

ESTUDO DO EFEITO DA TASIMELTEONA NA AGREGAÇÃO E ADESÃO DE PLAQUETAS HUMANAS

Palavras-Chave: [AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA], [ADESÃO PLAQUETÁRIA], [INIBIDORES DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA]

Autores/as:

**Marina Gasparotto de Andrade [Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNICAMP]
Prof. Dr. Gabriel Forato Anhê (orientador) [Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP]**

INTRODUÇÃO:

Pacientes que reportam insônia (dificuldade para iniciar ou manter o sono) apresentam maior risco de morte por causas cardiovasculares. Também é sabido que a prevalência de doença coronariana aguda é maior em indivíduos com muitas (acima de 7) ou poucas (abaixo de 7) horas de sono por noite. Ela se caracteriza por sinais e sintomas clínicos (tais como angina, dor irradiante do peito para os ombros e braços, náusea, vômito e dispnéia) decorrentes da obstrução parcial ou total de vasos coronarianos. O crescimento e a ruptura de placas de ateroma com a consequente ativação plaquetária e formação de trombos arteriais são eventos-chave para etiologia deste quadro clínico. Além disso, a atividade plaquetária é um evento exacerbado em pacientes com distúrbios do sono.

Plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados encontrados no sangue, produzidos na medula óssea a partir de megacariócitos, com vida útil média de 10 dias. Em seu citoplasma são encontradas moléculas de actina, miosina e trombostenina, proteínas com propriedades contráteis; retículo endoplasmático e complexo de Golgi, responsáveis pela síntese de enzimas e armazenamento de íons de cálcio; mitocôndrias; grânulos α , que contêm fibrinogênio, fibronectina, fatores de coagulação V e VIII, fator 4 plaquetário (ligante de heparina) e fatores de crescimento; grânulos δ , também conhecidos como grânulos densos, que armazenam adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), histamina e serotonina (5-HT). A função principal das plaquetas é promover a hemostasia, essencial para evitar a perda sanguínea após lesão vascular, através da ativação, adesão e agregação plaquetária. Já são conhecidos importantes agonistas que estimulam este fenômeno, tais como o fator IIa da cascata de coagulação (trombina) e o colágeno. De maneira geral, os fenômenos que levam à atividade das plaquetas são regulados pelo cálcio livre no citoplasma: o aumento do cálcio intracelular ocasionado pelos agonistas plaquetários promove a ativação, adesão e agregação.

A melatonina (n-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio de secreção rítmica que ocorre principalmente durante a ausência de luz e que tem a serotonina como precursor. A produção majoritária de melatonina ocorre na glândula pineal e sua função principal é a regulação de ritmos circadianos tais como o ciclo vigília/sono. Além desta função clássica da melatonina, já foram descritas atuações positivas deste hormônio em doenças hepáticas, obesidade, câncer e doenças cardiovasculares. Embora diversos trabalhos já tenham correlacionado uma redução na melatonina sérica com a incidência de doença arterial coronariana, hipertensão e infarto agudo do miocárdio, não é um consenso o papel deste hormônio na agregação plaquetária. São encontrados estudos que atribuem à melatonina capacidade de reduzir a agregação plaquetária estimulada por agonistas como colágeno e ácido araquidônico, enquanto outros estudos não convergem com tais resultados.

A Tasimelteona é uma droga aprovada nos Estados Unidos para o tratamento de um distúrbio do sono chamado Non-24-hours-sleep-wake-disorder (Non-24), caracterizado pela incapacidade do organismo em sincronizar o ritmo circadiano para 24 horas. A doença acomete cerca de 70% de indivíduos com deficiência visual, que não conseguem captar o estímulo luminoso responsável pela produção de melatonina. Esta droga é um agonista seletivo dos receptores de melatonina, tendo maior afinidade pelo MT2 e pouca afinidade por outros receptores farmacológicos relevantes.

A presença de receptores melatoninérgicos em plaquetas humanas torna essas células possíveis alvos para a ação da Tasimelteona e, nesse sentido, o presente projeto buscou avaliar se a droga altera a atividade plaquetária (agregação e adesão), frente a estímulos agregantes, e se antagonistas dos receptores melatoninérgicos inibem seus efeitos.

