pode estar diminuída *in vitro*. Ao adicionar o dipiridamol, inibidor da PDE-3, observou-se forte inibição da formação do trombo *in vivo*.

Contrário ao observado *in vivo*, a adição de dipiridamol à PAM/TAM + cinaciguat nos experimentos *in vitro* teve um efeito modesto ou inexistente, tanto nos experimentos de agregação plaquetária quanto na adesão sob fluxo. Um mecanismo comum em células vivas é que uma vez que o substrato é aumentado, há transcrição enzimática para suprir a demanda através de retroalimentação positiva. Entretanto, as plaquetas não têm núcleo e, desta forma, não há maquinário celular para transcrição de novas enzimas. A duração dos experimentos não ultrapassou 4 horas e a formação de novas plaquetas (não inibidas) durante esse intervalo não seria suficiente para desencadear a formação do trombo tão facilmente após o estímulo com FeCl_3 .

Os experimentos *in vivo* foram feitos em camundongo e a parte *in vitro* foi feita com sangue humano. O sistema AMPc/GMPc/GC/PDE pode ser diferente nestas duas espécies, com o murino apresentando uma quebra de nucleotídeos cíclicos mais eficiente ou menor estimulação da GC por parte do cinaciguat.

Nos experimentos realizados com sangue de voluntários saudáveis e utilizando TAM como antagonista purinérgico, replica-se o mesmo padrão sinérgico de inibição da agregação e adesão plaquetária já observado com PAM. Mesmo que TAM tenha um sítio de ação diferente de PAM no receptor e é um antagonista reversível, o tempo total dos experimentos (até 2 horas) não foi suficiente para dissociação deste inibidor do receptor purinérgico e restauração da sua atividade. Desta forma, pode-se concluir que a sinergia observada entre os inibidores purinérgicos e ativadores da GC não é fármaco-específica e age da mesma forma na cascata de sinalização.

6 CONCLUSÃO

Em combinação com um antagonista purinérgico, os ativadores da GC e os inibidores da PDE plaquetária têm potencial para serem usados como agentes antitrombóticos. Ao administrar estes fármacos em baixa dose, pode-se proporcionar um forte efeito antiplaquetário localizado e menor efeito em outros locais que a GC está presente, como nas células do músculo liso vascular. Além disso, a maior afinidade dos ativadores da GC em situações em que a enzima está na sua forma desacoplada pressupõe seletividade para tecidos em que há maior formação de espécies reativas de oxigênio, ou seja, tecidos doentes. Ambos os mecanismos, teoricamente, evitariam ativação desnecessária em outros sistemas, minimizando assim possíveis efeitos adversos conhecidos destes fármacos como dor de cabeça e variação da pressão arterial. Tal combinação potencialmente beneficiaria milhões de pacientes com alto risco de desenvolvimento ou recorrência de eventos cardiovasculares.

REFERÊNCIAS*

1. SEMPLE, J. W.;ITALIANO, J. E., JR.; FREEDMAN, J. Platelets and the immune continuum. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, p. 264-274, 2011.
2. MOZAFFARIAN, D. et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 133, n. 4, p. e38-60, 2016.
3. BHATNAGAR, P. et al. The epidemiology of cardiovascular disease in the UK 2014. **Heart**, v. 101, n. 15, p. 1182-1189, 2015.
4. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. **British Medical Journal**, v. 324, n. 7329, p. 71-86, 2002.
5. BHATT, D. L.; TOPOL, E. J. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 1, p. 15-28, 2003.
6. BHATT, D. L. et al. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 16, p. 1706-1717, 2006.
7. MEADOWS, T. A.; BHATT, D. L. Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. **Circulation Research**, v. 100, n. 9, p. 1261-1275, 2007.
8. WORLD HEALTH ORGANIZATION. The top 10 causes of death. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> Acesso em 1-ago-2016.
9. ANDREOTTI, F. et al. Antithrombotic therapy in the elderly: expert position paper of the European Society of Cardiology Working Group on Thrombosis. **European Heart Journal**, v. 36, n. 46, p. 3238-3249, 2015.
10. JONES, C. I. Platelet function and ageing. **Mammalian Genome**, v. 27, n. 7-8, p. 358-366, 2016.
11. ROBB-SMITH, A. H. Why the platelets were discovered. **British Journal of Hematology**, v. 13, n. 4, p. 618-637, 1967.
12. OSLER, W. An account of certain organisms occurring in the liquor sanguinis. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 22, p. 391-398, 1874.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

13. BIZZOZERO, G. Su di un nuovo elemento morfologico del sangue dei mammiferi e della sua importanza nella trombosi e nella coagulazione. **L'Osservatore**, v. 17, p. 785-787, 1881.
14. BIZZOZERO, G. Über einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. **Virchow's Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin** v. 90, p. 261-332, 1882.
15. MICHELSON, A. D. The evolution of mammalian platelet. In: Elsevier (ed.). **Platelets**. 3rd ed. Oxford, UK: Elsevier, 2012. cap. 1st, p.3-27.
16. NARDINI, G.; LEOPARDI, S.; BIELLI, M. Clinical hematology in reptilian species. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 16, n. 1, p. 1-30, 2013.
17. PATEL, S. R.; HARTWIG, J. H.; ITALIANO, J. E., JR. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 12, p. 3348-3354, 2005.
18. ZUCKER, M. B.; NACHMIAS, V. T. Platelet activation. **Arteriosclerosis**, v. 5, n. 1, p. 2-18, 1985.
19. WHITE, J. G.; ESCOLAR, G. Current concepts of platelet membrane response to surface activation. **Platelets**, v. 4, n. 4, p. 175-189, 1993.
20. GAWAZ, M.; NEUMANN, F. J.; SCHOMIG, A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease: consequences for diagnosis and therapy. **Circulation**, v. 99, n. 1, p. E1-e11, 1999.
21. WHITE, J. G. Platelet glycosomes. **Platelets**, v. 10, n. 4, p. 242-246, 1999.
22. HANDAGAMA, P. et al. Platelet alpha-granule fibrinogen, albumin, and immunoglobulin G are not synthesized by rat and mouse megakaryocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 86, n. 4, p. 1364-1368, 1990.
23. HARRISON, P.; SAVIDGE, G. F.; CRAMER, E. M. The origin and physiological relevance of alpha-granule adhesive proteins. **British Journal of Hematology**, v. 74, n. 2, p. 125-130, 1990.
24. HOLMSEN, H.; WEISS, H. J. Secretable storage pools in platelets. **Annual Review of Medicine**, v. 30, p. 119-134, 1979.
25. FUKAMI, M. H. Isolation of dense granules from human platelets. **Methods in Enzymology**, v. 215, p. 36-42, 1992.

26. SMYTH, S. S. et al. Platelet functions beyond hemostasis. **Journal of Thrombosis and Hemostasis**, v. 7, n. 11, p. 1759-1766, 2009.
27. GEORGE, J. N. Platelets. **Lancet**, v. 355, n. 9214, p. 1531-9, 2000.
28. KASIRER-FRIEDE, A. et al. Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors. **Blood**, v. 103, n. 9, p. 3403-3411, 2004.
29. PAYRASTRE, B. et al. The integrin alpha IIb/beta 3 in human platelet signal transduction. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 8, p. 1069-1074, 2000.
30. RUGGERI, Z. M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. **Journal of Thrombosis Haemostasis**, v. 1, n. 7, p. 1335-1342, 2003.
31. SILJANDER, P. R. et al. Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. **Blood**, v. 103, n. 4, p. 1333-1341, 2004.
32. NESBITT, W. S. et al. A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation. **Nature Medicine**, v. 15, n. 6, p. 665-673, 2009.
33. SIESS, W.; CUATRECASAS, P.; LAPETINA, E. G. A role for cyclooxygenase products in the formation of phosphatidic acid in stimulated human platelets. Differential mechanisms of action of thrombin and collagen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 8, p. 4683-4686, 1983.
34. SIESS, W.; SIEGEL, F. L.; LAPETINA, E. G. Arachidonic acid stimulates the formation of 1,2-diacylglycerol and phosphatidic acid in human platelets. Degree of phospholipase C activation correlates with protein phosphorylation, platelet shape change, serotonin release, and aggregation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 18, p. 11236-11242, 1983.
35. GACHET, C. et al. Activation of ADP receptors and platelet function. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 78, n. 1, p. 271-275, 1997.
36. COUGHLIN, S. R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 258-264, 2000.
37. VARGA-SZABO, D.; BRAUN, A.; NIESWANDT, B. Calcium signaling in platelets. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, n. 7, p. 1057-1066, 2009.
38. BENNETT, J. S. Platelet-fibrinogen interactions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 936, p. 340-354, 2001.
39. SHATTIL, S. J.; NEWMAN, P. J. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. **Blood**, v. 104, n. 6, p. 1606-1615, 2004.

40. JONES, C. I. et al. Endogenous inhibitory mechanisms and the regulation of platelet function. **Methods in Molecular Biology**, v. 788, p. 341-366, 2012.
41. LORENZI, T. F. Hemostasia. **Manual de Hematologia: propedêutica e clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006. cap. 2.3, p.145-196.
42. FITZGERALD, G. A. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. **American Journal of Cardiology**, v. 68, n. 7, p. 11b-15b, 1991.
43. LI, B. Y.; ZHOU, Y. C.; LI, W. H. Dual effects of 5-hydroxytryptamine on stable analogue of thromboxane A2-induced aggregation and release reaction in rabbit platelets. **Zhongguo Yao Li Xue Bao**, v. 19, n. 2, p. 171-174, 1998.
44. ZATTA, A. et al. Platelet aggregation induced by the endoperoxide analogue U46619 is inhibited by polymorphonuclear leukocyte ADPase activity. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 13, n. 5, p. 696-701, 1993.
45. MCNICOL, A.; ISRAELS, S. J. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. **Thrombosis Research**, v. 95, n. 1, p. 1-18, 1999.
46. OFFERMANN, S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. **Circulation Research**, v. 99, n. 12, p. 1293-1304, 2006.
47. COLLIER, B. S.; GRALNICK, H. R. Studies on the mechanism of ristocetin-induced platelet agglutination. Effects of structural modification of ristocetin and vancomycin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 60, n. 2, p. 302-312, 1977.
48. WOLBERG, A. S.; CAMPBELL, R. A. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 38, n. 1, p. 15-23, 2008.
49. NYLANDER, S.; MATTSSON, C. Thrombin-induced platelet activation and its inhibition by anticoagulants with different modes of action. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v. 14, n. 2, p. 159-167, 2003.
50. LANDESBURG, R. et al. Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 4, p. 529-535, 2005.
51. NAKANISHI-MATSUI, M. et al. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 609-613, 2000.

52. ROBERTS, D. E.; MCNICOL, A.; BOSE, R. Mechanism of collagen activation in human platelets. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 19421-19430, 2004.
53. SAEED, S. A. et al. Signaling mechanisms mediated by G-protein coupled receptors in human platelets. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 7, p. 887-892, 2004.
54. GOFF, D. C., JR. et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **Circulation**, v. 129, n. 25 Suppl 2, p. S49-73, 2014.
55. DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, v. 115, n. 10, p. 1285-1295, 2007.
56. WEBER, C.; NOELS, H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1410-1422, 2011.
57. MASSBERG, S. et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 7, p. 887-896, 2002.
58. KITA, T. et al. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 947, p. 199-205; discussion 205-206, 2001.
59. CLINTON, S. K. et al. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. **American Journal of Pathology**, v. 140, n. 2, p. 301-316, 1992.
60. HUO, Y. et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. **Nature Medicine**, v. 9, n. 1, p. 61-67, 2003.
61. MARFELLA, R. et al. Morning blood pressure surge as a destabilizing factor of atherosclerotic plaque: role of ubiquitin-proteasome activity. **Hypertension**, v. 49, n. 4, p. 784-791, 2007.
62. HIATT, W. R. Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 21, p. 1608-1621, 2001.
63. MOHLER, E. R., 3RD. Peripheral arterial disease: identification and implications. **Archives of Internal Medicine**, v. 163, n. 19, p. 2306-2314, 2003.

64. PRANDONI, P. et al. An association between atherosclerosis and venous thrombosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 15, p. 1435-1441, 2003.
65. PRANDONI, P. Venous and arterial thrombosis: Two aspects of the same disease? **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 1, p. 1-6, 2009.
66. PRANDONI, P. et al. Venous thromboembolism and the risk of subsequent symptomatic atherosclerosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, n. 9, p. 1891-1896, 2006.
67. PATRONO, C. et al. Antiplatelet drugs: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). **Chest**, v. 133, n. 6 Suppl, p. 199s-233s, 2008.
68. SIMES, J. et al. Aspirin for the prevention of recurrent venous thromboembolism: the INSPIRE collaboration. **Circulation**, v. 130, n. 13, p. 1062-1071, 2014.
69. SNEADER, W. The discovery of aspirin: a reappraisal. **British Medical Journal**, v. 321, n. 7276, p. 1591-1594, 2000.
70. ANTMAN, E. M.; DEMETS, D.; LOSCALZO, J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. **Circulation**, v. 112, n. 5, p. 759-770, 2005.
71. VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology**, v. 231, n. 25, p. 232-235, 1971.
72. ROTH, G. J.; STANFORD, N.; MAJERUS, P. W. Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 8, p. 3073-3076, 1975.
73. LOLL, P. J.; PICOT, D.; GARAVITO, R. M. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. **Nature Structure & Molecular Biology**, v. 2, n. 8, p. 637-643, 1995.
74. MITCHELL, J. A.; WARNER, T. D. COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 1, p. 75-86, 2006.
75. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. **British Medical Journal**, v. 324, n. 7329, p. 71-86, 2002.
76. DALEN, J. E. Aspirin to prevent heart attack and stroke: what's the right dose? **American Journal of Medicine**, v. 119, n. 3, p. 198-202, 2006.

77. BAIGENT, C. et al. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. **Lancet**, v. 373, n. 9678, p. 1849-1860, 2009.
78. KIRKBY, N. S. et al. Cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2, is responsible for physiological production of prostacyclin in the cardiovascular system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 43, p. 17597-17602, 2012.
79. RITTER, J. M. et al. Differential effect of aspirin on thromboxane and prostaglandin biosynthesis in man. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 28, n. 5, p. 573-579, 1989.
80. KAWAMURA, N. et al. Low-dose aspirin-associated upper gastric and duodenal ulcers in Japanese patients with no previous history of peptic ulcers. **BMC Research Notes**, v. 6, p. 455, 2013.
81. WHITTLE, B. J. et al. Selective inhibition of prostaglandin production in inflammatory exudates and gastric mucosa. **Nature**, v. 284, n. 5753, p. 271-273, 1980.
82. LEE, M.; CRYER, B.; FELDMAN, M. Dose effects of aspirin on gastric prostaglandins and stomach mucosal injury. **Annals of Internal Medicine**, v. 120, n. 3, p. 184-189, 1994.
83. BRZOZOWSKI, T. et al. Involvement of cyclooxygenase (COX)-2 products in acceleration of ulcer healing by gastrin and hepatocyte growth factor. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 51, n. 4 Pt 1, p. 751-773, 2000.
84. MIZUNO, H. et al. Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. **Gastroenterology**, v. 112, n. 2, p. 387-397, 1997.
85. HATAZAWA, R. et al. Cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 accelerates the healing of gastric ulcers via EP4 receptors. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 293, n. 4, p. G788-97, 2007.
86. FELDMAN, M.; SHEWMAKE, K.; CRYER, B. Time course inhibition of gastric and platelet COX activity by acetylsalicylic acid in humans. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, n. 5, p. G1113-1120, 2000.
87. PATRONO, C. et al. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 22, p. 2373-2383, 2005.