METODOLOGIA:

Casuística

Foram incluídos no estudo participantes entre 18 e 60 anos, do sexo feminino e masculino, após aprovação do projeto no Comitê de Ética (CAAE: 51405721.7.0000.5404)). Os critérios de exclusão foram: uso de qualquer medicamento dentro de até 10 dias antes da coleta de sangue; tabagismo; história de evento cardiovascular (IAM, AVE isquêmico ou hemorrágico, diagnóstico de síndrome coronariana e insuficiência cardíaca). O sangue total foi obtido por venopunção periférica da fossa cubital, utilizando SCALP calibre 21G, sendo coletados 20 mL de cada voluntário.

Ensaio de agregação plaquetária

A agregação plaquetária foi mensurada em dois tipos de preparados plaquetários, o plasma rico em plaquetas (PRP) e as plaquetas lavadas (PL), obtidos após a coleta do sangue total nos anticoagulantes citrato de trissódio 3,8% ou ACD-C (9 partes de sangue: 1 parte de anticoagulante). As amostras foram centrifugadas a 120g, por 25 min., a 23°C. O sobrenadante correspondente ao PRP foi coletado e transferido para tubo Falcon limpo e o sangue remanescente, novamente centrifugado a 800g, por 10 min., para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). Também separou-se o PRP derivado do sangue anticoagulado com ACD-C, desprezando o sangue remanescente e centrifugando-o nas mesmas configurações que o PRP derivado do sangue anticoagulado com citrato.

O sobrenadante foi desprezado e o resíduo plaquetário em forma de pellet, cuidadosamente ressuspenso em um volume de Krebs-Ringer igual à metade do volume do sobrenadante obtido. O número de plaquetas foi ajustado para 1.5×10^8 plaquetas/mL através de contagem manual, utilizando-se a câmara de Neubauer.

A agregação foi monitorada utilizando-se um agregômetro óptico de oito canais (Platelet Aggregation Profiler, 8 channel PAP-8 V2.0 optics - Bio-Data Corporation (Bio-Data Corporation)), calibrado para 0% com PRP ou solução de plaquetas lavadas e 100% com PPP ou solução Krebs-Ringer, respectivamente. Em cada ensaio, utilizou-se amostras de 200 µL de PRP ou solução de PL, adicionadas em cubetas de quartzo, mantidas sob temperatura constante (37 °C) no agregômetro. Logo antes do ensaio, foi adicionado CaCl_2 à solução de PL, para uma concentração final de 1 mM. Como estímulos para promover a agregação plaquetária foram utilizados ácido araquidônico 30 mM (para PRP) e 50 mM (para PL) e colágeno 3 µg/mL. A curva de agregação foi monitorada por cerca de 5 minutos. A Tasimelteona foi incubada por 3 minutos antes da adição dos agonistas e testada nas concentrações 1, 10, 50 e 80 µM.

Ensaio de adesão estática ao fibrinogênio

Uma microplaca de alta ligação foi incubada com 50 µg/mL de fibrinogênio *overnight* em geladeira. Os poços foram lavados duas vezes com solução de Krebs-Ringer sem cálcio e os sítios não específicos foram bloqueados pela adição de 100 µL por poço de solução de albumina sérica bovina (BSA) a 1%. Após 1h a 37°C, a solução de BSA foi removida e a microplaca foi lavada

novamente com solução de Krebs-Ringer. 50 μ L da suspensão de plaquetas em $1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL foram incubados com Tasimelteona, por 3 minutos, e/ou antagonistas melatoninérgicos (Luzindole ou 4-P-PDOT), por 10 minutos. Após 30 minutos, a microplaca foi lavada duas vezes com solução de Krebs-Ringer. Uma solução de substrato de fosfatase ácida foi pipetada em poços com plaquetas aderidas e, após 1 hora de incubação em temperatura ambiente, 100 μ L de NaOH 2M foi adicionado a cada poço para parar a reação. O p-nitrofenol produzido neste ensaio foi medido em um espectrofotômetro de placa (Synergy™ H1 Hybrid Reader, Biotek, EUA). A adesão plaquetária, em porcentagem, foi calculada comparando os resultados com a curva padrão obtida com um número conhecido de plaquetas (variando de $0,3$ a 6×10^6 plaquetas/poço).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados obtidos foram tabulados e analisados estatisticamente pelo software GraphPad Prism (GraphPad Prism, version 6.01 - GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Verificou-se a distribuição paramétrica pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo post hoc de Tukey ou Kruskal-Wallis seguida pelo teste post hoc de Dunn foi aplicada para comparações de dados paramétricos e não-paramétricos, respectivamente.