88. MENDES, G.D. et al. Pharmacokinetic Evaluation of Administration of Losartan with Aspirin in Healthy Volunteers. **Journal of Bioequivalence and Bioavailability**, v. 7, p. 144-149, 2015.
89. FERREIRA, P. M. et al. Acetylsalicylic Acid Daily vs Acetylsalicylic Acid Every 3 Days in Healthy Volunteers: Effect on Platelet Aggregation, Gastric Mucosa, and Prostaglandin E2 Synthesis. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, n. 7, p. 862-868, 2016.
90. FONTANA, P. et al. Antiplatelet therapy: targeting the TxA2 pathway. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 7, n. 1, p. 29-38, 2014.
91. ZHANG, J. et al. Ozagrel for acute ischemic stroke: a meta-analysis of data from randomized controlled trials. **Neurology Research**, v. 34, n. 4, p. 346-353, 2012.
92. FITZGERALD, G. A.; REILLY, I. A.; PEDERSEN, A. K. The biochemical pharmacology of thromboxane synthase inhibition in man. **Circulation**, v. 72, n. 6, p. 1194-1201, 1985.
93. FIESSINGER, J. N. et al. Thromboxane Antagonism with terutroban in Peripheral Arterial Disease: the TAIPAD study. **Journal of Thrombosis Haemostasis**, v. 8, n. 11, p. 2369-2376, 2010.
94. BAL DIT SOLLIER, C. et al. Effect of the thromboxane prostaglandin receptor antagonist terutroban on arterial thrombogenesis after repeated administration in patients treated for the prevention of ischemic stroke. **Cerebrovascular Diseases**, v. 28, n. 5, p. 505-513, 2009.
95. BOUSSER, M. G. et al. Terutroban versus aspirin in patients with cerebral ischaemic events (PERFORM): a randomised, double-blind, parallel-group trial. **Lancet**, v. 377, n. 9782, p. 2013-222, 2011.
96. Randomized trial of ridogrel, a combined thromboxane A2 synthase inhibitor and thromboxane A2/prostaglandin endoperoxide receptor antagonist, versus aspirin as adjunct to thrombolysis in patients with acute myocardial infarction. The Ridogrel Versus Aspirin Patency Trial (RAPT). **Circulation**, v. 89, n. 2, p. 588-595, 1994.
97. FONTANA, P.; RENY, J. L. New Antiplatelet Strategies in Atherothrombosis and Their Indications. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 34, n. 1, p. 10-17, 2007.
98. GACHET, C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 46, p. 277-300, 2006.

99. HECHLER, B.; CATTANEO, M.; GACHET, C. The P2 receptors in platelet function. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 31, n. 2, p. 150-161, 2005.
100. WARNER, T. D. et al. Dual antiplatelet therapy in cardiovascular disease: does aspirin increase clinical risk in the presence of potent P2Y₁₂ receptor antagonists? **Heart**, v. 96, n. 21, p. 1693-1694, 2010.
101. KIRKBY, N. S. et al. Blockade of the purinergic P2Y₁₂ receptor greatly increases the platelet inhibitory actions of nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 39, p. 15782-15787, 2013.
102. STEINHUBL, S. R. et al. Incidence and clinical course of thrombotic thrombocytopenic purpura due to ticlopidine following coronary stenting. EPISTENT Investigators. Evaluation of Platelet IIb/IIIa Inhibitor for Stenting. **The Journal of the American Medical Association**, v. 281, n. 9, p. 806-810, 1999.
103. GACHET, C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n. 3, p. 466-472, 2008.
104. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. **Lancet**, v. 348, n. 9038, p. 1329-1339, 1996.
105. MEHTA, S. R. et al. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. **Lancet**, v. 358, n. 9281, p. 527-533, 2001.
106. BHATT, D. L. et al. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 16, p. 1706-1717, 2006.
107. YUSUF, S. et al. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 7, p. 494-502, 2001.
108. MEHTA, S. R. et al. Dose comparisons of clopidogrel and aspirin in acute coronary syndromes. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 10, p. 930-942, 2010.
109. STEINHUBL, S. R. et al. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. **The Journal of the American Medical Association**, v. 288, n. 19, p. 2411-2420, 2002.

110. LAU, W. C. et al. Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. **Circulation**, v. 109, n. 2, p. 166-171, 2004.
111. ZABALZA, M. et al. Meta-analyses of the association between cytochrome CYP2C19 loss- and gain-of-function polymorphisms and cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease treated with clopidogrel. **Heart**, v. 98, n. 2, p. 100-108, 2012.
112. FORD, N. F. The Metabolism of Clopidogrel: CYP2C19 is a Minor Pathway. **The Journal of Clinical Pharmacology**, Epub ahead of print. 2016.
113. SUGIDACHI, A. et al. The greater in vivo antiplatelet effects of prasugrel as compared to clopidogrel reflect more efficient generation of its active metabolite with similar antiplatelet activity to that of clopidogrel's active metabolite. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, n. 7, p. 1545-1551, 2007.
114. MICHELSON, A. D. et al. Pharmacodynamic assessment of platelet inhibition by prasugrel vs. clopidogrel in the TRITON-TIMI 38 trial. **European Heart Journal**, v. 30, n. 14, p. 1753-1763, 2009.
115. WIVIOTT, S. D. et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 20, p. 2001-2015, 2007.
116. ROE, M. T. et al. Prasugrel versus clopidogrel for acute coronary syndromes without revascularization. **The New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 14, p. 1297-1309, 2012.
117. GURBEL, P. A.; KULIOPULOS, A.; TANTRY, U. S. G-protein-coupled receptors signaling pathways in new antiplatelet drug development. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 35, n. 3, p. 500-512, 2015.
118. WALLENTIN, L. et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 11, p. 1045-1057, 2009.
119. KOHLI, P. et al. Reduction in first and recurrent cardiovascular events with ticagrelor compared with clopidogrel in the PLATO Study. **Circulation**, v. 127, n. 6, p. 673-680, 2013.
120. JOHNSTON, S. C. et al. Ticagrelor versus Aspirin in Acute Stroke or Transient Ischemic Attack. **The New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 1, p. 35-43, 2016.

121. GURBEL, P. A. et al. State of the art: Oral antiplatelet therapy. **JRSM Cardiovascular Disease**, v. 5, p. 2048004016652514, 2016.
122. MAGNANI, G. et al. Efficacy and safety of ticagrelor for long-term secondary prevention of atherothrombotic events in relation to renal function: insights from the PEGASUS-TIMI 54 trial. **European Heart Journal**, v. 37, n. 4, p. 400-408, 2016.
123. COLLET, J. P. et al. Dual-antiplatelet treatment beyond 1 year after drug-eluting stent implantation (ARCTIC-Interruption): a randomised trial. **Lancet**, v. 384, n. 9954, p. 1577-1585, 2014.
124. PRICE, M. J. et al. Platelet reactivity and cardiovascular outcomes after percutaneous coronary intervention: a time-dependent analysis of the Gauging Responsiveness with a VerifyNow P2Y12 assay: Impact on Thrombosis and Safety (GRAVITAS) trial. **Circulation**, v. 124, n. 10, p. 1132-1137, 2011.
125. COLLET, J. P. et al. Bedside monitoring to adjust antiplatelet therapy for coronary stenting. **The New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 22, p. 2100-2109, 2012.
126. TRENK, D. et al. A randomized trial of prasugrel versus clopidogrel in patients with high platelet reactivity on clopidogrel after elective percutaneous coronary intervention with implantation of drug-eluting stents: results of the TRIGGER-PCI (Testing Platelet Reactivity In Patients Undergoing Elective Stent Placement on Clopidogrel to Guide Alternative Therapy With Prasugrel) study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 59, n. 24, p. 2159-2164, 2012.
127. GURBEL, P. A. et al. Platelet function during extended prasugrel and clopidogrel therapy for patients with ACS treated without revascularization: the TRILOGY ACS platelet function substudy. **The Journal of the American Medical Association**, v. 308, n. 17, p. 1785-1794, 2012.
128. MONCADA, S. et al. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v. 263, n. 5579, p. 663-665, 1976.
129. RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. **British Journal of Pharmacology**, v. 92, n. 3, p. 639-646, 1987.
130. MORO, M. A. et al. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 4, p. 1480-1485, 1996.
131. ARMSTRONG, R. A. Platelet prostanoid receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 72, n. 3, p. 171-191, 1996.

132. DAVI, G.; PATRONO, C. Platelet activation and atherothrombosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 24, p. 2482-2494, 2007.
133. CATTANEO, M.; LECCHI, A. Inhibition of the platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate potentiates the antiplatelet effect of prostacyclin. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, n. 3, p. 577-582, 2007.
134. CHAN, M. V. et al. P2Y₁₂ receptor blockade synergizes strongly with nitric oxide and prostacyclin to inhibit platelet activation. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 81, n. 4, p. 621-633, 2016.
135. HOBBS, A. J.; STASCH, J. P. In: IGNARRO, L. J. **Nitric Oxide**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2010. p.301-326.
136. EVGENOV, O. V. et al. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 9, p. 755-768, 2006.
137. ROY, B. et al. Probing the presence of the ligand-binding haem in cellular nitric oxide receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 7, p. 1495-1504, 2008.
138. HOFFMANN, L. S. et al. Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 5, p. 781-795, 2009.
139. MARTIN, F. et al. Structure of cinaciguat (BAY 58-2667) bound to Nostoc H-NOX domain reveals insights into heme-mimetic activation of the soluble guanylyl cyclase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 29, p. 22651-22657, 2010.
140. SURMELI, N. B.; MARLETTA, M. A. Insight into the rescue of oxidized soluble guanylate cyclase by the activator cinaciguat. **Chembiochem**, v. 13, n. 7, p. 977-981, 2012.
141. STASCH, J. P. et al. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. **Nature**, v. 410, n. 6825, p. 212-215, 2001.
142. STASCH, J. P. et al. Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 2, p. 333-343, 2002.
143. ZANFOLIN, M. et al. Protective effects of BAY 41-2272 (sGC stimulator) on hypertension, heart, and cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic L-NAME treatment in rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 391-395, 2006.

144. MASUYAMA, H. et al. Soluble guanylate cyclase stimulation on cardiovascular remodeling in angiotensin II-induced hypertensive rats. **Hypertension**, v. 48, n. 5, p. 972-978, 2006.
145. WEIMANN, J. et al. Sildenafil is a pulmonary vasodilator in awake lambs with acute pulmonary hypertension. **Anesthesiology**, v. 92, n. 6, p. 1702-1712, 2000.
146. EVGENOV, O. V. et al. Inhaled agonists of soluble guanylate cyclase induce selective pulmonary vasodilation. **American Journal of Respiratory and Critical Care**, v. 176, n. 11, p. 1138-1145, 2007.
147. FREITAS, C. F. et al. Effect of BAY 41-2272 in the pulmonary hypertension induced by heparin-protamine complex in anaesthetized dogs. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 1-2, p. 10-14, 2007.
148. DERUELLE, P. et al. Effects of BAY 41-2272, a soluble guanylate cyclase activator, on pulmonary vascular reactivity in the ovine fetus. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 288, n. 4, p. L727-733, 2005.
149. DUMITRASCU, R. et al. Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. **Circulation**, v. 113, n. 2, p. 286-295, 2006.
150. CAU, S. B. et al. Dose-dependent beneficial hemodynamic effects of BAY 41-2272 in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. **European Journal of Pharmacology**, v. 581, n. 1-2, p. 132-137, 2008.
151. WHARTON, J. et al. Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. . **American Journal of Respiratory and Critical Care**, v. 172, n. 1, p. 105-113, 2005.
152. HOBBS, A. J.; MONCADA, S. Antiplatelet properties of a novel, non-NO-based soluble guanylate cyclase activator, BAY 41-2272. **Vascular Pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 149-154, 2003.
153. FREY, R. et al. Effects of age and sex on the pharmacokinetics of the soluble guanylate cyclase stimulator riociguat (BAY 63-2521). **Pulmonary Circulation**, v. 6, n. Suppl 1, p. S58-65, 2016.
154. BOERRIGTER, G. et al. Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase in experimental heart failure. **Hypertension**, v. 49, n. 5, p. 1128-1133, 2007.

155. FREY, R. et al. Riociguat (BAY 63-2521) and aspirin: a randomized, pharmacodynamic, and pharmacokinetic interaction study. **Pulmonary Circulation**, v. 6, n. Suppl 1, p. S35-42, 2016.
156. GRIMMINGER, F. et al. First acute haemodynamic study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, v. 33, n. 4, p. 785-792, 2009.
157. FREY, R. et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability, and safety of the soluble guanylate cyclase activator cinaciguat (BAY 58-2667) in healthy male volunteers. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, n. 12, p. 1400-1410, 2008.
158. FREY, R. et al. Pharmacokinetics of the soluble guanylate cyclase activator cinaciguat in individuals with hepatic impairment. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 52, n. 11, p. 1714-1724, 2012.
159. LAPP, H. et al. Cinaciguat (BAY 58-2667) improves cardiopulmonary hemodynamics in patients with acute decompensated heart failure. **Circulation**, v. 119, n. 21, p. 2781-2788, 2009.
160. GHEORGHIADÉ, M. et al. Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator: results from the randomized, controlled, phase IIb COMPOSE programme in acute heart failure syndromes. **European Journal of Heart Failure**, v. 14, n. 9, p. 1056-1066, 2012.
161. ERDMANN, E. et al. Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, unloads the heart but also causes hypotension in acute decompensated heart failure. **European Heart Journal**, v. 34, n. 1, p. 57-67, 2013.
162. COLLIER, B. S. Platelet GPIIb/IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 7, p. 1467-1471, 1997.
163. COLLIER, B. S. Anti-GPIIb/IIIa drugs: current strategies and future directions. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 86, n. 1, p. 427-443, 2001.
164. REVERTER, J. C. et al. Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and "clinical restenosis". **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 3, p. 863-874, 1996.
165. KANNAN, M.; SAXENA, R. Glanzmann's thrombasthenia: an overview. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 15, n. 2, p. 152-165, 2009.
166. ADGEY, A. A. An overview of the results of clinical trials with glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. **American Heart Journal**, v. 135, n. 4, p. S43-55, 1998.

167. Randomised placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina: the CAPTURE Study. **Lancet**, v. 349, n. 9063, p. 1429-1435, 1997.
168. CHEW, D. P.; MOLITERNO, D. J. A critical appraisal of platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 36, n. 7, p. 2028-2035, 2000.
169. KASTRATI, A. et al. Abciximab in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention after clopidogrel pretreatment: the ISAR-REACT 2 randomized trial. **The Journal of the American Medical Association**, v. 295, n. 13, p. 1531-1538, 2006.
170. NEUMANN, F. J. et al. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade with abciximab on clinical and angiographic restenosis rate after the placement of coronary stents following acute myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 35, n. 4, p. 915-921, 2000.
171. MONTALESCOT, G. et al. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition with coronary stenting for acute myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 25, p. 1895-1903, 2001.
172. STONE, G. W. et al. Comparison of angioplasty with stenting, with or without abciximab, in acute myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 13, p. 957-966, 2002.
173. ANTONIUCCI, D. et al. A randomized trial comparing primary infarct artery stenting with or without abciximab in acute myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 42, n. 11, p. 1879-1885, 2003.
174. KOLH, P. et al. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: the Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). **European Journal of Cardiothoracic Surgery**, v. 46, n. 4, p. 517-592, 2014.
175. ELLIS, S. G. et al. Facilitated PCI in patients with ST-elevation myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 21, p. 2205-2217, 2008.
176. MEHILLI, J. et al. Abciximab in patients with acute ST-segment-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention after clopidogrel loading: a randomized double-blind trial. **Circulation**, v. 119, n. 14, p. 1933-1940, 2009.