A agregação plaquetária máxima em PRP estimulado por ácido araquidônico difere-se daquele que recebeu apenas o veículo DMSO 1% (basal), entretanto, tem valor semelhante àquelas amostras incubadas previamente com Tasimelteona, em qualquer dose. Não há diferenças estatísticas entre o valor do veículo e as amostras tratadas com a droga (Figura 1A). Todas as amostras de PL estimuladas com ácido araquidônico se mostraram diferentes do veículo, independentemente da Tasimelteona, em qualquer concentração (Figura 1B).

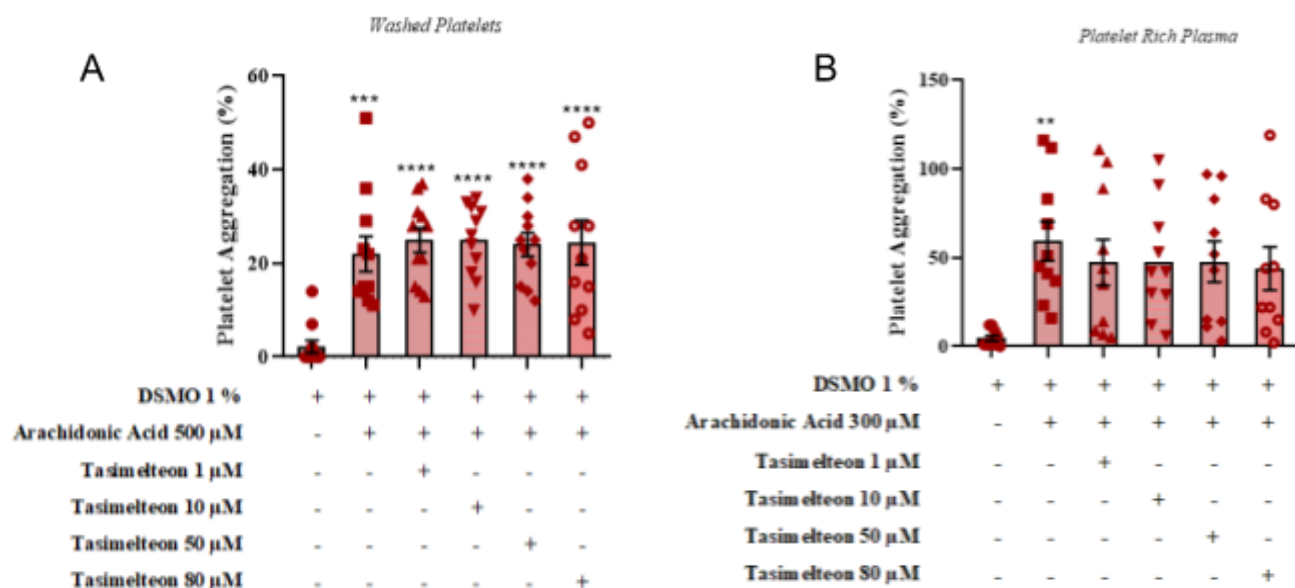


Fig. 1: Agregação plaquetária máxima em (A) PRP (n = 10) e (B) PL (n = 11), estimulada por ácido araquidônico. Valores expressos em média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: ** p<0,01 vs. DMSO 1%, *** p<0.001 vs. DMSO, **** p<0.0001 vs. DMSO

Este mesmo padrão de amostras basais sendo estatisticamente diferentes das estimuladas também foi observado nos ensaios utilizando colágeno, seja com PRP (Figura 2A) ou PL (Figura 2B).