177. LI, J. et al. RUC-4: a novel α IIb β 3 antagonist for prehospital therapy of myocardial infarction. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**, v. 34, n. 10, p. 2321-2329, 2014.
178. DE CANDIA, E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history. **Thrombosis Research**, v. 129, n. 3, p. 250-256, 2012.
179. MORROW, D. A. et al. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1404-1413, 2012.
180. SCIRICA, B. M. et al. Vorapaxar for secondary prevention of thrombotic events for patients with previous myocardial infarction: a prespecified subgroup analysis of the TRA 2 degrees P-TIMI 50 trial. **Lancet**, v. 380, n. 9850, p. 1317-1324, 2012.
181. SODERLING, S. H.; BEAVO, J. A. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, n. 2, p. 174-179, 2000.
182. HIDAKA, H.; ASANO, T. Platelet cyclic 3':5'-nucleotide phosphodiesterase released by thrombin and calcium ionophore. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 23, p. 7508-7516, 1976.
183. SUDO, T. et al. Potent effects of novel anti-platelet aggregatory cilostamide analogues on recombinant cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 4, p. 347-356, 2000.
184. GOTOH, F. et al. Cilostazol stroke prevention study: A placebo-controlled double-blind trial for secondary prevention of cerebral infarction. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Disease**, v. 9, n. 4, p. 147-157, 2000.
185. FRIEDLAND, S. N.; EISENBERG, M. J.; SHIMONY, A. Meta-analysis of randomized controlled trials on effect of cilostazol on restenosis rates and outcomes after percutaneous coronary intervention. **American Journal of Cardiology**, v. 109, n. 10, p. 1397-1404, 2012.
186. JANG, J. S. et al. A meta-analysis of randomized controlled trials appraising the efficacy and safety of cilostazol after coronary artery stent implantation. **Cardiology**, v. 122, n. 3, p. 133-143, 2012.
187. DE SCHRYVER, E. L.; ALGRA, A.; VAN GIJN, J. Dipyridamole for preventing stroke and other vascular events in patients with vascular disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 3, p. Cd001820, 2007.

188. DIENER, H. C. et al. European Stroke Prevention Study. 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke. **Journal of Neurological Sciences**, v. 143, n. 1-2, p. 1-13, 1996.
189. HALKES, P. H. et al. Aspirin plus dipyridamole versus aspirin alone after cerebral ischaemia of arterial origin (ESPRIT): randomised controlled trial. **Lancet**, v. 367, n. 9523, p. 1665-1673, 2006.
190. SACCO, R. L. et al. Aspirin and extended-release dipyridamole versus clopidogrel for recurrent stroke. **The New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 12, p. 1238-1251, 2008.
191. CATTANEO, M. et al. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Epub. 2013.
192. ARMSTRONG, P. C. et al. Novel whole blood assay for phenotyping platelet reactivity in mice identifies ICAM-1 as a mediator of platelet-monocyte interaction. **Blood**, v. 126, n. 10, p. e11-18, 2015.
193. RUGGERI, Z. M. Platelet adhesion under flow. **Microcirculation**, v. 16, n. 1, p. 58-83, 2009.
194. SCHRAMMEL, A. et al. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Molecular Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 1-5, 1996.
195. ZHANG, K. et al. Structure of the human P2Y₁₂ receptor in complex with an antithrombotic drug. **Nature**, v. 509, n. 7498, p. 115-118, 2014.
196. WESTRICK, R. J.; WINN, M. E.; EITZMAN, D. T. Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series). **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**, v. 27, n. 10, p. 2079-2093, 2007.
197. PAN, X. et al. Synergistic interactions between selective pharmacological inhibitors of phosphodiesterase isozyme families PDE III and PDE IV to attenuate proliferation of rat vascular smooth muscle cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, n. 4, p. 827-835, 1994.
198. STASCH, J. P. et al. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 5, p. 773-783, 2002.

199. ARMITAGE, M. E. et al. Translating the oxidative stress hypothesis into the clinic: NOX versus NOS. **Journal of Molecular Medicine**, v. 87, n. 11, p. 1071-1076, 2009.
200. RUDYK, O. et al. Protein kinase G oxidation is a major cause of injury during sepsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 24, p. 9909-9913, 2013.
201. MURAD, F. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 19, p. 2003-2011, 2006.
202. MEURER, S. et al. Nitric oxide-independent vasodilator rescues heme-oxidized soluble guanylate cyclase from proteasomal degradation. **Circulation Research**, v. 105, n. 1, p. 33-41, 2009.
203. FUJISUE, K. et al. Effects of endothelial dysfunction on residual platelet aggregability after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. **Circulation: Cardiovascular Interventions**, v. 6, n. 4, p. 452-459, 2013.
204. MURAD, F. et al. Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. **Advanced Cyclic Nucleotide Research**, v. 9, p. 145-158, 1978.

APÊNDICE

FERREIRA, P. M. et al. Acetylsalicylic Acid Daily vs Acetylsalicylic Acid Every 3 Days in Healthy Volunteers: Effect on Platelet Aggregation, Gastric Mucosa, and Prostaglandin E2 Synthesis. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, n. 7, p. 862-868, 2016.

Autorizado pela Editora Wiley & Sons.

Acetylsalicylic Acid Daily vs Acetylsalicylic Acid Every 3 Days in Healthy Volunteers: Effect on Platelet Aggregation, Gastric Mucosa, and Prostaglandin E₂ Synthesis

The Journal of Clinical Pharmacology
 2016, 56(7) 862–868
 © 2015, The American College of
 Clinical Pharmacology
 DOI: 10.1002/jcph.685

**Plinio Minghin Freitas Ferreira, PharmD¹, Thiago Gagliano-Jucá, MD²,
 Tiago Zaminelli, MPhil³, Marinalva Ferreira Sampaio, PharmD⁴,
 Rory William Blackler, PhD⁵, Miriam da Silva Trevisan, MD, PhD⁶,
 Antônio Frederico Novaes Magalhães, MD, PhD⁶, and Gilberto De Nucci, MD, PhD^{1,3*}**

Abstract

Substantial platelet inhibition was observed 3 days after a single administration of acetylsalicylic acid 81 mg to healthy volunteers. Here we investigate prostaglandin E₂ (PGE₂) antrum concentrations and gastrointestinal symptoms in two treatment groups: one receiving losartan and acetylsalicylic acid every day and the other receiving losartan every day and acetylsalicylic acid every 3 days. Twenty-eight healthy volunteers from both sexes received either 50 mg losartan and acetylsalicylic acid 81 mg daily or 50 mg losartan and acetylsalicylic acid 81 mg every 3 days with placebo on the other days. Therapy was delivered for 30 days for both groups. Gastric endoscopy was performed before and after treatment period. Biopsies were collected for PGE₂ quantification. Platelet function tests were carried out before and during treatment and TXB₂ release on platelet rich plasma was measured. The every 3 day low-dose acetylsalicylic acid regimen produced complete inhibition of platelet aggregation compared to the daily treatment. Thromboxane B₂ release was substantially abolished for both groups during treatment. There was no significant difference on the endoscopic score of both treatment groups after the 30-day treatment ($P = .215$). There was over 50% suppression of antrum PGE₂ content on volunteers receiving acetylsalicylic acid daily ($P = .0016$), while for the every 3 day dose regimen there was no significant difference between pre and post-treatment antrum PGE₂ dosages ($P = .4193$). Since PGE₂ is involved in gastric healing, we understand that this new approach could be safer and as efficient as the standard daily therapy on a long-term basis.

Keywords

antiplatelet agents, PGE₂, acetylsalicylic acid, losartan

Acetylsalicylic acid has remained the basis of antiplatelet therapy for more than 50 years. Its basic mechanism of action was described more than 40 years ago and involves irreversible inhibition of the cyclooxygenase enzyme.¹ More recently, further details of acetylsalicylic acid interaction with cyclooxygenase were described (acetylation of serine 529 residue, blocking the arachidonic acid catalytic site, causing strong suppression of prostaglandin H₂ generation, and, subsequently, thromboxane (TX) A₂ synthesis).^{2,3} On platelets, this will lead to inhibition of platelet activation by the TX receptor, producing an antiaggregating effect.^{4,5} Daily dosage commonly prescribed for prevention of myocardial infarction, stroke, and death for high-risk patients is established between 75 and 325 mg per day.^{6,7}

However, on its standard daily regimen, low-dose acetylsalicylic acid has been shown to cause gastrointestinal damage and is associated with increased risk of gastroduodenal ulcers and their potentially fatal complications.⁸ Inhibition of mucosal COX activity by acetylsalicylic acid results in lower levels of protective

prostaglandins such as PGE₂ and PGI₂.^{9,10} Endogenous PGE₂ is closely related to the recovery from gastric

¹Department of Pharmacology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

²Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brazil

⁴Galeno Research Unit, Campinas, SP, Brazil

⁵Farncombe Family Digestive Health Research Institute, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada

⁶Department of Gastroenterology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brazil

Submitted for publication 22 October 2015; accepted 23 November 2015.