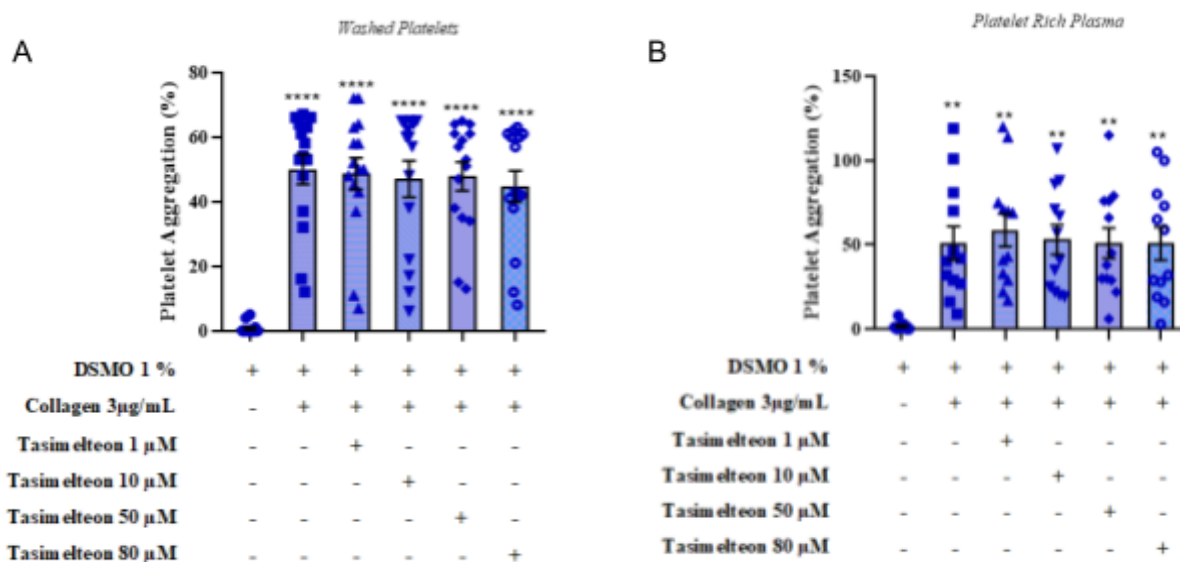


Fig. 2: Agregação plaquetária máxima em (A) PRP (n = 12) e (B) PL (n = 15), estimulada por colágeno. Valores expressos em média ± SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: ** p<0,01 vs. DMSO 1 %; **** p<0,0001 vs. DMSO 1 %.

Na adesão estática ao fibrinogênio, foi observado que a incubação prévia com Tasimelteona 80 µM reduziu a adesão ao fibrinogênio em quase 10%, quando comparada ao veículo (Figura 3). A presença do antagonista de MT1 (Luzindole) não foi capaz de reverter a inibição causada pela maior concentração da droga. A utilização de 4-P-PDOT, por si só, promoveu redução de 15% da adesão ao fibrinogênio em relação ao veículo. A associação de Tasimelteona 80 µM com o 4-P-PDOT promoveu inibição de cerca de 20% da adesão, comparada ao veículo (Figura 4).

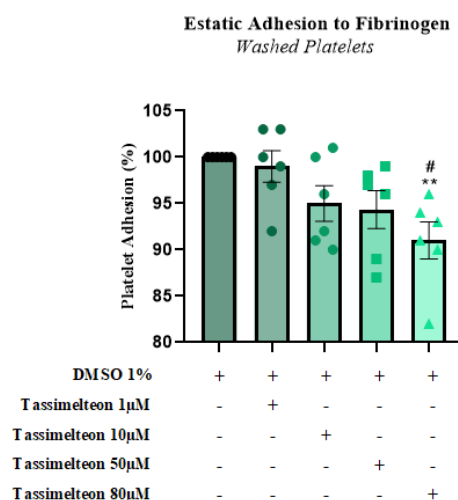


Fig. 3: Efeito da Tasimelteona sobre a adesão plaquetária. Valores expressos em média ± SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: ** p<0,05 vs. DMSO 1%; # p<0,05 vs. Tasimelteon 1 µM.