Corresponding Author:

Plinio Minghin Freitas Ferreira, PharmD, Department of Pharmacology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, Cidade Universitária, 05508-000 – São Paulo/SP, Brasil

Email: pliniomfferreira@yahoo.com.br

*Principal Investigator.

mucosal injury^{11,12} and plays an important role for the maintenance of stomach integrity and accelerating healing.¹³ Complete recovery of gastric COX mucosal activity on healthy volunteers receiving 81 mg acetylsalicylic acid daily was estimated to be 5 days after discontinuation.¹⁴ Therefore, chronic users have gastric COX activity permanently reduced.

Recovery from the antiplatelet effect is slow because platelets have no nucleus and therefore cannot regenerate COX-1 to produce TXA₂.¹⁵ Thus, acetylsalicylic acid antiplatelet effects on intervals longer than 24 hours have been investigated^{16,17} as well as daily therapy schemes with lower doses than 81 mg.^{18,19} Healthy volunteers receiving 0.45 mg/kg of acetylsalicylic acid daily showed a cumulative effect on repeated administration on platelet TXA₂ but not on renal prostaglandin synthesis.¹⁹

In healthy volunteers we have demonstrated that a single 81-mg dose of acetylsalicylic acid still produces complete platelet inhibition after 72 hours, similarly to the platelet inhibition achieved 24 hours after a single dose.²⁰ The present study investigated the gastrointestinal safety of low-dose acetylsalicylic acid administered every 3 days and losartan every day compared to the standard daily therapy. In parallel, pharmacodynamic monitoring was done during the study in order to quantify inhibition of platelet aggregation under both therapy schemes. Part of this research has been presented in Ferreira et al.²¹

Losartan is a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist used as an antihypertensive agent that blocks the vasoconstrictor and aldosterone-secreting effects of angiotensin II by type AT1 receptor blockage.^{22,23} Losartan may reduce cardiovascular events more significantly than β -blockers in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy.²⁴

Because combined losartan and low-dose acetylsalicylic acid therapy is commonly prescribed to patients with heart failure, hypertension, and ischemic diseases,^{24,25} the present work evaluated the 2 different therapy schemes along with daily losartan administration.

Methods

All subjects gave written informed consent, and the State University of Sao Paulo (USP) ethics committee approved the clinical protocol (Approval Number 550.541 on February 28, 2014).

Inclusion Criteria

The study population consisted of volunteers of both sexes, nonsmokers, over 18 years old with a mass body index equal to or over 19 and under or equal to 28.8, with a 15% tolerance over the upper limit. All vol-

unteers were healthy as assessed by physical examination, electrocardiogram, and the following laboratory tests: blood glucose, urea, uric acid, creatinine, alkaline phosphatase, aspartate and alanine aminotransferases, γ -glutamyl transferase, total bilirubin, albumin and total protein, triglyceride, total cholesterol, hemoglobin, hematocrit, erythrocyte sedimentation rate, total and differential white cell and platelet counts, and routine urinalysis. The women included were not pregnant or breast-feeding. All subjects were negative for human immunodeficiency virus I and II, hepatitis B (except for serological scar), and hepatitis C virus. Also, volunteers who received any drug except oral contraceptives 14 days before the beginning of the study were not included. During the study period, volunteers were asked to avoid taking any anti-inflammatory or analgesic drug except for acetaminophen. No supplements were allowed during the study.

Study Design and Treatment Protocol

A monocentric, double-blind, randomized study was used with 2 treatment groups: treatment A consisted of losartan 50 mg per day plus acetylsalicylic acid 81 mg per day; treatment B consisted of losartan 50 mg per day plus acetylsalicylic acid 81 mg every 3 days with placebo on the other 2. Both treatments were delivered for 30 days. To assure adherence, the drugs were administered by a member of the research team early in the morning in the clinical facility, and volunteers were required to be fasted. All volunteers underwent 2 endoscopic exams: 1 before the beginning of the treatment and another 24 hours after the last dose. Only volunteers without any damage were allowed to participate. Platelet function tests were performed 4 times during the study: once before treatment (D0) and on the 15th (D15), 16th, and 17th (D17) days of treatment.

The following formulations were employed: losartan (Aradois®) immediate-release 50-mg tablets (Biolab Sanus Farmacêutica Ltda, Brazil) and acetylsalicylic acid (Ecasil®) 81 mg (Biolab Sanus Farmacêutica Ltda, Brazil).

Platelet Function Monitoring

Light Transmission Aggregometry. Light transmission aggregometry (LTA) is considered the gold standard test for platelet function. LTA measures the transmission of light through a sample of platelets in suspension, which is increased when platelets are aggregated in response to an agonist.²⁷ Arachidonic acid and adenosine diphosphate (ADP) were the selected agonists on standard concentrations because they track the major mediators of platelet aggregation amplification: thromboxane A₂ and ADP.⁵

Tests were carried out, and samples were stored for subsequent thromboxane dosage on the 15th, 16th, and 17th days of therapy, therefore 48, 72, and 24 hours, respectively, since the last dose of acetylsalicylic acid.

In all blood-sampling days, 18 mL of blood was obtained from venipuncture and transferred to 5-mL centrifuge tubes containing 500 μ L of 3.2% sodium citrate (1:9 final concentration). Platelet-rich plasma (PRP) was harvested from the upper layer after centrifugation of the blood sample at 2220g for 30 seconds at room temperature. The remaining blood was further centrifuged at 8880g for 120 seconds at room temperature to obtain platelet-poor plasma (PPP). Born aggregometry was performed with an 8-channel aggregometer. In each channel, experiments were performed with a volume of 250 μ L of PRP with a constant stirring rate of 1200 rpm at 37°C. PRP was stimulated with 2 concentrations of arachidonic acid (500 μ g/mL and 300 μ g/mL) and 20 μ M of ADP. All concentrations were made in duplicate. Light transmission was recorded for 5 minutes, and the reaction was stopped by addition of 60 μ L of cold 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution. All samples were recovered and stored at -80°C for thromboxane B₂ (TXB₂) dosage.

Arachidonic acid and ADP were both purchased from Sigma-Aldrich Co. LTA was performed on an 8-channel PAP-8E aggregometer (Bio/Data Corporation, Horsham, Pennsylvania).

Stimulated PRP Thromboxane B₂ Dosage. Stored stimulated PRP was centrifuged at 10,000g for 2 minutes, and the supernatant was collected and diluted in deionized water 1:1000 (v/v) and 1:500 for arachidonic acid-stimulated samples and 1:100 and 1:50 for ADP-stimulated samples. Thromboxane B₂ was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan).

Gastrointestinal Damage Evaluation. After an overnight fast, volunteers presented to the hospital for the endoscopic procedure. They received 40 mg of dimethicone 30 minutes before the procedure. Then they underwent pharyngeal anesthesia with 200 mg of lidocaine spray followed by sedation with 5 mg of intravenous midazolam and 25 mg of meperidine. Using an Olympus GIF-V endoscope, gastric mucosa was visually inspected and scored by the physician, who was unaware of the treatment randomization. The rating scale used for gastric assessment has been previously described elsewhere.²⁸ All exams were carried out in the Vera Cruz Hospital, Campinas, Sao Paulo, Brazil.

In every procedure, 2 antral biopsy specimens were collected and used for PGE₂ quantification.

PGE₂ Quantification. Tissue PGE₂ concentration was quantified by enzyme-linked immunosorbent

assay (ELISA) using Cayman Chemical Monoclonal Prostaglandin E₂ EIA Kit. Briefly, biopsies from the gastric antrum collected in the endoscopic procedures were weighed and homogenized individually for 20 seconds by a Polytron in 1 mL of Na₃PO₄ buffer solution (pH = 7.4). Aliquots of 200 μ L of the homogenate were placed in a dry bath at 37°C for 20 minutes and then centrifuged at 20,800g for 30 seconds. Supernatant (150 μ L) was collected and diluted 1:100 (v/v) to be used in the ELISA. Each aliquot was assayed in duplicate, and final PGE₂ concentrations were adjusted for initial sample mass.