Diversos exemplos da ação da melatonina sobre plaquetas são encontrados na literatura. Já foi descrito que, em altas concentrações, esta indolamina possui capacidade de inibir consideravelmente a agregação plaquetária promovida pelo ácido araquidônico e colágeno. Nesse sentido, os resultados encontrados no presente estudo não mimetizam este fenômeno, visto que a maior concentração de Tasimelteona não foi capaz de bloquear de maneira significativa a agregação plaquetária estimulada pelos compostos supracitados. Por outro lado, a adesão estática ao fibrinogênio foi afetada pela utilização do agonista de melatonina e potencializada pela associação desta com o 4-P-PDOT, que também desempenha papel de agonista parcial do receptor MT₂.

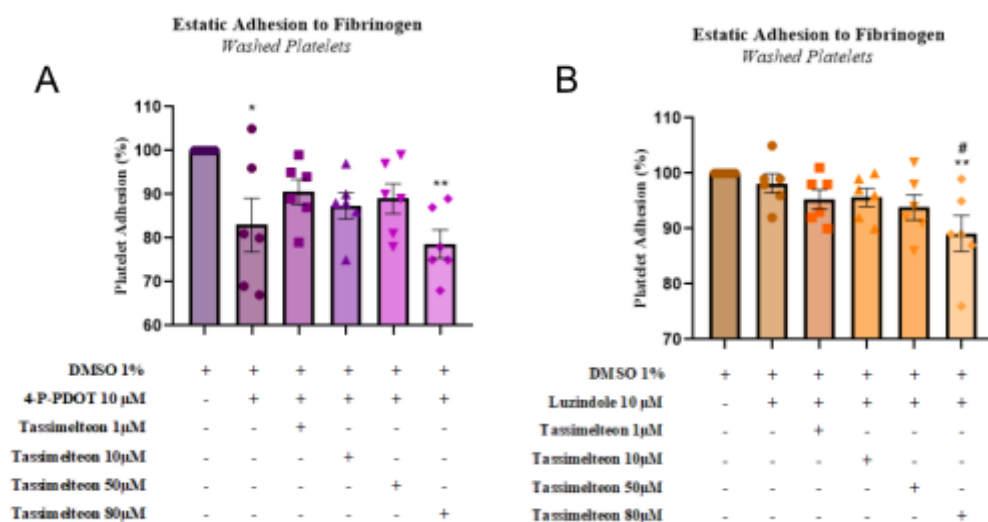


Fig. 4.: Efeito do 4-P-DOT (A) e do Luzindole (B) na adesão plaquetária. Valores expressos em média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão representadas da seguinte forma: * $p < 0.05$ vs. DMSO 1%, ** $p < 0.01$ vs. DMSO 1%, # $p < 0.05$ vs. Luzindole 10 μ M.

A associação entre a ativação do receptor melatonérgico MT₂ e a redução da adesão celular via ICAM em outros tipos celulares já foi documentada. Visto que plaquetas expressam esta molécula de adesão e ela está intimamente relacionada com a estabilização do agregado plaquetário, é possível que a redução observada nos ensaios de adesão estática ao fibrinogênio ocorram em decorrência do agonismo ao receptor MT₂, comum tanto a Tasimelteona quanto ao 4-P-PDOT.

Comparando os resultados obtidos, pode-se deduzir que, apesar de não apresentar grandes interferências sobre a formação do agregado plaquetário, a Tasimelteona atua na estabilização e consolidação do agregado mediado por fibrinogênio.

CONCLUSÕES:

Conclui-se, a partir destes resultados, que a ativação dos receptores melatonérgicos pela Tasimelteona promove redução na adesão plaquetária, mas não demonstra forte ação inibitória na agregação estimulada por ácido araquidônico ou colágeno.

BIBLIOGRAFIA

KORNBLIHTT, Laura I. *et al.* Inhibitory effect of melatonin on platelet activation induced by collagen and arachidonic acid. **Journal Of Pineal Research**. Buenos Aires, p. 184-191, 1993

LAVEDAN, Christian *et al.* Tasimelteon: A selective and unique receptor binding profile. **Neuropharmacology**, Washington, v. 91, n. 1, p. 142-147, 2015

TORRES, Rosarelis *et al.* Pharmacokinetics of the Dual Melatonin Receptor Agonist Tasimelteon in Subjects With Hepatic or Renal Impairment. **The Journal Of Clinical Pharmacology**. Washington, p. 525-533, 2014