Statistics. All scores are expressed as medians. For final aggregation percentages, PGE₂ and TXB₂ levels values are expressed as mean $\pm$ SD. For evaluation of statistical difference of scores, the Mann-Whitney U-test was used. For the other evaluations a Student t-test was used to compare values before and after treatments within each group. In all cases, $P < .05$ (2-tailed) was taken as significant. Data analysis was performed in Prism 6.0 and Microsoft Excel 2010.

Results

Patient Demographics

The study was conducted with 28 healthy volunteers (11 men and 17 women) aged between 18 and 46 years (29.1 ± 4.5) with average body mass index of 24.3 ± 1.9 .

Light Transmission Aggregometry. Twenty-four out of 28 volunteers presented full aggregation on PRP with 20 μ M of ADP and 500 μ g/mL of arachidonic acid stimulation on a pretreatment test. From these 24 volunteers, 12 received acetylsalicylic acid every day, and 12 received acetylsalicylic acid every 3 days. There was no significant difference between the 2 groups on final aggregation values during the study for arachidonic acid and ADP stimulation. Figure 1 represents final aggregation values comparing the groups on each treatment day, and numerical values are described in Table 1. With 500 μ g/mL arachidonic acid stimulation on PRP for the every-3-day group, 2 volunteers presented with partial aggregation on D15 and 1 on D16. For 300 μ g/mL stimulation only 1 volunteer on the every-3-day group had partial aggregation on D15 and D16 and another 1 on D17.

Treatment Effects on TXB₂ Levels. In both treatment groups, over 95% inhibition of TXB₂ release after AA 300 μ g/mL stimulation on PRP samples collected during the treatment, compared to basal values, was observed. Dosages performed before and during the treatment, for both treatment groups, are presented in Figure 2A.

For ADP 20 μ M-induced platelet aggregation, TXB₂ release during treatment was also abolished in both treatment groups. On D16, volunteers who

Figure 1. Mean ($\pm$ SD) final percentage aggregation values after stimulation on PRP obtained by light transmission aggregometry, $n = 24$ volunteers equally divided into 2 groups. Tests were carried at pretreatment (D0) and on the 15th (D15), 16th (D16), and 17th (D17) days of the study. Graphs were divided by each agonist concentration. Panel A, arachidonic acid (AA) 500 $\mu\text{g/ml}$; panel B, arachidonic acid 300 $\mu\text{g/ml}$; and panel C, ADP 20 μM . No statistical difference was observed between groups for any test day.

received acetylsalicylic acid every 3 days were 72 hours away from their last dose of acetylsalicylic acid. On this day, inhibition of TXB_2 release was 87% after stimulation with ADP. Mean $\pm$ SD values before and during the treatment for both treatment groups are presented in Figure 2B. Numerical data from both panels are presented in Table 2.

Treatment Effects on Macroscopic Injury. Median endoscopic score for both treatment groups was 0 before and after the 30-day treatment. The Mann-Whitney U test for treatment A vs treatment B on postendoscopic scores found $P = .215$. Therefore, there was no significant difference in the endoscopic scores of the 2 treatment groups after the 30-day treatment. Interestingly, the nonrandomized and asymptomatic group had a median score of 2.5.

Treatment Effects on PGE_2 Levels. There was over 50% suppression of antrum PGE_2 content in the daily acetylsalicylic acid group, whereas for the once-every-3-day group there was no difference between pre- and post-acetylsalicylic acid every day antrum PGE_2 levels. Results are summarized in Figure 3 as a bar chart.

Discussion

The present study demonstrates that volunteers who received acetylsalicylic acid every 3 days presented with complete platelet inhibition during the treatment period and maintained PGE_2 levels on antrum at the end of it. In contrast, the standard daily therapy had over 50% of gastric PGE_2 synthesis inhibition. Because PGE_2 is involved in gastric healing, this new approach should be as efficient as the standard daily therapy for platelet aggregation inhibition while presenting a safer gastric profile on a long-term basis.

Compared to placebo, in primary prevention of cardiovascular outcomes in well-treated hypertensive patients, association of low-dose acetylsalicylic acid with active antihypertensive treatment reduced the risk of acute myocardial infarction without exaggerating the risk of cerebral bleeding.²⁹ For secondary prevention, its benefits are many times greater than the harm, and low-dose acetylsalicylic acid is well established as a standard therapy.³⁰ In both of these trials there was a higher prevalence of gastrointestinal side effects for the group randomized to receive acetylsalicylic acid.

The current study duration was 30 days, and no important macroscopic lesions occurred in the volunteers, but the study was able to demonstrate that there is an important variation of PGE_2 levels between the 2 regimens. As already mentioned, PGE_2 plays a crucial role for the maintenance of gastric mucosal integrity, and keeping its levels higher in cardiovascular compromised patients who will take acetylsalicylic acid

Table 1. Percentage Aggregation Values After Stimulation by Arachidonic Acid (AA) and Adenosine Diphosphate (ADP) on PRP

	Acetylsalicylic Acid Every Day		Acetylsalicylic Acid Every 3 Days		P Value
	Mean (%)	SD	Mean (%)	SD	
AA 500 $\mu\text{g/mL}$					
Basal	73	13	65	9	.107
D15	0	1	12	28	.206
D16	0	0	5	16	.494
D17	0	0	0	0	—
AA 300 $\mu\text{g/mL}$					
Basal	59	36	64	31	.958
D15	1	2	8	25	.375
D16	0	0	6	18	.314
D17	0	0	0	0	—
ADP 20 μM					
Basal	79	7	69	14	.214
D15	48	17	47	22	.596
D16	55	17	54	24	.843
D17	56	16	54	21	.864

PRP was obtained by light transmission aggregometry. Data are presented as mean $\pm$ SD; $n = 24$ volunteers equally divided into the 2 treatment groups. Tests were carried out on a pretreatment day (D0) and on the 15th (D15), 16th (D16), and 17th (D17) days of the study.

Figure 2. Mean ($\pm$ SD) thromboxane B_2 release on PRP determined by enzyme-linked immunosorbent assay after stimulation with arachidonic acid (AA) and adenosine diphosphate (ADP). D0 (baseline), D15 (15th day 300 $\mu\text{g/mL}$); panel B, stimulation with ADP 20 μM . Values presented in ng/mL. No statistical difference was observed between groups for any test day.

for their entire lifetime seems to offer a way to avoid important gastrointestinal lesions.

Complete recovery of gastric COX-1 activity after discontinuation of acetylsalicylic acid is faster than in circulating platelets because GI surface epithelium cells are nucleated and have a faster turnover (3 days)³¹ than platelets, and new cells could be replaced with intact COX activity. When a group of volunteers who received acetylsalicylic acid 81 mg daily was compared to a group receiving 325 mg every 3 days, it was found that the former group had a quicker restoration of PG release. In this study volunteers received either acetylsalicylic acid 81 mg daily or 325 mg every 3 days. Seventy-two hours after the last 81-mg dose, volunteers' gastric PG synthesis was not different from pretreatment values.¹⁴ In the current study the results suggest that not just the dose but also the 72-hour gap is important for the complete PG restoration.

There is no pharmacokinetic interaction between losartan and acetylsalicylic acid when these are coadministered.²⁰ Because there is also no difference in the inhibition of platelet aggregation by acetylsalicylic acid when taken together or separately with losartan, a combined therapy with daily losartan and acetylsalicylic acid every 3 days appears to be an interesting and safe approach. However, further studies are necessary to extrapolate this therapy scheme in patients with cardiovascular diseases in which platelet turnover is the subject of debate.^{33,34} Obtaining data outcomes from this particular population under the proposed regimen would be the highest priority in order to suggest it to clinical practice.

Previous work has shown that calendar packaging may improve adherence,³⁵ and because acetylsalicylic

Table 2. Thromboxane B₂ Release on PRP Determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay After Stimulation With Arachidonic Acid (AA) and Adenosine Diphosphate (ADP)

	Acetylsalicylic Acid Every Day		Acetylsalicylic Acid Every 3 Days		P Value
	Mean (ng/mL)	SD	Mean (ng/mL)	SD	
AA 300 μ g/mL					
Basal	940.0	650.7	1222.0	847.1	.343
D15	26.2	26.3	115.9	165.9	.065
D16	71.3	146.1	158.3	235.4	.264
D17	34.7	28.7	61.2	58.6	.141
ADP 20 μ M					
Basal	49.0	69.0	29.0	20.0	.333
D15	0.5	0.5	2.6	3.6	.054
D16	2.2	6.2	3.6	4.8	.546
D17	0.5	0.3	2.6	4.6	.094

Data are presented as mean $\pm$ SD; n = 24 volunteers equally divided into the 2 treatment groups. Tests were carried out on a pretreatment day (D0) and on the 15th (D15), 16th (D16), and 17th (D17) days of the study.

Figure 3. Mean ($\pm$ SD) PGE₂ levels on antrum biopsies collected before and after the 30-day treatment for both groups. Daily acetylsalicylic acid, $P = .0016$ vs baseline; every-3-days acetylsalicylic acid, $P = .4193$ vs baseline.

acid would not be taken every day, it might be favorable to the patient if both drugs could be marketed together in 1 package with the tablets scheduled for the whole month.

Conclusion

Volunteers who received acetylsalicylic acid 81 mg every 3 days maintained gastric PGE₂ levels by the end of the treatment and presented complete platelet inhibition. In contrast, the standard daily therapy had a 51.3% of gastric PGE₂ release inhibition. Because PGE₂ is involved in gastric healing, we understand that this new approach could be safer and as efficient as the standard daily therapy on a long-term basis. However, further investigation is required to conclude that the new treatment has the same protection rate as the standard daily therapy against secondary ischemic events.

Acknowledgments

This study was supported by Biolab Sanus Farmacêutica Ltda. P.M.F.F. received a PhD studentship from FAPESP (São Paulo Research Foundation).

References

- Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*. 1971;231:232–235.
- Roth GJ, Stanford N, Majerus PW. Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975;72:3073–3076.
- Loll PJ, Picot D, Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H₂ synthase. *Nat Struct Biol*. 1995;2:637–643.
- Heptinstall S, Fox SC. Human blood platelet behaviour after inhibition of thromboxane synthetase. *Br J Clin Pharmacol*. 1983;15 (Suppl 1):31S–37S.
- Michelson AD. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discovery*. 2010;9:154–169.
- Antithrombotic Trialists C. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002;324:71–86.
- Dalen JE. Aspirin to prevent heart attack and stroke: what's the right dose? *Am J Med*. 2006;119:198–202.
- Kawamura N, Ito Y, Sasaki M, et al. Low-dose aspirin-associated upper gastric and duodenal ulcers in Japanese patients with no previous history of peptic ulcers. *BMC Res Notes*. 2013;6:455.
- Whittle BJ, Higgs GA, Eakins KE, Moncada S, Vane JR. Selective inhibition of prostaglandin production in inflammatory exudates and gastric mucosa. *Nature*. 1980;284:271–273.

10. Lee M, Cryer B, Feldman M. Dose effects of aspirin on gastric prostaglandins and stomach mucosal injury. *Ann Intern Med.* 1994;120:184–189.
11. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, et al. Involvement of cyclooxygenase (COX)-2 products in acceleration of ulcer healing by gastrin and hepatocyte growth factor. *J Physiol Pharmacol.* 2000;51:751–773.
12. Mizuno H, Sakamoto C, Matsuda K, et al. Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. *Gastroenterology.* 1997;112:387–397.
13. Hatazawa R, Tanaka A, Tanigami M, et al. Cyclooxygenase-2/prostaglandin E₂ accelerates the healing of gastric ulcers via EP4 receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293:G788–G797.
14. Feldman M, Shewmake K, Cryer B. Time course inhibition of gastric and platelet COX activity by acetylsalicylic acid in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;279:G1113–G1120.
15. Frojmovic MM, Milton JG. Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. *Physiol Rev.* 1982;62:185–261.
16. Feldman M, Cryer B, Rushin K, Betancourt J. A comparison of every-third-day versus daily low-dose aspirin therapy on serum thromboxane concentrations in healthy men and women. *Clin Appl Thromb Hemostas.* 2001;7:53–57.
17. Stampfer MJ, Jakubowski JA, Deykin D, Schafer AI, Willett WC, Hennekens CH. Effect of alternate-day regular and enteric-coated aspirin on platelet aggregation, bleeding time, and thromboxane A₂ levels in bleeding-time blood. *Am J Med.* 1986;81:400–404.
18. Kallmann R, Nieuwenhuis HK, de Groot PG, van Gijn J, Sixma JJ. Effects of low doses of aspirin, 10 mg and 30 mg daily, on bleeding time, thromboxane production and 6-keto-PGF₁ alpha excretion in healthy subjects. *Thromb Res.* 1987;45:355–361.
19. Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C. Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest.* 1982;69:1366–1372.
20. Mendes GD, Ferreira PMF, Donato JL, Gagliano-Jucá T, Sampaio MF, De Nucci G. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of administration of losartan with aspirin in healthy volunteers. *Proc Br Pharmacol Soc.* 2013. <http://www.pa2online.org/abstracts/vol11issue3abst221p.pdf>.
21. Ferreira PMF, Gagliano-Jucá T, Sampaio MF, et al. ASA daily vs ASA every 3 days in healthy volunteers: effect on platelet aggregation and gastric mucosa PGE₂ synthesis. *Proc Br Pharmacol Soc.* 2014. <http://www.pa2online.org/abstracts/vol12issue3abst103p.pdf>.
22. Oliveira CH, Medeiros Silva R, Santagada V, et al. Comparative bioavailability of two losartan formulations in healthy human volunteers after a single dose administration. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2006;44:142–148.
23. Tamimi JJ, Salem, II, Mahmood Alam S, Zaman Q, Dham R. Comparative pharmacokinetics of two tablet formulations of losartan: bioequivalence assessment. *Biopharm Drug Dispos.* 2005;26:205–210.
24. Zaiken K, Hudd TR, Cheng JW. A review of the use of angiotensin receptor blockers for the prevention of cardiovascular events in patients with essential hypertension without compelling indications. *Ann Pharmacother.* 2013;47:686–693.
25. Olson KL. Combined aspirin/ACE inhibitor treatment for CHF. *Ann Pharmacother.* 2001;35:1653–1658.
26. Mancia G, Laurent S, Agabiti-Rosei E, European Society of Hypertension, et al. Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document. *J Hypertens.* 2009;27:2121–2158.
27. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemostas.* 2013;11:1183–1189.
28. Cryer B, Feldman M. Effects of very low dose daily, long-term aspirin therapy on gastric, duodenal, and rectal prostaglandin levels and on mucosal injury in healthy humans. *Gastroenterology.* 1999;117:17–25.
29. Hansson L, Zanchetti A, Carruthers SG, et al. Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. HOT Study Group. *Lancet.* 1998;351:1755–1762.
30. The SALT Collaborative Group. Swedish Aspirin Low-Dose Trial (SALT) of 75 mg aspirin as secondary prophylaxis after cerebrovascular ischaemic events. *Lancet.* 1991;338:1345–1349.
31. Ito S. Functional gastric morphology. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1987:817–851.
32. Mendes GD, Ferreira PMF, Gagliano-Jucá T, et al. Pharmacokinetic evaluation of administration of losartan with aspirin in healthy volunteers. *J Bioequiv Availability.* 2015;7:144–149.
33. Shlomai G, Haran-Appel T, Sella T, et al. High-risk type-2 diabetes mellitus patients, without prior ischemic events, have normal blood platelet functionality profiles: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol.* 2015;14:80.
34. Grove EL, Würtz M, Hvas AM, Kristensen SD. Increased platelet turnover in patients with previous definite stent thrombosis. *J Thromb Haemostas.* 2011;9(7):1418–1419.
35. Zedler BK, Kakad P, Colilla S, Murrelle L, Shah NR. Does packaging with a calendar feature improve adherence to self-administered medication for long-term use? A systematic review. *Clin Ther.* 2011;33:62–73.